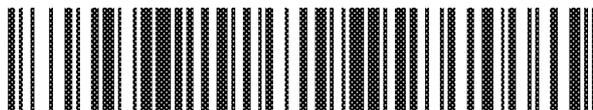


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 220**

21 Número de solicitud: 201331704

51 Int. Cl.:

**C07F 1/08** (2006.01)

**C07F 15/02** (2006.01)

**C07F 15/04** (2006.01)

**C07F 15/06** (2006.01)

**A61K 31/555** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**22.11.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.12.2013**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**27.03.2014**

Fecha de la concesión:

**30.06.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**07.07.2014**

79 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (5%) (100.0%)  
Hospital Real. Avda. Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**SALAS PEREGRÍN, Juan Manuel;  
SÁNCHEZ MORENO, Manuel;  
MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde;  
RODRÍGUEZ MALDONADO, Carmen y  
CABALLERO HERNÁNDEZ, Ana Belén**

54 Título: **Complejos metálicos con actividad antiparasitaria**

57 Resumen:

Complejos metálicos con actividad antiparasitaria.  
La presente invención se refiere a unos complejos metálicos coordinados con al menos un ligando 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina, además la invención también se refiere al uso de estos complejos para el tratamiento de enfermedades parasitarias y más particularmente de leishmaniasis o enfermedad de Chagas.

ES 2 436 220 B2

## DESCRIPCIÓN

Complejos metálicos con actividad antiparasitaria.

- 5 La presente invención se refiere a unos complejos metálicos con ligandos dmtp (5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina). Además la invención también se refiere al uso de estos complejos para el tratamiento de enfermedades parasitarias y más particularmente de leishmaniasis y/o enfermedad de Chagas.

### 10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas afectan sustancialmente en las regiones tropicales y subtropicales, causando mortalidad, y problemas económicos.

- 15 La enfermedad de Chagas es una infección crónica, sistémica y parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y es considerada por la OMS como una de las enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo.

- Los principales fármacos utilizados actualmente para tratar la enfermedad de Chagas  
20 son dos heterociclos nitro aromáticos: nifurtimox (derivado de furano) y benznidazol (derivado de imidazol). Ambos fármacos son efectivos en la fase aguda de la enfermedad, aunque benznidazol presenta un mayor perfil de eficacia y seguridad, pero la eficacia de ambos es muy baja en la fase crónica. Además, estos compuestos tienen serios efectos secundarios como anorexia, náuseas, polineuropatía periférica, y  
25 dermatopatía alérgica. La presencia de grupos nitro unidos a los anillos heterocíclicos sugiere que estos fármacos actúan sobre el parásito mediante la reducción del grupo nitro, originando intermediarios reducidos que pudieran interaccionar con diferentes biomoléculas por formación de enlaces covalentes, aunque este modo de acción aún se debate actualmente. Su nivel de toxicidad en los humanos se debe probablemente  
30 a daño oxidativo o reductor de tejidos, lo cual está estrechamente vinculado a su actividad antiparasitaria. Por tanto, se requieren urgentemente fármacos menos tóxicos y más selectivos.

- Leishmaniasis es el nombre asignado a un grupo de enfermedades causadas por  
35 parásitos protozoarios kinetoplastidos del género *Leishmania*. Recientemente, se ha descrito que la coinfección de VIH con leishmaniasis en huéspedes inmunodeficientes

es un nuevo factor que incrementa las áreas endémicas a lo largo de todo el mundo. La leishmaniasis se presenta en los humanos bajo tres formas clínicas principales: (i) visceral, la forma más severa y con mayor riesgo de mortalidad; (ii) cutánea, que se origina como nódulos y úlceras que pueden persistir durante años; y (iii) mucocutánea, la cual produce lesiones permanentes en la boca, nariz y mucosa genital. Dichas formas son producidas por especies múltiples y filogenéticamente diferentes. *Leishmania infantum* es considerado el principal agente etiológico de la leishmaniasis visceral en el sur de Europa. Utiliza los perros como huéspedes y afecta principalmente a niños de entre 1 y 4 años, aunque desde la aparición de la infección VIH y el aumento en el uso de inmunosupresores para trasplantes y quimioterapia, casi la mitad de los casos afectan a adultos.

Otra especie importante, derivada del subgénero *Viannia*, es *Leishmania braziliensis*, que es originaria principalmente de los países Andinos y de la Cuenca del Amazonas y causa leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

El diseño de nuevos fármacos activos frente a las diversas formas de estas enfermedades parasitarias, especialmente leishmaniasis visceral, es una necesidad urgente. Hasta la fecha, no se dispone de una vacuna efectiva y las herramientas de diagnóstico no son específicas, debido a medidas de control deficientes sobre el vector. Los médicos hacen uso de la quimioterapia como arma primaria para combatir todas las manifestaciones clínicas mencionadas anteriormente. Sin embargo, los fármacos en uso hasta el momento son bastante ineficaces o causan una multitud de serios efectos secundarios y, además, los organismos parasitarios desarrollan rápidamente una fuerte resistencia hacia el fármaco, disminuyendo su sensibilidad a estos fármacos. Durante más de 50 años, derivados de metales pesados, principalmente antimoniales pentavalentes, se han empleado como fármacos estándar para el tratamiento de leishmaniasis. Entre ellos, los más representativos son el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el meglumineantimoniato (Glucantime®). Se supone, aunque no está verificado, que actúan mediante la inhibición de la síntesis de ATP. Sin embargo, los antimoniales causan diversos efectos secundarios, como náuseas, diarrea, erupciones de piel, mareo, arritmia cardíaca, hipotensión, hepatitis y pancreatitis. Por otra parte, la administración del fármaco es difícil, bajas dosis favorecen la resistencia en el parásito y elevadas dosis son tóxicas. Otros tipos de fármacos han sido ensayados recientemente. Pentamidinas son solo efectivas frente a la leishmaniasis cutánea y, aunque mejor toleradas, causan diabetes mellitus a

elevadas dosis. Fluconazol, anfotericina B y miltefosina son útiles contra la leishmaniasis visceral y, a pesar de su menor toxicidad, su eficacia es limitada frente a otras formas de la enfermedad. Por lo tanto, resulta necesario obtener nuevos agentes terapéuticos anti-tripanosomátidos más potentes y selectivos frente a cepas  
5 resistentes a los tratamientos habituales. Además, es importante que presenten una menor toxicidad con el objetivo de disminuir los efectos secundarios adversos

Los ligandos triazolopirimidínicos han demostrado ser bloques de construcción excelentes y versátiles con capacidad para producir polímeros de coordinación  
10 multidimensionales con interesantes propiedades (Ana B. Caballero et al. *Crystal Growth & Design* 2012, 12, 3583-3593).

En relación a sus propiedades antiparasitarias, algunos derivados de estas moléculas bicíclicas y algunos de sus complejos metálicos han demostrado ser especialmente  
15 activos frente a diversas especies como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* (C.R. Maldonado et al., 2010, *J. Med. Chem.*, 53, 6964-6972; A.B. Caballero et al., 2011, *J. Inorg. Biochem.*, 105, 770-776; I. Ramírez-Macías et al., 2011, *J. Antimicrob Chemother*, 66, 813-819).

Por otro lado, se han descrito complejos metálicos con ligandos que consisten en moléculas de 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dmtp) y otros ligandos auxiliares como etilendiamina o o-fenantrolina, que han demostrado cierta actividad antiproliferativa *in vitro* frente a *T. cruzi* y *L. peruviana* (S. Boutaleb-Charki et al., 2009  
20 *Drug Metabolism Letters*, 3, 35-44).

25

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una serie de complejos metálicos que contienen 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dmtp) como ligando y que presentan  
30 interesantes propiedades antiparasitarias. Estos complejos poseen mejor actividad que alguno de los fármacos utilizados en la actualidad como por ejemplo Benznidazol (enfermedad de Chagas) o Glucantime® (Leishmaniasis).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un complejo  
35 metálico que comprende:

- a. un metal de transición;
- b. al menos cuatro ligandos coordinados covalentemente con el metal de

transición, donde los ligandos se seleccionan de la lista que consiste en 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dntp) y H<sub>2</sub>O y donde al menos un ligando es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina; y

c. un contraión

5 o cualquiera de sus estructuras cristalinas, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad parasitaria.

Por "complejo metálico", en nuestro caso, se entiende una estructura formada por un metal, que se encuentra enlazado o coordinado a otros grupos de átomos que lo rodean llamados ligandos y estabilizada con un contraión para compensar la carga del metal. En la presente invención el metal estaría coordinado con al menos cuatro ligandos. Los ligandos pueden ser monodentados o multidentados. En el caso de los complejos de la presente invención los ligandos son monodentados y los complejos al menos comprenden cuatro ligandos que se seleccionan entre agua y dntp, siendo al menos uno de ellos dntp; más preferiblemente al menos dos o cuatro ligandos son dntp.

En una realización preferida, el complejo metálico comprende al menos seis ligandos de los descritos anteriormente, más preferiblemente el complejo metálico está compuesto por seis ligandos, de los cuales preferiblemente al menos dos o cuatro son dntp.

Por "metal de transición" se entiende a cualquier catión metálico, preferiblemente de la primera serie de transición, aunque se pueden usar metales de la segunda y tercera serie de transición de los grupos 7-12 de la tabla periódica, y aún más preferiblemente se selecciona entre Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn. El estado de oxidación del metal de transición es preferiblemente +2, es decir, es un metal divalente, por tanto, cuando el contraión es monovalente se precisan de dos contraiones para compensar la carga positiva.

30

El "contraión" es cualquier anión farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que comprende ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, I<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, más preferiblemente es ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

35 En una realización preferida el complejo es de fórmula [M(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub> o de fórmula [M(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (X)<sub>2</sub>; donde M es un metal de transición tal y como se ha

definido anteriormente y X es un contraión tal y como se ha definido anteriormente. En una realización más preferida el metal de transición se selecciona de entre Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn, y más preferiblemente el contraión se selecciona de entre  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PF}_6^-$  y  $\text{BF}_4^-$ , aún más preferiblemente es  $\text{ClO}_4^-$ .

5

Los complejos metálicos de la invención se pueden encontrar en forma cristalina; en estos casos la estructura cristalina de estos complejos también está compuesta por moléculas dmtp y/o moléculas de agua de cristalización, donde dichas moléculas interaccionan de forma no covalente con el complejo metálico y los contraiones. Cada molécula dmtp coordinada interacciona mediante fuerzas de  $\pi$ -stacking con una molécula dmtp no coordinada, mientras que las moléculas de agua de cristalización y los contraiones estabilizan la estructura cristalina a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares con las moléculas de agua coordinadas y los ligandos dmtp.

10

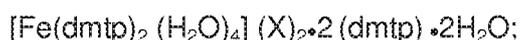
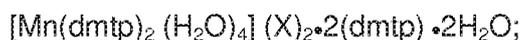
15 En otra realización el complejo es de fórmula cristalina  $[\text{M}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{X})_2 \cdot 2(\text{dmtp}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , es decir, consiste en un metal (M) divalente coordinado con seis ligandos, dos son dmtp y cuatro son agua, con dos moléculas de dmtp unidas mediante fuerzas de  $\pi$ -stacking con cada uno de los ligandos dmtp, además de dos moléculas de agua de cristalización y dos contraiones (X) monovalentes que estabilizan la estructura cristalina.

20

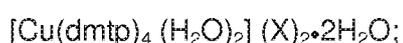
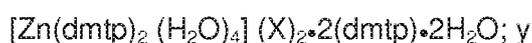
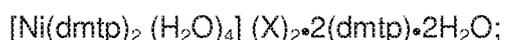
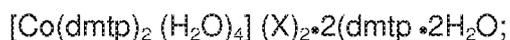
En otra realización el complejo de la invención es de fórmula cristalina  $[\text{M}(\text{dmtp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{X})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; es decir, consiste en un metal (M) divalente coordinado con seis ligandos, cuatro son dmtp y dos son agua, y dos moléculas de agua de cristalización y dos contraiones monovalentes que estabilizan la estructura cristalina.

25

En una realización más preferida, el complejo de la invención se selecciona de entre:



30



donde: X es un contraión como se ha definido anteriormente.

35

En una realización más preferida, el complejo de la invención se selecciona de entre:

[Mn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O; [Fe(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O;  
 [Co(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O; [Ni(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
 [Zn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O; y [Cu(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O.

5 Por "enfermedad parasitaria", se entiende en la presente invención a una enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes (cestodos, trematodos, nematodos) o artrópodos. En particular, en la presente invención, los parásitos son protozoos, por tanto, se puede decir que los compuestos son antiprotozoarios. En una realización más preferida los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, más  
 10 preferiblemente los parásitos son del género *Trypanosoma* o *Leishmania*. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* o *Leishmania chagasi*, entre otras, conocidas por un experto en la materia.

15 Las enfermedades parasitarias a tratar podrían ser leishmaniasis o tripanosomiasis. La "Leishmaniasis" es una enfermedad causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido, principalmente por dípteros conocidos como "sand fly", moscas de la arena o jejenes. Esta enfermedad se produce en humanos y animales vertebrados, como pueden ser marsupiales, cánidos, roedores y primates. Las "Tripanosomiasis"  
 20 son enfermedades producidas en humanos o animales vertebrados que son causadas por parásitos protozoarios del género *Trypanosoma*, entre ellas se puede encontrar la tripanosomiasis humana africana, también conocida como enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis en animales o Nagana.

25 Por tanto, en una realización preferida los compuestos y/o complejos descritos en la presente invención se usan para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias protozoarias, más preferiblemente los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*.

30 En una realización preferida de la presente invención los compuestos descritos en la presente invención se usan para el tratamiento y/o la prevención de la leishmaniasis o la enfermedad de Chagas.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un complejo metálico que comprende:

- a. un metal de transición seleccionado de entre Mn, Fe, Co, Ni, y Zn;
- b. al menos cuatro ligandos coordinados covalentemente con el metal de transición, donde los ligandos se seleccionan de la lista que consiste en dntp y H<sub>2</sub>O y donde al menos un ligando es dntp; preferiblemente los ligando son al menos seis; y
- 5 c. un contraión;
- o cualquiera de sus estructuras cristalinas,  
con la condición de que el contraión es diferente a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ó I<sub>3</sub><sup>-</sup>.

El metal de este complejo metálico es preferiblemente un metal divalente.

10

Como se ha descrito anteriormente el contraión es diferente a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ó I<sub>3</sub><sup>-</sup>, preferiblemente se puede seleccionar de entre ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, más preferiblemente es ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

- 15 El complejo de este aspecto de la invención puede ser de fórmula [M(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](X)<sub>2</sub>; donde M es un metal de transición seleccionado de entre Mn, Fe, Co, Ni, y Zn, X es un contraión es diferente NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ó I<sub>3</sub><sup>-</sup>.

- 20 El complejo de este aspecto de la invención puede ser de fórmula cristalina [M(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](X)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O; donde M es un metal de transición seleccionado de entre Mn, Fe, Co, Ni, y Zn, X es un contraión es diferente NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ó I<sub>3</sub><sup>-</sup>.

En una realización más preferida el complejo de este aspecto de la invención se selecciona de entre:

- 25 [Mn(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
[Fe(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
[Co(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
[Ni(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O; y  
[Zn(dntp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O.

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere al complejo de fórmula:  
[Cu(dntp)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O.

- 35 Un aspecto más de la presente invención se prefiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un complejo metálico según se ha descrito en los dos

anteriores aspectos de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente esta composición puede incluir otro principio activo, por ejemplo otro compuesto antiparasitario.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y  
10 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Esquema sintético y estructura molecular de los compuestos 1 a 6.

15

**Fig. 2.** Efecto de la actividad de los complejos metálicos 3, 4 y 5 sobre la tasa de infección y crecimiento de *L. infantum*. (Fig. 2A) Tasa de infección; (Fig. 2B) Número promedio de amastigotes por célula J774,2 infectada. Los valores se han tomado a partir de la media de tres medidas independientes.

20

**Fig. 3.** Efecto de la actividad de los complejos metálicos 3, 4 y 5 sobre la tasa de infección y crecimiento de *L. braziliensis*. (Fig. 3A) Tasa de infección; (Fig. 3B) Número promedio de amastigotes por célula J774,2 infectada. Los valores se han tomado a partir de la media de tres medidas independientes.

25

**Fig. 4.** Efecto de la actividad de los complejos metálicos 3, 4 y 5 en la tasa de infección y crecimiento de *T. cruzi*. (Fig. 4A) Tasa de infección; (Fig. 4B) Número promedio de amastigotes por célula Vero infectada; (Fig. 4C) Número de tripomastigotes en el medio de cultivo. Los valores se han tomado a partir de la media  
30 de tres medidas independientes.

**Fig. 5.** Parasitemia en el modelo murino de la enfermedad de Chagas aguda: Control (♦) y con dosis 10 mg/kg de: Benznidazol (+); Compuesto 3(■); Compuesto 4 (Δ); Compuesto 5 (●).

35

**MODOS DE REALIZACIÓN**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad los compuestos de la invención.

En estos ejemplos se describe la síntesis de seis complejos metálicos con dmtp:

$[M(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2(\text{dmtp}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , donde: M representa un metal de transición que se selecciona de  $\text{Mn}^{2+}$  (1),  $\text{Fe}^{2+}$  (2),  $\text{Co}^{2+}$  (3),  $\text{Ni}^{2+}$  (4) y  $\text{Zn}^{2+}$  (6); y

10  $[\text{Cu}(\text{dmtp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5).

Asimismo se describe su actividad antiproliferativa *in vitro* frente a las formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi* y dos especies de *Leishmania* (*L. infantum* y *L. braziliensis*). Se determinó su toxicidad frente a macrófagos J774,2 y células Vero y se comparó con los correspondientes valores para los fármacos Benznidazole y Glucantime, utilizados como referencia en estos estudios. En el caso de *T. cruzi*, se registró la actividad antitripanocida *in vivo* en ratones hembra BALB/c.

**Ejemplo 1.- Síntesis de los compuestos (1) a (6)**

20

Los compuestos (1) a (6) anteriores, se sintetizaron de acuerdo al siguiente procedimiento general:

Disoluciones acuosas de las respectivas sales metálicas en 10 mL ( $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,181 g;  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,128 g;  $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,183 g;  $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,183 g; 25  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,185 g;  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,186 g) se mezclaron con 10 mL de una disolución acuosa de ligando dmtp (1 mmol, 0,148 g). La mezcla se agitó a 80 °C durante 30 min. y las respectivas disoluciones transparentes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5-10 días. En las disoluciones se formaron cristales de 1-6 de calidad adecuada para su análisis por rayos X. En la Tablas 1 y 2 se recogen 30 los datos cristalográficos y el aspecto de cada compuesto.

Compuesto 1. Rendimiento (basado en Mn) ~80 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{MnN}_{16}\text{O}_{14}$  (exp.): C, 35,23 (34,62); H, 5,65 (5,77); N, 23,48 (23,87). Bandas IR seleccionadas de 1: 1110vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1556s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1630s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3404s ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

35

Compuesto 2. Rendimiento (basado en Fe) ~45 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{FeN}_{16}\text{O}_{14}$

(exp.): C, 35,20 (34,89); H, 4,64 (5,31); N, 23,45 (24,14). Bandas IR seleccionadas de 2: 1103vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1558s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1631s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3372s, 3532s ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

5 Compuesto 3. Rendimiento (basado en Co) ~82 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{CoN}_{16}\text{O}_{14}$  (exp.): C, 35,08 (35,12); H, 4,63 (5,06); N, 23,38 (22,66). Bandas IR seleccionadas de 3: 1103vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1557s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1631s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3369s, 3534s ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

10 Compuesto 4. Rendimiento (basado en Ni) ~63 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{NiN}_{16}\text{NiO}_{14}$  (exp.): C, 35,09 (35,20); H, 4,63 (4,74); N, 23,38 (23,08). Bandas IR seleccionadas de 4: 1103vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1558s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1631s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3363s, 3536s ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

15 Compuesto 5. Rendimiento (basado en Cu) ~40 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{CuN}_{16}\text{O}_{12}$  (exp.): C, 36,27 (36,43); H, 4,35 (4,40); N, 24,17 (24,09). Bandas IR seleccionadas de 5: 1111vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1557s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1630s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3496s, 3626m ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

20 Compuesto 6. Rendimiento (basado en Zn) ~79 %. Anal. Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{N}_{16}\text{O}_{14}\text{Zn}$  (exp.): C, 34,85 (34,42); H, 4,59 (5,01); N, 23,22 (23,10). Bandas IR seleccionadas de 6: 1110vs ( $\nu_{\text{ClO}_4}$ ), 1554s ( $\nu_{\text{py}}$ ), 1636s ( $\nu_{\text{tp}}$ ), 3436s ( $\nu_{\text{O-H}}$ ).

20 Los resultados de análisis elemental son considerados como una garantía de que la pureza de los compuestos aislados es superior al 95%.

25 Los análisis elementales se realizaron en un analizador Fisons-Carlo Erba modelo EA 1108. Los espectros IR sobre muestras en polvo se registraron con un ThermoNicolet IR200FTIR utilizando pastillas de KBr. El comportamiento térmico se estudió bajo flujo de aire en equipos Shimadzu TGA-50 y Shimadzu DSC-50, a velocidades de calentamiento de 20 °C min<sup>-1</sup> y 10 °C min<sup>-1</sup>, respectivamente. Los espectros de reflectancia difusa se midieron en un espectrofotómetro VARIAN modelo CARY-5E.

30 Los espectros infrarrojo de los compuestos se registraron en la región 4000-400 cm<sup>-1</sup> y muestran las bandas características del ligando dmp. La región 1700–1500 cm<sup>-1</sup> del heterociclo presenta dos bandas a 1638 y 1548 cm<sup>-1</sup>, las cuales están ligeramente desplazadas por efecto de la coordinación al ión metálico. La presencia del anión perclorato se hace evidente por la aparición de una banda intensa en torno a 1100 cm<sup>-1</sup>,  
35 debida a la típica vibración de tensión. Los espectros también muestran bandas anchas en la región 3500-3300 cm<sup>-1</sup>, que se asignan a los modos  $\nu(\text{O-H})$  de las

moléculas de agua, ensanchados y desplazados a menores números de onda por la formación de enlaces de hidrógeno.

Los espectros electrónicos para los compuestos de Co(II), Ni(II) y Cu(II) presentan las típicas bandas de los correspondientes iones metálicos. Los parámetros  $\Delta o$  y B para cada complejo se calcularon a partir de las ecuaciones de Dou ( Dou, Y. Equations for calculating Dq and B. J. Chem. Education 1990, 67, 134). Los valores  $\Delta o$  para los complejos 3, 4 y 5 son 9803, 9804 y 15456  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, y los valores B son 873 y 848  $\text{cm}^{-1}$  para 3 y 4, respectivamente.

10

Tabla 1. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura de 1-3.

Compuesto	1	2	3
Fórmula	$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{MnN}_{16}\text{O}_{14}$	$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{FeN}_{16}\text{O}_{14}$	$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{CoN}_{16}\text{O}_{14}$
Peso molecular	954,63	955,54	958,62
Tamaño del cristal (mm)	0,53 × 0,23 × 0,03	0,38 × 0,29 × 0,11	0,42 × 0,35 × 0,28
Aspecto del cristal	prismático, incoloro	prismático, amarillo	prismático, naranja
$\lambda$ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$P2_1/n$
$a$ (Å)	14,9135(8)	14,8776(11)	14,8283(8)
$b$ (Å)	8,5203(5)	8,5567(6)	8,5796(5)
$c$ (Å)	17,7690(10)	17,6690(13)	17,6281(10)
$\beta$ (deg)	111,617(1)	111,748(1)	111,957(1)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	2099,1(2)	2089,3(3)	2080,0(2)
Z	2	2	2
Densidad (Calc., g cm <sup>-3</sup> )	1,510	1,519	1,531
$F(000)$	990	992	994
Coef. absorción (mm <sup>-1</sup> )	0,524	0,571	0,623
Reflexiones únicas	19958	10801	23307
$R_{\text{int}}$	0,0304	0,0226	0,0209
$R_1/wR_2 [I > 2\sigma(I)]^a$	0,0372/0,1058	0,0366/0,0990	0,0355/0,1021
$R_1/wR_2$ (todas las refl.) <sup>a</sup>	0,0414/0,1089	0,0413/0,1024	0,0393/0,1050
Bondad de ajuste en $F^2$ <sup>b</sup>	1,076	1,042	1,067

Tabla 2. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura de los compuestos 4-6.

Compuesto	4	5	6
Fórmula	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>16</sub> NiO <sub>14</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub> Zn
Peso molecular	958,40	927,20	965,06
Tamaño del cristal (mm)	0,51 × 0,42 × 0,21	0,50 × 0,31 × 0,19	0,48 × 0,39 × 0,25
Aspecto del cristal	prismático, azul claro	prismático, azul oscuro	prismático, incoloro
λ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>
<i>a</i> (Å)	14,8078(8)	8,6399(9)	14,830(2)
<i>b</i> (Å)	8,6073(5)	11,9756(12)	8,5741(12)
<i>c</i> (Å)	17,5587(10)	19,1916(18)	17,618(2)
β (deg)	112,121(1)	90,352(1)	111,980(2)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	2073,2(2)	1985,7(3)	2077,4(5)
<i>Z</i>	2	2	2
Densidad (Calc., g cm <sup>-3</sup> )	1,535	1,551	1,543
<i>F</i> (000)	996	958	1000
Coef. absorción (mm <sup>-1</sup> )	0,680	0,764	0,802
Reflexiones únicas	23265	19150	10585
<i>R</i> <sub>int</sub>	0,0200	0,0519	0,0593
<i>R</i> <sub>1</sub> / <i>wR</i> <sub>2</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )] <sup>a</sup>	0,0354/0,1027	0,0479/0,0643	0,0524/0,1396
<i>R</i> <sub>1</sub> / <i>wR</i> <sub>2</sub> (todas las refl.) <sup>a</sup>	0,0387/0,1056	0,1265/0,1371	0,0751/0,1681
Bondad de ajuste en <i>F</i> <sup>2</sup> <sup>b</sup>	1,029	1,100	1,057

5

$$^a R_1 = [\sum (||F_o|| - |F_c|)] / \sum |F_o|; wR_2 = [\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]]^{1/2}$$

$$^b \text{Bondad de ajuste} = [\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p)]^{1/2}. -^d w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP]$$

$$\text{donde } P = (\max(F_o^2 \text{ ó } 0) + 2F_c^2) / 3.$$

- 10 La primera etapa de la descomposición térmica de los seis complejos aislados es su deshidratación. Los compuestos isoestructurales **1**, **2**, **3**, **4** y **6** muestran un comportamiento térmico similar y la deshidratación provoca un efecto bien definido de pérdida de masa en el diagrama TG. Este proceso aparece en el diagrama DSC como dos efectos endotérmicos, el primero corresponde a cinco moléculas de agua
- 15 (promedio de -40 kJ por mol de agua) y el segundo a una molécula de agua (promedio -60 kJ por mol de agua). Para el compuesto **5**, el proceso de deshidratación tiene lugar en dos etapas solapadas de pérdida de masa, y aparece en el diagrama DSC como un único efecto ancho y asimétrico centrado a 97°C y con una entalpía asociada de -32 kJ por mol de agua. Tras la deshidratación, se produce la descomposición
- 20 pirolítica de los aniones perclorato seguida por la pirólisis del componente orgánico en

el intervalo de temperatura 300-750°C. En el compuesto **5**, tiene lugar un efecto exotérmico inmediatamente antes de la descomposición de los aniones perclorato, lo cual se debe probablemente a un cambio estructural. La pirólisis completa de todos los compuestos conduce al correspondiente óxido metálico como residuo inorgánico.

5

### **Cristalografía de rayos X**

Recogida de datos: Difractómetro Bruker Smart Apex CCD diffractometer con radiación Mo-K $\alpha$  ( $\lambda= 0,71073$  Å), monocromador de grafito, barrido de  $\omega$  y  $\varphi$ ; recogida  
10 de datos con Apex2 (Data Collection Program for the CCD Area-Detector System; SAINT, Data Reduction and Frame Integration Program for the CCD Area-Detector System. Bruker Analytical X-ray Systems, Madison, Wisconsin, USA, 1997-2006), refinamiento de celdilla y reducción de datos con SAINT, corrección de absorción experimental con el software SADABS.

15

Análisis Estructural y Refinamiento: Las estructuras de **1-6** fueron resueltas mediante el método de átomo pesado y refinadas mediante mínimos cuadrados de matriz completa en  $F^2$ , a través del paquete de software SHELX-97. Excepto los átomos de hidrógeno, todos los átomos se refinaron anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno  
20 de las moléculas orgánicas fueron idealizados y aquellos de las moléculas de agua se localizaron en los mapas de Fourier y se refinaron con una distancia O-H restringida (0,82 Å). Los parámetros térmicos de todos los átomos de hidrógeno fueron fijados a 1,2 o 1,5 veces aquellos de sus átomos precedentes.

25 Los compuestos **1-6** han sido aislados como cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X de monocristal. Sus datos cristalográficos y de refinamiento se recogen en la Tabla 1 y 2. Con excepción del compuesto de cobre(II) (**5**), todos los compuestos son isoestructurales. Tal y como se observa en la Fig. 1, constan de una unidad mononuclear centrosimétrica, en la que el ión metálico se coordina a dos  
30 moléculas dmp y a cuatro moléculas de agua en una geometría octaédrica distorsionada. Previamente se habían obtenido complejos catiónicos similares con Co(II) y Cd(II) pero conteniendo nitrato como contraanión (K. Tagaki et. al Polyhedron 1992, 11, 2903-2912). Los dos ligandos dmp están coordinados al ión metálico a través del átomo de nitrógeno N3 y ambos ocupan las posiciones axiales del octaedro  
35 de coordinación con distancias de enlaces M-N3 que van desde 2,23 Å para **1** hasta 2,1 Å para **6**; estas distancias son similares a las descritas en bibliografía para otros

complejos con dntp.(J. M. Salas et al.Coord. Chem. Rev. 1999, 193-195, 1119-1142).

Por otra parte, la estructura cristalina de los cinco compuestos isoestructurales está también compuesta de dos moléculas dntp y dos moléculas de agua que interaccionan de forma no covalente con el complejo metálico y los aniones perclorato. Cada molécula dntp coordinada interacciona mediante fuerzas de  $\pi$ -stacking con una molécula dntp no coordinada, mientras que las moléculas de agua de cristalización y los aniones perclorato estabilizan la estructura cristalina a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares con las moléculas de agua coordinadas y los ligandos dntp.

La estructura del compuesto **5** consiste en una unidad mononuclear centrosimétrica, dos moléculas de agua de cristalización y dos aniones perclorato (Figura 1). En el complejo, el ión cobre presenta un entorno de coordinación ligeramente distorsionado en el cual cuatro moléculas dntp están coordinadas a través de su átomo N3 (distancia Cu-N3 = 2,040 Å), y dos moléculas de agua ocupan las posiciones axiales del octaedro. La formación de enlaces de hidrógeno implica a moléculas de agua coordinadas y no coordinadas, aniones perclorato y ligandos dntp. Un complejo similar de Cu(II) fue descrito anteriormente (T.L.F. Favre, et al., 1986, Polyhedron, 5(9), 1405-1411) pero que contiene como contraión hexafluorofosfato en lugar de perclorato.

## Ejemplo 2.- Ensayos Biológicos

### 2.1. Materiales y métodos.

#### Cepas de parásitos. cultivo

Las formas promastigote de *L. infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10) y *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) y las formas epimastigote de la cepa SN3 de *T. cruzi* (IRHOD/CO/2008/SN3), las cuales fueron aisladas de *Rhodnius prolixus* doméstica cuyo origen biológico es Guajira (Colombia), se cultivaron *in vitro* en medio líquido tripanosomal (MTL) con 10% suero bovino fetal inactivado y se mantuvieron en atmósfera de aire a 28 °C, en frascos Roux (Corning, USA) con area superficial de 75 cm<sup>2</sup>, según la metodología descrita por Gonzalez, P et al. J. Antimicrob. Agents. 2005, 25, 136-41.

### Cultivo celular y ensayos de citotoxicidad

Los macrófagos J774,2 (ECACC número 91051511) se obtuvieron originalmente de un tumor en una rata hembra BALB/c en 1968 y las células Vero (Flow) fueron cultivadas respectivamente en medio esencial mínimo (MEM) con glutamina (2 mM) y complementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado y RPMI (Gibco),  
5 complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, en atmósfera humidificada de aire 95% con 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C durante dos días. Los ensayos de citotoxicidad para macrófagos y células Vero se llevaron a cabo siguiendo la metodología de Marín et al., 2011, J. Nat. Prod., 74, 744–750.

10

Tras 72 h de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Para ello, se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de yoduro de propidio (100 mg/ml) y se incubó durante 10 min a 28 °C en la oscuridad. A continuación, se adicionaron 100 µl/pocillo de diacetato de fluoresceína (100 ng/ml) y se incubó bajo  
15 las mismas condiciones. Finalmente, las células se recuperaron por centrifugación a 400g durante 10 min y el precipitado se lavó con tampón fosfato salino. El análisis se realizó con un citómetro de flujo FACS Vantage™ (Becton Dickinson).

El porcentaje de viabilidad se calculó con respecto al cultivo control. El valor IC<sub>50</sub> se determinó mediante regresión lineal a partir de los valores K<sub>c</sub> de las concentraciones  
20 ensayadas.

### Ensayos de actividad *in vitro*

#### Formas promastigote y epimastigote (formas extracelulares)

Los compuestos obtenidos y los fármacos de referencia (Glucantime y Benznidazol) se disolvieron en DMSO (Panreac, Barcelona, Spain) a una concentración de 0,01%, a la cual DMSO no presenta toxicidad ni efectos inhibitorios sobre el crecimiento del  
25 parásito, según González et al. J. Antimicrob. Agents. 2005, 25, 136-41. Los compuestos se disolvieron en medio de cultivo a concentraciones de 100, 50, 25, 10 y  
30 1 µM. Los efectos de cada compuesto frente a promastigotes de *L. infantum* y *L. braziliensis* y epimastigotes de *T. cruzi* fueron evaluados tras 72 h utilizando una cámara hemocitométrica de Neubauer. El efecto antitripanosomático se expresa como IC<sub>50</sub>, i.e. la concentración requerida para producir un 50% de inhibición, calculada mediante regresión lineal a partir de los valores K<sub>c</sub> de las concentraciones ensayadas.

35

Ensayos amastigote (formas intracelulares)

Los macrófagos J774,2 y las células Vero se cultivaron respectivamente en medio esencial mínimo (MEM) con glutamina (2 mM) y complementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado, y RPMI (Gibco), complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado y se mantuvieron en atmósfera humidificada de aire 95% y 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las células se sembraron con una densidad de 1×10<sup>4</sup> células/pocillos en microplacas de 24-pocillos (Nunc) con cubremuestras redondos en el fondo y se incubaron durante 2 días. A continuación, las células se infectaron *in vitro* con formas promastigote de *L. infantum* y *L. braziliensis* (en la fase estacionaria) y con formas metacíclicas de *T. cruzi* (obtenidas según Osuna et al., 1990, Cell Differentiation and Development, 30, 89-95), en una proporción 10:1 durante 24 h. Los parásitos no fagocitados se eliminaron mediante lavado, y se adicionaron los productos (1, 10, 25, 50 y 100 µM). Los macrófagos y las células Vero con los fármacos se incubaron durante 72 h a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. La actividad del compuesto se determinó en base al número de amastigotes en cultivos tratados y no tratados en preparaciones fijadas en metanol y tintadas con Giemsa. El número de amastigotes se obtuvo mediante el análisis de 200 células huésped distribuidas en áreas microscópicas seleccionadas al azar. El efecto antitripanosomático se expresa como IC<sub>50</sub>.

Estudios de infección

Los macrófagos J774,2 y las células Vero fueron cultivados bajo las mismas condiciones descritas para los ensayos amastigote durante dos días. A continuación, las células se infectaron *in vitro* con formas promastigote de *L. infantum* y *L. braziliensis* y formas metacíclicas de *T. cruzi*, en una proporción de 10:1. Los productos (concentraciones IC<sub>25</sub>) se adicionaron inmediatamente después de la infección y se incubaron durante 12 h a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. Los parásitos no fagocitados y los productos se eliminaron por lavado, y los cultivos infectados se incubaron durante 10 días en medio fresco. Cada 48 h, se añadió medio de cultivo fresco. La actividad del producto se determinó a partir del porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada, y en el caso de *T. cruzi*, el número de tripomastigotes en el medio también se determinó (M. Sánchez-Moreno et al., 2011, J. Med. Chem., 54(4), 970-979) (en cultivos tratados y no tratados) en muestras fijadas con metanol y tintadas con Giemsa. El porcentaje de células infectadas y el número promedio de amastigotes por célula infectada se determinó mediante el análisis de 200 células huésped distribuidas en áreas microscópicas

seleccionadas al azar.

#### Estudios de actividad tripanocida *in vivo*

Grupos de tres grupos de tres ratones hembra BALB/c (6 - 8 semanas; 20–25 g) criados en condiciones estándar fueron infectados con  $1 \times 10^5$  formas metacíclicas de *T. cruzi* por vía intraperitoneal. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: (I) grupo 1: no infectados (no infectados y no tratados); (II) grupo 2: no tratados (infectados con *T. cruzi* pero no tratados); (III) grupo 3: no infectados (no infectados y tratados con 1 mg/kg peso/día, durante cinco días consecutivos [días 7 a 12 postinfección] vía intraperitoneal) (V. P. Sülsen et al., 2008, Antimicrob Agents Chemother., 52, 2415-2419) y (IV) grupo 4: tratados (infectados y tratados durante cinco días consecutivos [días 7 a 12 postinfección] con los compuestos de ensayo y benznidazol).

Los tratamientos comenzaron siete días después de la infección del animal. Los compuestos se administraron de forma similar a la descrita anteriormente y a las mismas concentraciones. Se sacó una muestra de sangre (5  $\mu$ l) de la vena mandibular de cada ratón tratado y se diluyó 1:15 (50  $\mu$ l de tampón citrato: ácido cítrico 0,1 M, citrato sódico 0,1 M y 20  $\mu$ l de tampón de lisis a pH7,2: Tris-Cl 2 M, MgCl<sub>2</sub>). Los parásitos se contaron por áreas con el objetivo de inmersión. Cada tres días se registró el número de formas *T. cruzi* en el torrente sanguíneo desde el día 7 al día 60 postinfección. El número de formas tripomastigote se expresó por 100 áreas microscópicas.

#### 2.2. Resultado y conclusiones

Con el objetivo de elucidar su potencial como fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por especies Trypanosomatidae, se evaluó la actividad tóxica de los complejos triazolopirimidínicos **1 - 6** frente a dos especies de *Leishmania* (*L. infantum* y *L. braziliensis*) y una cepa de *T. cruzi*.

La mayor parte de los estudios *in vitro* de la actividad biológica de nuevos compuestos frente a especies tripanosomátidas se desarrollan en formas extracelulares debido a su facilidad de manipulación. Sin embargo, dado que las formas extracelulares se desarrollan en el vector, las evaluaciones que se llevan a cabo con ellas son meramente indicativas del potencial tripanocida y leishmanicida de los compuestos en

el huésped vertebrado. En consecuencia, es necesario complementar un test preliminar con formas extracelulares promastigote y epimastigote con una posterior evaluación utilizando formas intracelulares (amastigotes) para lograr una evaluación más exacta de la actividad. Los ensayos intracelulares se llevaron a cabo infectando células macrófago con promastigotes de *L. infantum* y *L. braziliensis*, y células Vero con formas metacíclicas de *T. cruzi*. Estas formas infecciosas invaden las células mamíferas y se transforman en amastigotes al cabo de un día tras la infección. La inhibición se expresa como valores IC<sub>50</sub> después de 72 h de tratamiento con los compuestos. En las Tablas 3 a 6 se muestran los resultados de la inhibición causada por los compuestos estudiados en las formas epimastigote de *T. cruzi* y promastigote de *L. infantum* y *L. braziliensis*, y en las formas intracelulares amastigote de los tres tripanosomátidos. Se han incluido los valores de los fármacos de referencia Glucantime® y Benznidazol® se incluyen en todos los casos para comparar la actividad de los compuestos objeto de la presente invención.

15

**Tabla 3.** Actividad *in vitro* de los fármacos de referencia y los complejos metálicos 1-6 frente a las formas extracelulares (promastigotes y epimastigotes) de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.

Producto	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>			IC <sub>50</sub> macrófagos J774,2 (µM) <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> células Vero (µM) <sup>c</sup>
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>		
Benznidazol	-	-	15,8±1,1	-	13,5±0,9
Glucantime®	18,0±3,1	25,6±1,6	-	15,2±1,0	-
1	62,7±7,8	10,0±1,5	20,1±3,7	201,4±13,8	148,3±11,6
2	49,3±14,3	25,5±0,9	22,6±3,0	91,0±6,4	78,4±7,5
3	42,9±9,3	43,9±4,8	43,2±5,6	755,3±31,3	>1000
4	27,7±3,8	45,1±3,5	38,2±9,0	903,8±63,2	>1000
5	36,9±4,1	10,3±1,0	25,4±2,3	558,6±9,8	420,3±6,5
6	97,7±15,4	35,6±3,7	19,2±1,1	100,2±15,1	73,7±4,8

20

**Tabla 4.** Actividad *in vitro* de los fármacos de referencia y los complejos metálicos 1-6 frente a las formas extracelulares (promastigotes y epimastigotes) de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*

Producto	IS <sup>d</sup>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensi</i>	<i>T. cruzi</i>
Benznidazol	-	-	0,8
Glucantime®	0,8	0,6	-
1	3,2 (4)	20,1 (34)	7,4 (9)
2	1,8 (2)	3,6 (6)	3,5 (4)
3	17,6 (22)	17,2 (29)	23,1(29)
4	32,6 (41)	20,0 (33)	26,2 (33)
5	15,1 (19)	54,2 (90)	16,5 (21)
6	1,0 (1)	2,8 (5)	3,8 (5)

5

**Tabla 5.** Actividad *in vitro* de los fármacos de referencia, y los complejos metálicos 1-6 frente a las formas intracelulares (amastigotes) de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.

Producto	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>			IC <sub>50</sub> macrófagos J774,2 (µM) <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> células Vero (µM) <sup>c</sup>
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensi</i>	<i>T. cruzi</i>		
Benznidazole	-	-	23,3±4,6	-	13,5±0,9
Glucantime®	31,1±5,7	38,3±4,3	-	15,2±1,0	-
1	26,9±1,3	17,0±2,8	18,8±3,0	201,4±13,8	148,3±11,6
2	29,7±2,2	30,3±1,4	24,9±3,1	91,0±6,4	78,4±7,5
3	37,0±2,7	34,5±2,8	30,9±4,2	755,3±31,3	>1000
4	38,3±4,6	37,6±5,3	35,7±1,1	903,8±63,2	>1000
5	30,9±1,7	27,8±1,9	21,5±1,4	558,6±9,8	420,3±6,5
6	40,8±2,9	23,7±3,5	27,8±2,2	100,2±15,1	73,7±4,8

10

**Tabla 6.** Actividad *in vitro* de los fármacos de referencia, y los complejos metálicos 1-6 frente a las formas intracelulares (amastigotes) de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.

Producto	IS <sup>d</sup>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>
Benznidazole	-	-	0,8
Glucantime®	0,8	0,6	-
1	7,5 (9)	11,8 (20)	7,9 (10)
2	3,1 (4)	3,0 (5)	3,1 (4)
3	20,4 (25)	21,8 (36)	32,4 (40)
4	23,6 (29)	24,0 (40)	28,0 (35)
5	18,0 (22)	20,1 (33)	19,5 (24)
6	2,4 (3)	4,2 (7)	2,6 (3)

5

<sup>a</sup> En células Vero después de 72 h de cultivo. IC<sub>50</sub> = concentración necesaria para causar una inhibición del 50%, calculada por regresión lineal a partir de los valores K<sub>C</sub> de las concentraciones ensayadas (1, 10, 25, 50 y 100 µM).

<sup>b,c</sup> Frente a macrófagos J774,2 y células Vero después de 72 h de cultivo.

10 <sup>d</sup> Índice de selectividad = IC<sub>50</sub> macrófagos J774,2 ó células Vero / IC<sub>50</sub> formas intracelulares del parásito. Entre paréntesis: Número de veces que el IS del compuesto ensayado es superior al del fármaco de referencia.

Note: Promedio de tres determinaciones independientes.

15 Asimismo se determinaron los valores de toxicidad frente a macrófagos de mamífero J774,2 y células Vero tras 72 h de tratamiento con los compuestos, y los índices de selectividad (IS, IC<sub>50</sub> toxicidad frente a macrófagos y/o células Vero / IC<sub>50</sub> actividad frente a las formas extra- e intracelulares de ambos parásitos) se indican en las Tablas 3 a 6. El número de veces que el IS del compuesto excede al IS del Glucantime® o  
20 del Benznidazol se expresa entre paréntesis. Este valor es representativo de la potencial eficacia *in vitro* de los compuestos ensayados en comparación con los fármacos de referencia.

25 Los compuestos 3, 4 y 5 mostraron la mayor actividad frente a *L. infantum* y la mayor actividad leishmanicida frente las formas extra- e intracelulares (Tablas 3 a 6). Los datos de toxicidad son más notables aún, ya que los seis compuestos estudiados resultaron ser mucho menos tóxicos frente a los macrófagos que el fármaco de referencia. Los compuestos 3, 4 y 5 fueron 50, 59 y 37 veces menos tóxicos que

Glucantime®, respectivamente. Con estos compuestos se observaron también los mayores valores IS. El IS del compuesto **3** fue 22 veces mayor que el de los fármacos de referencia (forma extracelular) y 25 veces (forma intracelular), el ID del compuesto **4** fue 41 veces mayor (forma extracelular) y 29 veces (forma intracelular) y el IS del compuesto **5** fue 19 veces mayor (forma extracelular) y 22 veces (forma intracelular).

Se pueden extraer conclusiones similares a partir de los resultados para *L. braziliensis* (Tablas 3 a 6). Los compuestos **3**, **4** y **5** de nuevo mostraron los valores IS más altos en los dos ensayos, los cuales superan a los de los fármacos de referencia en 28 y 36 veces, en el caso del compuesto **3**; 33 y 40 veces en el caso del compuesto **4**; y 90 y 33 veces en el caso del compuesto **5** (para las formas extracelulares e intracelulares respectivamente). Además, los datos de ambas tablas muestran que el compuesto **1** es activo para las formas extra- e intracelulares de *L. braziliensis* (34 y 20 veces, respectivamente), pero no hacia *L. infantum* y *T. cruzi*.

En la tercera columna de la Tabla 3 se indican los valores IC<sub>50</sub> de los compuestos frente a las formas epimastigote de *T. cruzi*, junto con los resultados del fármaco de referencia Benznidazol. También se incluyen los valores de toxicidad frente a células Vero tras 72 h de cultivo y los valores IS se indican en la última columna de la Tabla 4. Se puede observar que los compuestos **3**, **4** y **5** son una vez más los más activos, no solo frente a las formas extracelulares sino también frente a las formas intracelulares (Tabla 5, tercera columna). Además, estos compuestos fueron bastante más activos que Benznidazol frente a las formas extracelulares e intracelulares del parásito.

Los tres complejos metálicos (**3**, **4** y **5**) fueron también sustancialmente menos tóxicos para las células Vero que el fármaco de referencia (IC<sub>50</sub> ≥ 1000 μM para los compuestos **3** y **4** y 420,3 μM para el compuesto **5** frente a 13,6 μM para Benznidazol). Los valores IS indican que estos compuestos fueron de nuevo los más prometedores, con valores IS 29, 33 y 21 veces mayores (formas extracelulares) y 40, 35- y 24 veces (formas intracelulares) mayores que aquellos para Benznidazol.

Varios autores han destacado que los valores IS deberían ser más de 20 veces superiores al valor IS del fármaco de referencia para que se considere que un compuesto posee propiedades tripanocidas. Este requisito se cumple para los compuestos **3**, **4** y **5** frente a todos los parásitos estudiados, y para el compuesto **1** en

el caso de *L. braziliensis*. Por tanto, estos compuestos se seleccionaron para estudios posteriores.

Los estudios de actividad se ampliaron para determinar el efecto de los compuestos sobre la tasa de infección y la replicación intracelular de las formas amastigotes. Macrófagos J774,2 y células Vero fueron infectados con promastigotes en la fase estacionaria de *L. infantum* y *L. braziliensis* y formas metacíclicas de *T. cruzi*. El experimento control mostró que los parásitos invadieron las células y sufrieron una transformación morfológica a amastigotes después de un día tras la infección y en el día 10, la tasa de infección de célula huésped alcanzó su máximo. Para los ensayos, se utilizó el valor IC<sub>25</sub> de cada producto como dosis de ensayo, con Glucantime y Benznidazole como fármacos de referencia.

Como se observa en la figura 2A, cuando se adicionaron los compuestos 3, 4 y 5 a los macrófagos infectados con promastigotes de *L. infantum*, la tasa de infección disminuyó significativamente en relación al control para los tres compuestos ensayados. La infección tras el tratamiento (Fig. 2A) sigue el orden 4 > 3 > 5, decreciendo en un 88%, 83% y 77% respectivamente. Estos valores son significativamente mayores a la inhibición producida por Glucantime (64%). Asimismo, los tres compuestos inhibieron la replicación amastigote *in vitro* de *L. infantum* en macrófagos de una forma similar a la inhibición de la tasa de infección descrita previamente. Los compuestos fueron de nuevo más efectivos que el fármaco de referencia 10 días después del tratamiento (Fig. 2B).

Se llevó a cabo el mismo experimento con *L. braziliensis*, y los resultados de la tasa de infección y el número de amastigotes se muestran en las figuras 3A y 3B, respectivamente. En ambos casos, los tres compuestos fueron más eficaces que Glucantime. Los datos de tasa de infectividad calculados a partir de la figura 3A mostraron que una eficacia 3 (88%) > 4 (86%) > 5 (80%) > 1 (71%) > Glucantime (51%), y la disminución en el número de amastigotes fue 4 (73%) > 3 (68%) > 5 (60%) > 1 (33%) > Glucantime (29%).

Los resultados correspondientes a la proliferación de *T. cruzi* en células Vero para los compuestos triazolopirimidínicos 3, 4 y 5 se recogen en la Fig. 4. Haciendo uso del mismo método empleado para las especies *Leishmania*, se utilizó el IC<sub>25</sub> de cada

producto como dosis de ensayo y se empleó Benznidazol como fármaco de referencia.

5 Cuando las células se incubaron durante dos días y luego se infectaron con formas metacíclicas, los parásitos invadieron las células y experimentaron una transformación morfológica a amastigotes un día después de la infección. En el día 10, la tasa de infección de la célula huésped alcanzó su máximo. Cuando se adicionaron los compuestos **3**, **4** y **5** (concentración IC<sub>25</sub>) a las células Vero infectadas con formas metacíclicas de *T. cruzi*, la tasa de infección disminuyó significativamente en relación al control, alcanzando 89 % (**4**), 83% (**3**) y 81% (**5**) en el día 10 del experimento (Fig. 4A). La disminución en la tasa de infección que mostraron estos compuestos fue sustancialmente superior a la de Benznidazol (35%). Estos tres compuestos inhibieron la replicación amastigote en células Vero. La adición de una concentración equivalente al IC<sub>25</sub> de estos compuestos redujo significativamente el número de amastigotes por 10 célula infectada en el día 10, alcanzando una reducción del 79% para el compuesto **4**; 67% para el compuesto **3** y 50% para el compuesto **5** en relación al experimento control. Estos resultados son notables si los comparamos con los obtenidos con Benznidazol, que causó una reducción de tan solo 30% en el número de amastigotes. Tras la replicación intracelular amastigote, los amastigotes se transforman en 15 tripomastigotes, los cuales salen de la célula y pasan a la circulación. Los parásitos circulantes pueden entonces invadir nuevas células para iniciar nuevos ciclos de replicación y están disponibles para infectar vectores que se alimentan del huésped (C. Bern, 2011, N. Engl. J. Med., 364, 2527–2534). Por tanto, nosotros medimos la variación en el número de tripomastigotes en el medio de cultivo (Fig. 4C). El 20 experimento control tenía un número de promastigotes de  $5,19 \times 10^3$  en el día 10, y se observó una reducción del 83%, 75% y 50% para los compuestos **4**, **3** y **5**, respectivamente. Estas tasas de reducción fueron más significativas que para Benznidazol (31%).

30 Posteriormente se estudió la actividad *in vivo* en ratones de los complejos metálicos triazolopirimidínicos **3**, **4** y **5**. Se evaluó la actividad frente a la etapa de infección aguda, considerada como los primeros 60 días post-infección. Por tanto, optamos por la ruta intra-peritoneal (ip) con dosis diarias de 2 mg/kg durante cinco días, lo cual no provocó la muerte de ningún animal. Ratones hembra Swiss fueron inoculados intra- 35 peritonealmente con  $1 \times 10^5$  tripomastigotes metacíclicos y el tratamiento comenzó

siete días después de la infección por ruta ip con 2 mg/kg/día de cada compuesto durante cinco días.

La administración se efectuó con una solución salina. Se incluyó un grupo control  
5 tratado de la misma manera con solo el vehículo. Durante el estudio de la fase aguda  
de actividad, se determinó el nivel de parasitemia cada tres días (Fig. 5). Ninguno de  
los animales tratados tanto con el control como con los tres compuestos murió durante  
el tratamiento, mientras que la supervivencia de los ratones tratados con Benznidazol  
fue del 80% (datos no mostrados). Una comparación de los datos representados en la  
10 figura 5 mostró que en relación a los ratones control, los tres compuestos ensayados  
fueron capaces de disminuir el número de tripomastigotes en el día de máxima carga  
parasitaria (días 22–26 post-infección). En el día 60 post-infección, se observó una  
reducción de parasitemia 4 > 3 > 5, con respecto al control.

15 Por tanto, podemos decir que los complejos metálicos triazolopirimidínicos 3-5  
presentaron actividad frente a *T. cruzi*, *L. infantum* y *L. braziliensis* y muestran una  
actividad mayor que el ligando dntp libre.

20

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un complejo metálico que comprende:
  - a. un metal de transición;
  - 5        b. al menos cuatro ligandos coordinados covalentemente con el metal de transición, donde los ligandos se seleccionan de la lista que consiste en 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina y H<sub>2</sub>O y donde al menos un ligando es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina; y
  - c. un contraión,
- 10        o cualquiera de sus estructuras cristalinas, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad parasitaria.
  
2. Uso según la reivindicación anterior, donde el complejo comprende seis ligandos.
  
- 15        3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos dos o cuatro ligandos son 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.
  
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el metal es un ión metálico divalente.
- 20
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el metal de transición se selecciona de la lista que comprende Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn.
  
6. Uso según cualquier de las reivindicaciones anteriores, donde el contraión se selecciona de la lista que comprende ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, I<sub>3</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y BF<sub>4</sub><sup>-</sup>.
- 25
7. Uso según la reivindicación anterior, donde el contraión es ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.
  
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el complejo es de fórmula [M(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub> o de fórmula [M(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (X)<sub>2</sub>; donde M es un metal de transición, X es un contraión y dntp es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.
- 30
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el complejo es de fórmula cristalina [M(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O o [M(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (X)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O; donde M es un metal de transición, X es un contraión y dntp es 5,7-
- 35

dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el complejo se selecciona de entre:

- 5 [Mn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O;  
 [Fe(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O;  
 [Co(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O;  
 [Ni(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O;  
 [Zn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub> •2(dntp) •2H<sub>2</sub>O; y  
 10 [Cu(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (X)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O;

donde: X es un contraión y dntp es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.

11. Uso según la reivindicación anterior donde el complejo se selecciona de entre:

- 15 [Mn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
 [Fe(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
 [Co(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
 [Ni(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp)•2H<sub>2</sub>O;  
 [Zn(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2(dntp) •2H<sub>2</sub>O; y  
 [Cu(dntp)<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O,

20 donde: dntp es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad parasitaria es una enfermedad parasitaria protozoaria.

25 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es causada por parásitos que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*,

14. Uso según la reivindicación anterior, donde los parásitos pertenecen al género *Leishmania* o *Trypanosoma*.

30

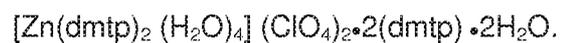
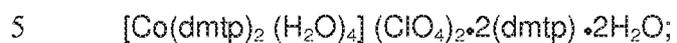
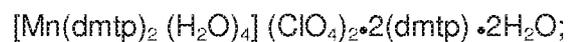
15. Uso según la reivindicación anterior, donde los parásitos pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* o *Leishmania braziliensis*.

16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es leishmaniasis o tripanosomiasis.

35

17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la tripanosomiasis es la enfermedad de Chagas.
- 5 18. Composición farmacéutica que comprende al menos un complejo metálico que a su vez comprende:
- a. un metal de transición seleccionado entre Mn, Fe, Co, Ni, y Zn,
  - b. al menos cuatro ligandos coordinados covalentemente con el metal de transición, donde los ligandos se seleccionan de la lista que consiste en 5,7-  
10 dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina y H<sub>2</sub>O y donde al menos un ligando es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina; y
  - c. un contraión;
- o cualquiera de sus estructuras cristalinas;  
con la condición de que el contraión es diferente a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ó I<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- 15 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Composición farmacéutica según reivindicación anterior donde el metal es un metal divalente.
- 20 20. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, donde el contraión del complejo metálico es ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.
21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde el complejo comprende seis ligandos coordinados al metal.
- 25 22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizada porque el complejo metálico tiene fórmula [M(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub>; donde M es un metal de transición, X es un contraión y dntp es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.
- 30 23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizada porque el complejo metálico es de fórmula cristalina [M(dntp)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (X)<sub>2</sub> • 2(dntp) • 2H<sub>2</sub>O; donde M es un metal de transición, X es un contraión y dntp es 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina.
- 35

24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, donde el complejo metálico se selecciona de entre



25. Composición farmacéutica que comprende al menos un complejo metálico de  
10 fórmula [Cu(dntp)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O.

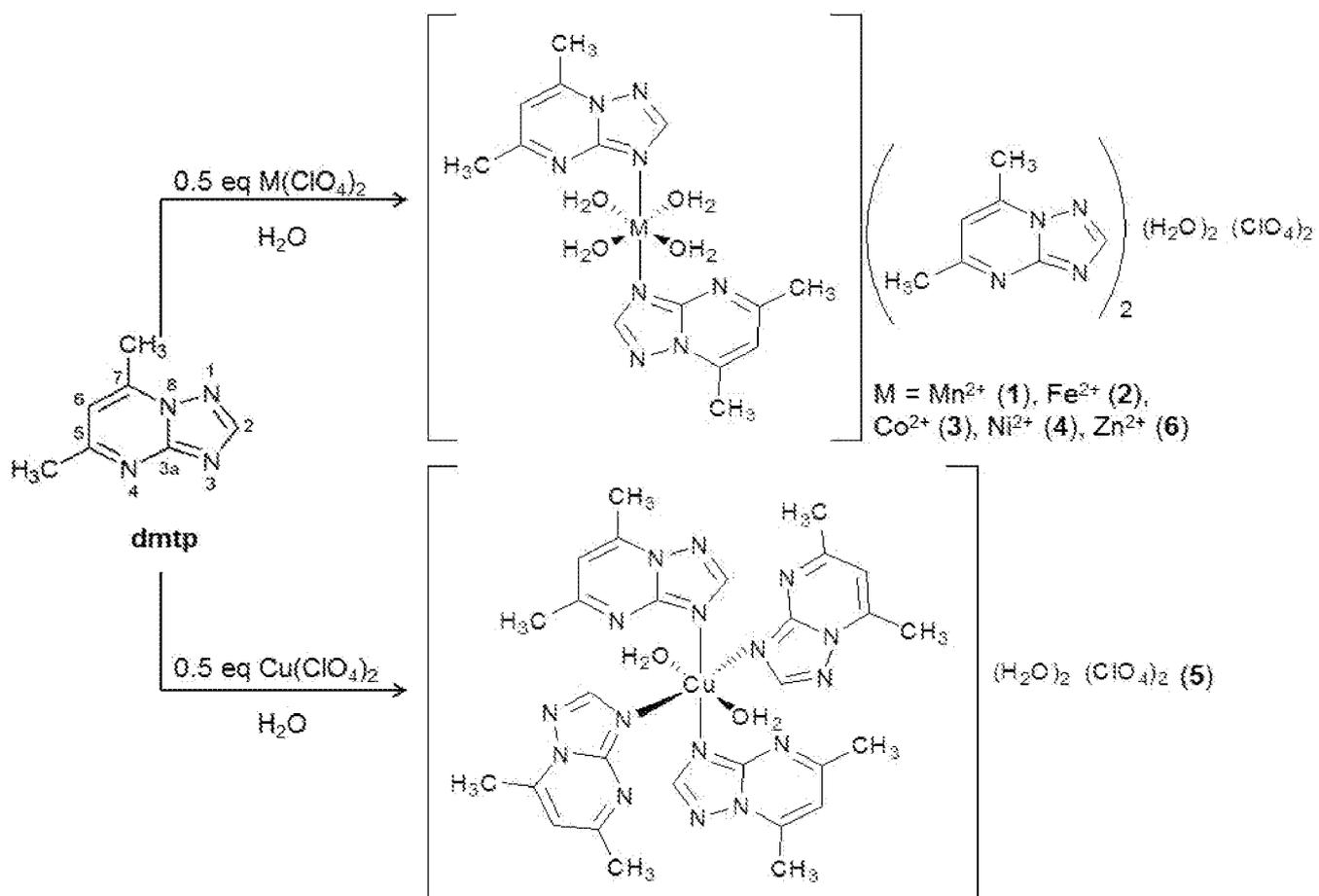


Fig. 1

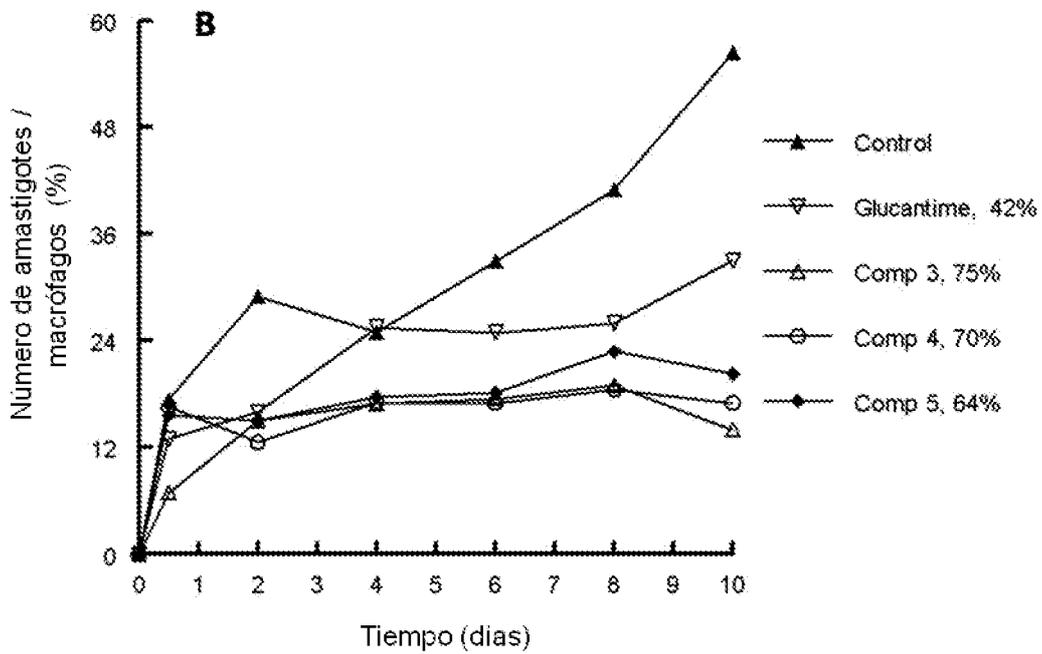
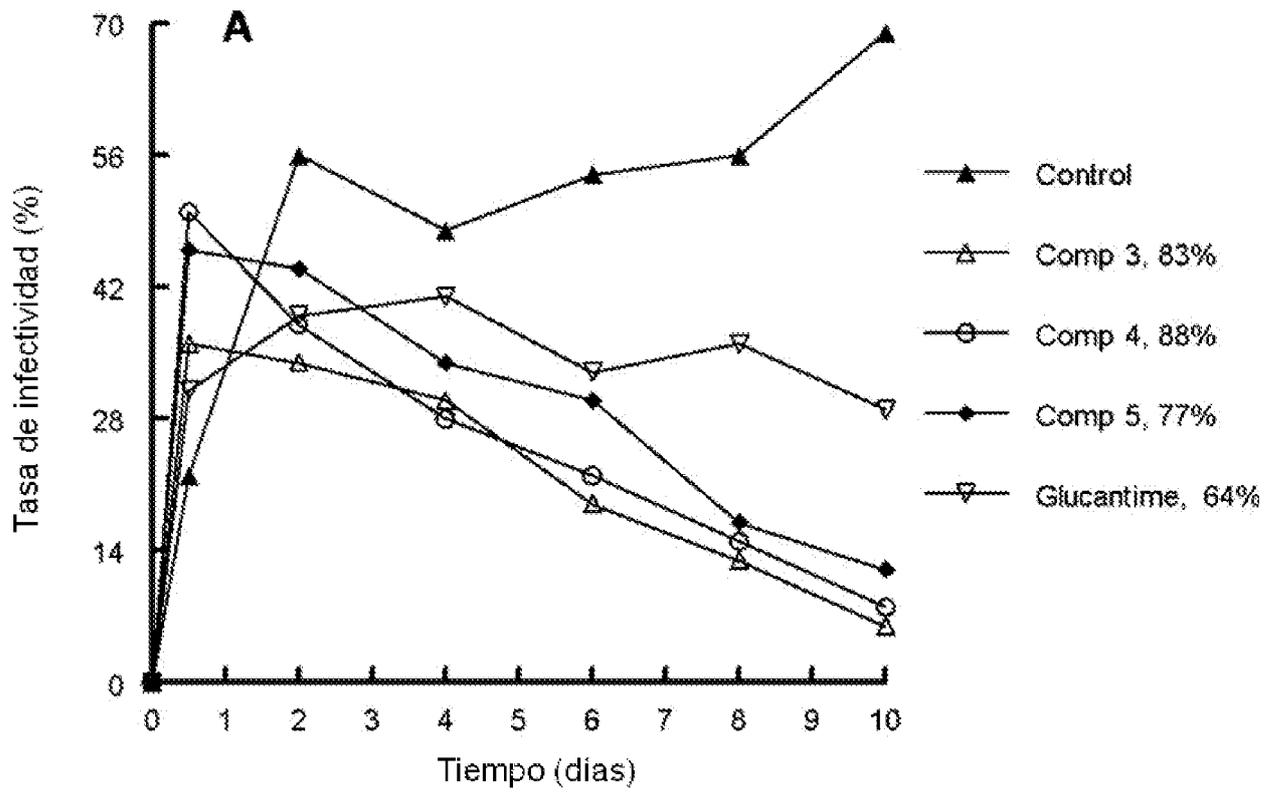


Figura 2

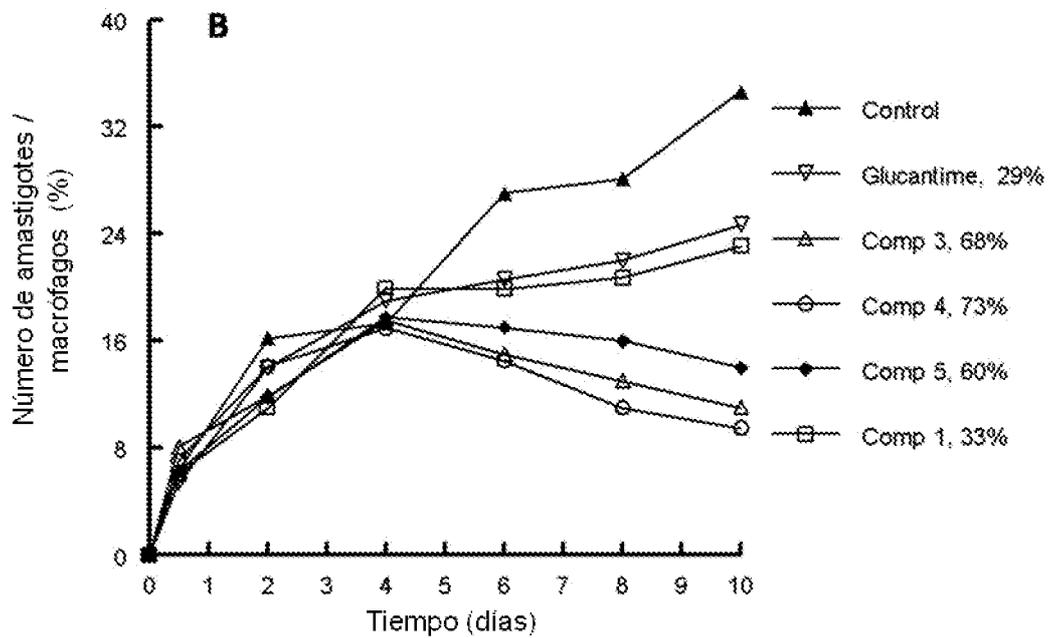
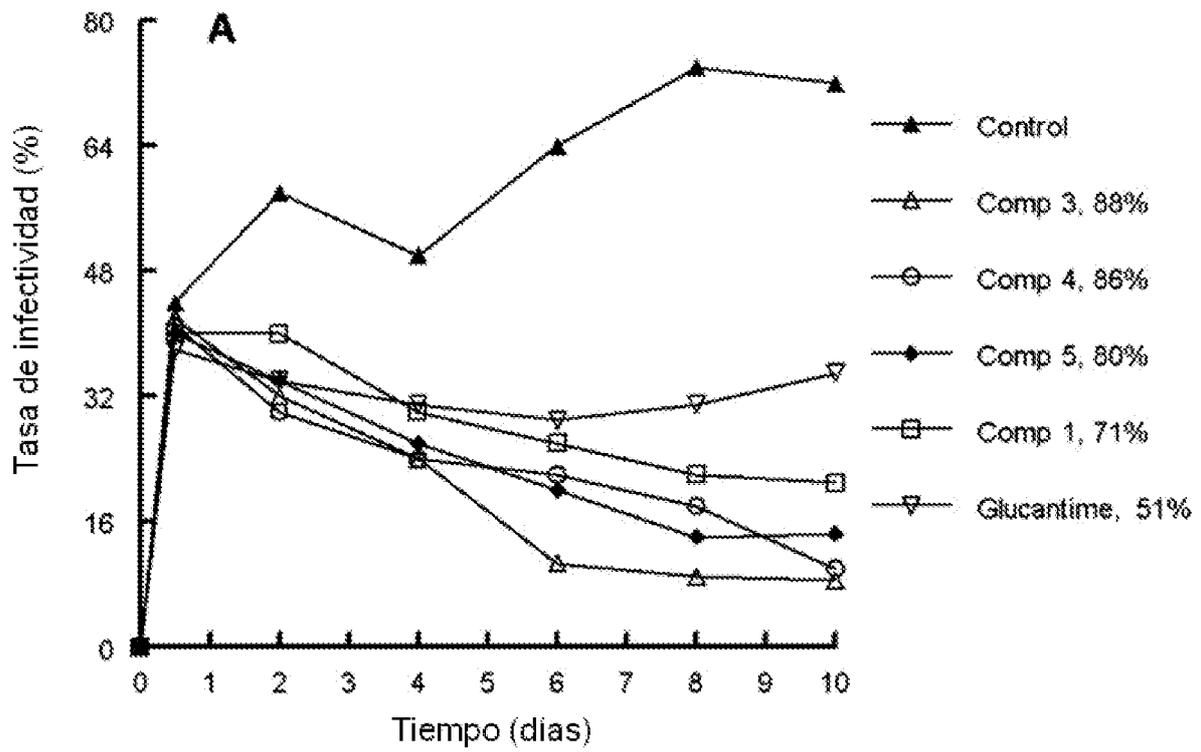


Figura 3

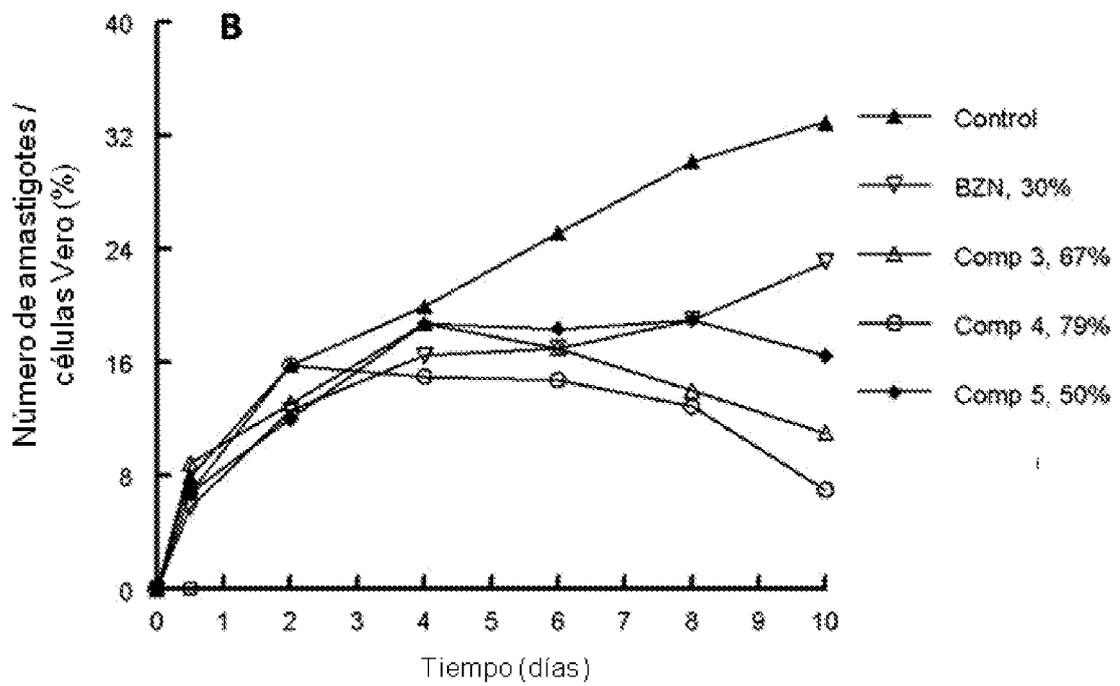
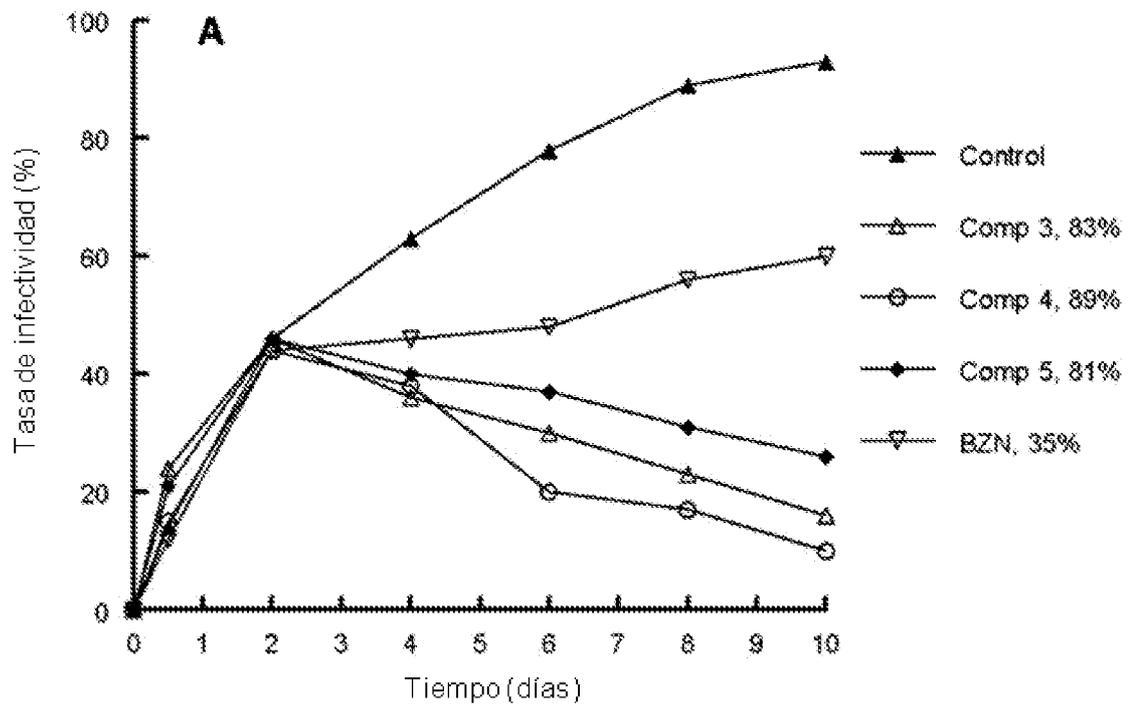


Figura 4 (cont.)

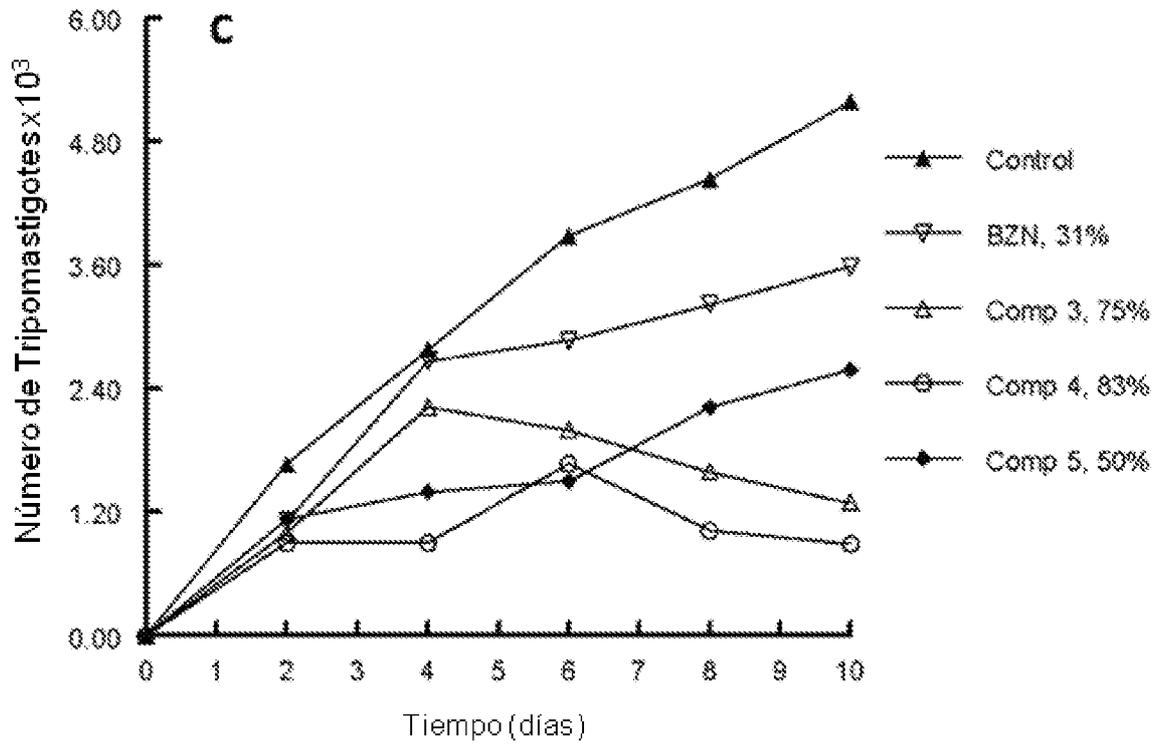


Figura 4

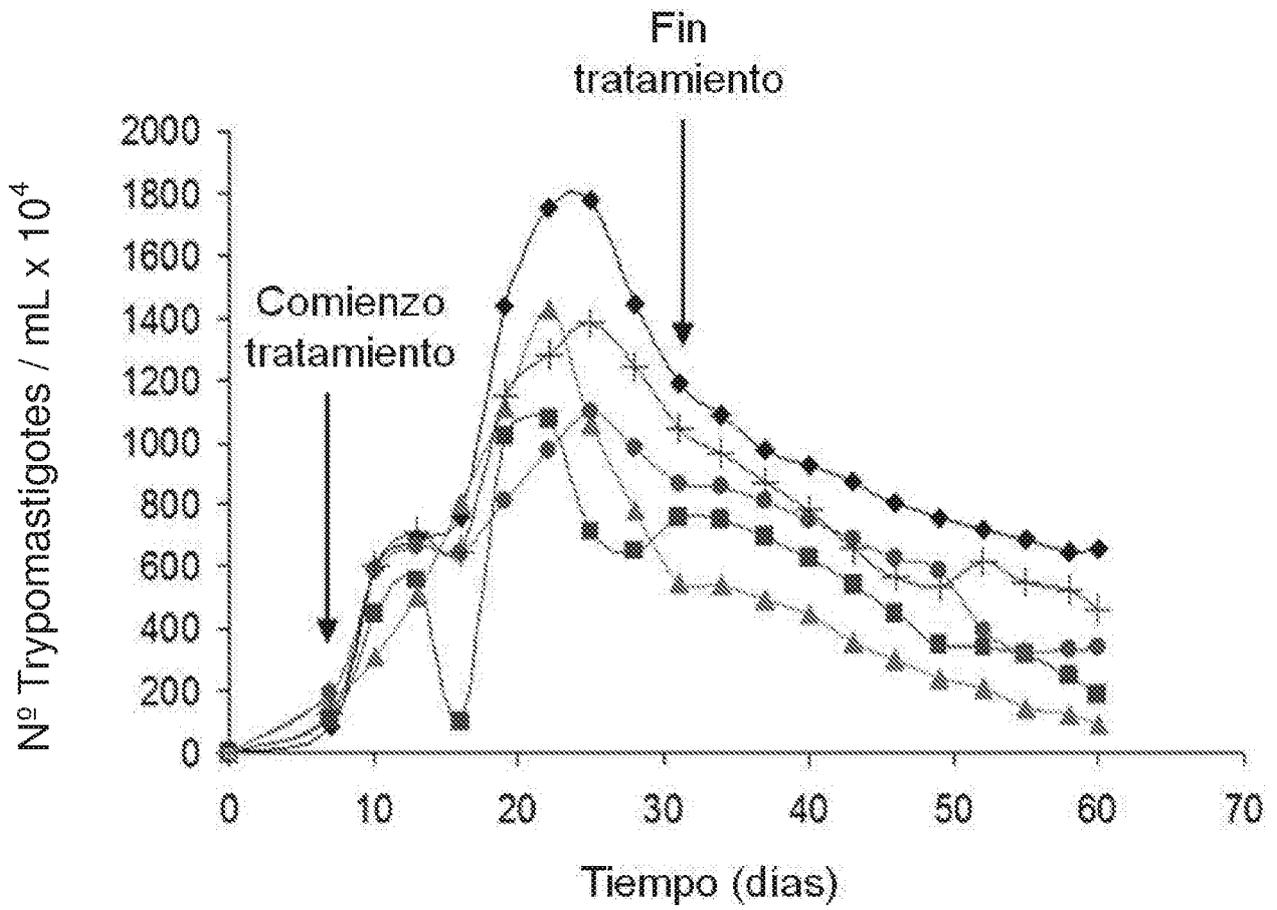


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201331704

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.11.2013

②③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	S BOUTALEB-CHARKI et al., Drug Metabolism Letters 2009, vol 3, págs 35-44. "Copper (II) complexes of 1,2,4-triazolo-(1,5-a)pyrimidine derivatives as potential antiparasitic agents", todo el documento.	1-17,26
X	T FAVRE et al., Polyhedron 1986, vol 5, nº 9, págs. 1405-1411. "Characterization of Cu(II) coordination compounds of 5,7-dimethyl(1,2,4)triazolo-(1,5-a)pyrimidine", resumen, parte experimental.	18-21,25
X	J M SALAS et al., Polyhedron 1992, vol 11, nº 22, págs 2903-2912. "Synthesis of metal complexes of 5,7-dimethyl(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyrimidine. Structure of the Co(II) and Cd(II) complexes", página 2904, resumen.	22-25
A	A B CABALLERO et al., Journal Inorganic Biochemistry 2011, 105, págs 770-776. "In vitro and in vivo antiparasital activity against Trypanosoma cruzi of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo(1,5-a)pyrimidin-7(4H)-one-based complexes".	1-26

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
16.12.2013

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07F1/08** (2006.01)  
**C07F15/02** (2006.01)  
**C07F15/04** (2006.01)  
**C07F15/06** (2006.01)  
**A61K31/555** (2006.01)

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

C07F, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, ESPACENET, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.12.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17,26	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 18-25	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17,26	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 18-25	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	S BOUTALEB-CHARKI et al., Drug Metabolism Letters 2009, vol 3, págs 35-44. "Copper (II) complexes of 1,2,4-triazolo-(1,5-a)pyrimidine derivatives as potential antiparasitic agents", todo el documento.	2009
D02	T FAVRE et al., Polyhedron 1986, vol 5, nº 9, págs 1405-1411. "Characterization of Cu(II) coordination compounds of 5,7-dimethyl(1,2,4)triazolo-(1,5-a)pyrimidine", resumen, parte experimental.	1986
D03	J M SALAS et al., Polyhedron 1992, vol 11, nº 22, págs 2903-2912. "Synthesis of metal complexes of 5,7-dimethyl(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyrimidine. Structure of the Co(II) and Cd(II) complexes", página 2904, resumen.	1992

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere al uso (reivindicación 1) de complejos metálicos que comprenden un metal de transición, un contraión y seis ligandos coordinados covalentemente que se seleccionan entre 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dmtp) y H<sub>2</sub>O, para la elaboración de una composición farmacéutica antiparasitaria. En estos complejos metálicos el metal de transición se selecciona entre Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn, el contraión es preferentemente ClO<sub>4</sub> entre otros y dos o cuatro ligandos son dmtp (reivindicaciones 2-11) y la enfermedad parasitaria es leishmaniasis o tripanosomiasis (reivindicaciones 12-17). En las reivindicaciones 18-25 se reivindican varios de estos complejos metálicos con la condición de que el contraión es distinto de NO<sub>3</sub>, I ó I<sub>3</sub> y la composición farmacéutica que comprende uno de estos complejos (reivindicación 26).

El documento D1 divulga la actividad antiparasitaria frente a Leishmania y Trypanosoma de complejos de Cu(II) con dmtp ó tp como ligandos, ver todo el documento y en particular página 36. Los complejos con actividad antiparasitaria que se divulgan en D1 son complejos de coordinación de Cu(II), tp ó dmtp, H<sub>2</sub>O y etiléndiamina o fenantrolina como ligandos, es decir los compuestos divulgados en D1 se diferencian de los de la solicitud, ya que sólo incorporan dmtp y H<sub>2</sub>O como ligandos, luego su uso farmacéutico se considera nuevo.

El documento D2 divulga complejos de coordinación de Cu(II) con cuatro ligandos dmtp y dos ligandos H<sub>2</sub>O en los que el contraión es diferente de NO<sub>3</sub>, I ó I<sub>3</sub> (ver página 1406 de D2), luego D2 anula la novedad de las reivindicaciones 18-21 y 25 de la solicitud, puesto que se divulga el complejo Cu(dmtp)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> (PF6)<sub>2</sub>, ver parte experimental de D2.

El documento D3 (ver resumen y página 2904) divulga complejos de cobalto(II) de fórmula M(dmtp)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>, siendo el contraión NO<sub>3</sub>, es decir D3 anula la novedad de las reivindicaciones 22-24 de la solicitud. Además no puede considerarse inventivo utilizar uno u otro contraión divalente de los divulgados en D2 y D3 puesto que un técnico en la materia podría elegir indistintamente uno u otro contraión del estado de la técnica sin realizar un esfuerzo inventivo.

Se concluye que las reivindicaciones 1-17 y 26 de la solicitud son nuevas e inventivas y las reivindicaciones 18-25 carecen de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.