

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 239**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/08** (2006.01)

**C01G 47/00** (2006.01)

**A61K 31/439** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2010 E 10816744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2492270**

54 Título: **Complejos metálicos miméticos de SOD**

30 Prioridad:

**21.09.2009 ES 200930712**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.05.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA (100.0%)  
Avda. Blasco Ibáñez 13  
46010 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA-ESPAÑA MONSONÍS, ENRIQUE;  
CLARES GARCÍA, M<sup>a</sup> PAZ;  
BLASCO LLOPIS, SALVADOR;  
SOTO SORIANO, CONCEPCIÓN;  
GONZÁLEZ GARCÍA, JORGE y  
VERDEJO VIU, BEGOÑA**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 569 239 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención comprende un procedimiento para sintetizar complejos metálicos, a partir de compuestos macrocíclicos poliazapiridinofanos, caracterizados por ser miméticos de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Además, la presente invención hace referencia a los propios compuestos macrocíclicos poliazapiridinofanos, a los complejos metálicos formados a partir de ellos y al uso de éstos en terapia para el tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en anomalías de la actividad o carencia de la SOD endógena, principalmente como antiinflamatorios, analgésicos y antioxidantes protectores del estrés oxidativo celular.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La reacción de dismutación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) en oxígeno y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), catalizada por la enzima SOD, convierte a dicha enzima en una importante defensa antioxidante para la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Así, la SOD protege a la célula de las reacciones dañinas del radical  $O_2^-$ . En humanos existen tres formas de SOD. SOD1 se encuentra en el citoplasma, en compartimentos nucleares y en el espacio intermembrana de la mitocondria. SOD2 se encuentra en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. La primera es un dímero (consiste en dos subunidades), mientras que las otras son tetrámeros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo.

20 La importancia fisiológica de la SOD es ilustrada por las severas patologías que se evidencian en ratones genéticamente modificados para que carezcan de esta enzima y por la reversión de dichas patologías cuando se aplica una SOD externa a los pacientes.

25 Las mutaciones en SOD1 se han relacionado con la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y su inactivación con el desarrollo de hepatocarcinomas [Elchuri, et al., S. (2005). *CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. Oncogene* 24: 367-380]. Además, los ratones sin SOD1 exhiben una acelerada pérdida de masa muscular relacionada con la edad [Muller, et al., F. L. (2006). *Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. Free Radic. Biol. Med* 40: 1993-2004], una temprana incidencia de cataratas y una esperanza de vida reducida.

30 En ratones, la inactivación de SOD2 provoca la muerte perinatal y su carencia provoca la muerte de los ratones a los pocos días de nacer por estrés oxidativo masivo [Li, et al., Y. (1995). *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat. Genet.* 11: 376-381].

35 Así, existen numerosas enfermedades relacionadas con la presencia del anión superóxido y la carencia o disfunción de la SOD endógena entre las que se encuentran, a modo de ejemplo, enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la osteoartritis, enfermedad de Chron, enfermedad de Parkinson, varios tipos de cáncer, enfermedad de Alzheimer, diabetes, fibrosis, psoriasis, asma, etc. [Maritim AC et al., (2003), *Diabetes. Oxidative stress and antioxidants: a review, J. Biochem. Mol. Toxicol*, 17: 24-38].

40 Por otro lado, la SOD es usada en productos cosméticos para reducir el daño de los radicales libres a la piel, por ejemplo, para reducir la fibrosis que se produce como consecuencia de la radioterapia. Se sabe que la SOD revierte la fibrosis [Vozenin-Brotans, MC. et al. (2001). *Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. Free Radic Biol Med.* 30 (1): 30-42. PMID 11134893] posiblemente a través de la reversión de los miofibroblastos de nuevo a fibroblastos. Además la SOD es usada para el tratamiento del dolor y de los efectos de la quimioterapia y la radiación [Lebovitz, et al. (1996) *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9782-9787], [Li et al (1995). *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat. Genet.* 11: 376-381], [Zelko et al (2002) *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. Free Radic. Biol. Med.* 33:337-349]; [Chen et al. (1998) *Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:2281-2289], [Keller, et al. (1998) *Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J. Neurosci.* 18:687-697]; [Flores et al. (1993) *Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:7632-7636]; [Westendorp et al (1995) *HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state, Embo. J.,* 14:546-554], [Yan (1999) *Altered levels of primary antioxidant enzymes in progeria skin fibroblasts, Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 257:163-167].

60 Los cambios en las constantes de equilibrio de protonación y la formación de complejos de  $Cu^{II}$  se han analizado y comparado con la poliamina no cíclica 232 y tres ciclofanos ( $\alpha$ -,  $m$ - y  $p$ -B232). La estabilidad de los complejos de  $Cu^{II}$  a través de los restos amina es distinta para cada ciclofano y, por lo tanto, su capacidad para formar complejos mononucleares y dinucleares y su comportamiento cinético también son distintos para cada compuesto. [Verdejo B et al.

(2008). Equilibrium and kinetics properties of Cull cyclophane complexes: The effect of changes in the macrocyclic cavity caused by changes in the substitution at the aromatic ring. *Eur. J. Inorg. Chem* 1497-1507].

5 Estudios cinéticos han demostrado que la descomposición y la formación de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ , ligandos macrocíclicos del tipo aza scorpionando L2 y L3, proporcionan información sobre sus reorganizaciones moleculares dependientes del pH. [Verdejo B et al. (2007). Hydrogen and copper iron-induced molecular reorganizations in scorpionand-like ligands. A potentiometric, mechanistic, and solid-state study. *Inorg. Chem* 46: 5707-19].

10 Estudios cinéticos de la formación de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  en soluciones ligeramente ácidas y de la descomposición de complejos promovida por ácido sugieren que el complejo de  $\text{Cu}^{2+}$ -ligando (L1) existe como una mezcla de dos especies con un distinto entorno de coordinación y una distinta geometría. [Algarra A et al. 2009. Geometric isomerism in pentacoordinate  $\text{Cu}^{2+}$  complexes: Equilibrium, kinetic and density functional theory studies reveal the existence of equilibrium between square pyramidal and trigonal bipyramidal forms for a tren-derived ligand. *Inorg. Chem* 48: 902-14].

15 Se ha descrito un método para formar una lámina de carbono en un dispositivo implantable, que incluye un agente bioactivo unido a la misma. La combinación de un agente bioactivo (por ejemplo, SODm, agente pegilado activo y/o heparina) y carbono puede abordar más de un factor que conduce a la hiperplasia neointimal o la trombosis subaguda y por lo tanto puede reducir la trombosis y reestenosis temprana o tardía. Por lo tanto, cuando el agente bioactivo se elimina por el cuerpo después de la implantación, la superficie de carbono por debajo todavía puede proporcionar un nivel alto de biocompatibilidad. [Ding N et al. 2007. Carbon coating on an implantable device. US20071298354A1].

20 El uso de fosfonatos aminoalquilinos, como DOTMP y PCTMP se ha descrito en el estado de la técnica para el uso en la inhibición de la resorción ósea y por lo tanto se podría utilizar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades óseas tales como osteoporosis. Un método para prevenir la pérdida de mineral óseo en mamíferos, que comprende administrar a un mamífero una cantidad de un fosfonato aminoalquilino es eficaz para prevenir o minimizar la pérdida de la densidad del material óseo. [Keith FR. 2004 Aminoalkylenephosphonates for treatment of bone disorders. US6794371 B1].

25 Antioxidantes de bajo peso molecular se pueden usar para tratar o prevenir las enfermedades microvasculares de la retina, el glomérulo renal o nervios periféricos, específicas de la diabetes. Además, antioxidantes de bajo peso molecular se pueden usar para tratar o prevenir la enfermedad macrovascular aterosclerótica acelerada que afecta a las arterias que suministran sangre al corazón, el cerebro y las extremidades inferiores. Un método para prevenir o tratar la diabetes utilizando antioxidantes de bajo peso molecular se ha descrito, así como los compuestos y composiciones adecuadas para el uso en tales métodos. [Piganelli JD et al. Oxidant scavengers for treatment of diabetes or induction of immune tolerance. US2008/085883A1].

30 Se ha descrito un método para modular los niveles de oxidantes intracelulares o extracelulares y así proteger el tejido sano de un paciente que padece cáncer de los efectos tóxicos asociados a la terapia génica, inmunoterapia, quimioterapia y/o terapia de radiación, mediante el uso de miméticos de SOD. Este método se podría usar para prevenir o tratar cáncer en un paciente que necesita tal tratamiento usando antioxidantes de bajo peso molecular. Los agentes adecuados para uso en tales métodos, incluyen porfirinas y tetrapirroles metino (es decir, meso) sustituidos. [Crapo JD et al. 2004. Medicament for protection in radiotherapy. EP1392328B1].

35 Se ha demostrado que algunos complejos de cobre de base de Schiff son capaces de imitar distintas proteínas. Basado en imitadores de la superóxido dismutasa de cobre-zinc y de monooxigenases y oxidasas que presentan sitios de dicobre, se ha podido elucidar los mecanismos de reacción. [Ferreira AM et al. (2000). Mimics of copper proteins: structural and functional aspects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, January 2000 p.51-8].

40 El estado de la técnica refleja que la SOD lleva a cabo importantes funciones en el organismo como, por ejemplo, protección frente al estrés oxidativo celular y frente a procesos inflamatorios o degenerativos. Cuando la actividad de la SOD falla, se produce un aumento del estrés oxidativo que conlleva al desarrollo de varios desórdenes o enfermedades en el cuerpo humano, como, por ejemplo: procesos inflamatorios, procesos cancerígenos o procesos degenerativos.

45 Por lo tanto, la síntesis de compuestos miméticos de la enzima SOD se antoja necesaria para poder suplir las posibles deficiencias en la actividad de la SOD endógena, o la carencia de la misma y, así, poder tratar las numerosas patologías o enfermedades arriba citadas, que presentan como etiología común la carencia o actividad deficiente de dicha enzima. Idealmente los compuestos miméticos sintetizados deberían presentar una toxicidad reducida y, además, ser capaces de llevar a cabo la reacción de dismutación a partir de la menor concentración de compuesto posible. La utilización de concentraciones o dosis menores de los miméticos de SOD reduciría el coste de los tratamientos, así como el riesgo asociado al desarrollo de efectos secundarios y al desencadenamiento de inmunogenicidad.

50 No se ha localizado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue de forma específica los complejos metálicos desarrollados en la presente invención.

65 Además, los complejos metálicos desarrollados en la presente invención solventan los problemas técnicos arriba expuestos porque presentan una toxicidad reducida, bajos valores del índice  $\text{IC}_{50}$  (ver ejemplos de la invención) y no

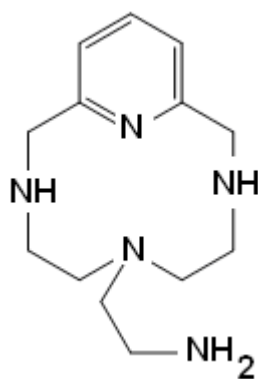
causan el desarrollo de inmunogenicidad. El bajo valor del índice  $IC_{50}$  de los complejos metálicos de la presente invención tiene importantes implicaciones debido a que cuanto menor sea dicho valor, menor será la cantidad de compuesto necesaria para causar el efecto mimético deseado. Por lo tanto, el uso de menor cantidad de complejo para conseguir la reacción de dismutación reducirá considerablemente los efectos secundarios.

Por otro lado, los complejos metálicos de la invención tienen una vida media elevada debido a su estabilidad en plasma y no presentan problemas de distribución en los tejidos tras su administración.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCÓN

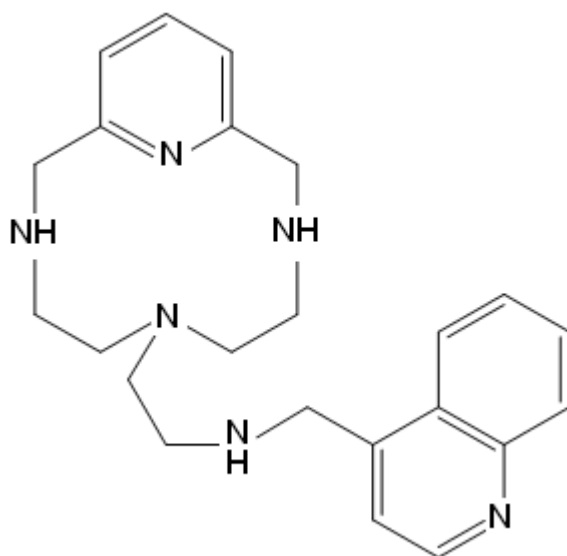
La presente invención comprende un procedimiento para sintetizar complejos metálicos miméticos de la SOD, a partir de compuestos intermediarios que son macrociclos poliazapiridinofanos con un heterociclo de quinolina unido a la estructura central de la molécula. Por lo tanto, dicho procedimiento comprende, como primer paso, la síntesis del compuesto intermediario de Fórmula 1 ó 2, utilizando como precursor el compuesto sintético de Fórmula 3, la posterior purificación del compuesto intermediario de Fórmula 1 ó 2 y, finalmente, la formación de complejos metálicos mediante la unión del compuesto de Fórmula 1 ó 2 purificado con los iones metálicos a través de sus átomos de nitrógeno. En la **Figura 1** se muestra esquemáticamente el modo en que el compuesto de Fórmula 1 forma un complejo de coordinación con un átomo de  $Mn^{2+}$ .

Los compuestos intermediarios formados en el primer paso del procedimiento de la invención, utilizando como precursor el compuesto sintético de Fórmula 3,

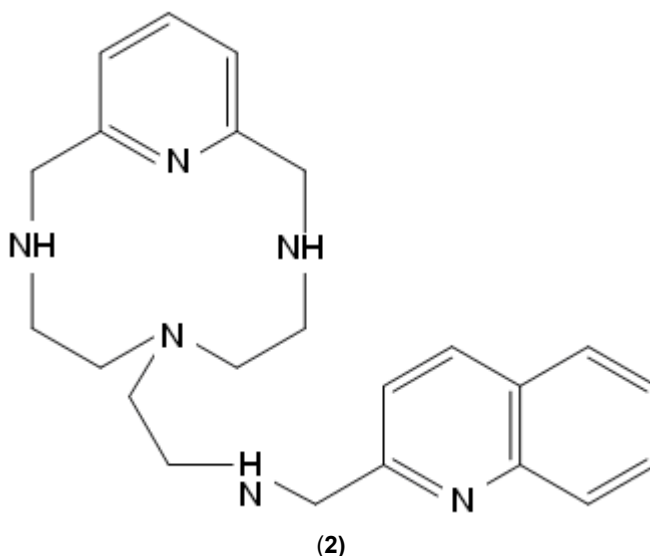


(3)

se caracterizan por la siguiente Fórmula 1, donde el heterociclo de quinolina está unido por la posición 4 al metileno que se une a la cadena etilamina o, alternativamente, se caracterizan por la siguiente Fórmula 2, donde el heterociclo de quinolina está unido por la posición 2 al metileno que se une a la cadena etilamina:



(1)



Los compuestos intermediarios **1** y **2** son isómeros caracterizados estructuralmente por ser triazapiridinofanos con una cadena etilamina sustituida en el nitrógeno terciario del ciclo y esta a su vez contiene un sustituyente metilquinolil unido a la amina. El triazapiridinofano es un compuesto cíclico que incluye un anillo de piridina y que contiene tres grupos amino(aza) en la cadena cíclica, y una cadena etilénica que acaba con un grupo amino(aza) como sustituyente del ciclo. La cadena etilamina contiene también un grupo metilquinolil como sustituyente del grupo amino. Como se ha mencionado, el sistema de quinolina puede estar unido en dos posiciones (2 ó 4) al metileno que se une a la cadena etilamina.

Dichos compuestos intermediarios pertenecen a una familia también conocida como escorpiandos (amina trisustituída, con tres cadenas etilamina) tipo piridinofano (dos de las cadenas forman ciclo con el anillo piridínico), la tercera cadena contiene diferentes sustituyentes aromáticos y/o etilenamínicos, unidos al grupo amino de la cadena.

Como se ha comentado anteriormente, una vez que los compuestos intermediarios de Fórmula **1** ó **2** son sintetizados, se procede a su aislamiento y purificación a través de lavados sucesivos con etanol o metanol. A continuación, los compuestos intermediarios de Fórmula **1** ó **2** se unen a iones metálicos (preferentemente Cu(II), Fe(II) y Mn(II)) para formar complejos metálicos miméticos de la enzima SOD. Dichos complejos pueden ser usados en terapia para el tratamiento de enfermedades, como por ejemplo las citadas en el estado de la técnica de la presente invención, cuya etiología se basa en anomalías de la actividad o carencia de la SOD endógena. A modo de ejemplo, los complejos miméticos de SOD de la presente invención son utilizados principalmente como antiinflamatorios, analgésicos y antioxidantes protectores del estrés oxidativo celular.

Es importante destacar que se han observado resultados de actividad particularmente relevantes (ver **Ejemplo 3**) para los complejos metálicos formados a partir del compuesto de Fórmula **1** y el anión Mn(II) (ver **Figura 1**).

En la presente invención se entiende por complejo metálico a cualquier asociación molecular de los compuestos intermediarios de Fórmula **1** ó **2** con cualquier ión metálico, preferentemente Cu(II), Fe(II) y Mn(II).

Por otro lado, en la presente invención se entiende por complejo mimético de la SOD a aquél complejo metálico capaz de imitar, suplir, y eventualmente mejorar, la actividad terapéutica y/o funciones de la enzima SOD endógena.

Además, en la presente invención se entiende por cantidad terapéuticamente eficaz a aquélla que hace revertir la enfermedad tratada o mejorar sus síntomas.

Los complejos metálicos descritos en la presente invención pueden utilizarse como principios activos en pacientes humanos o en animales pudiendo ser preparados en composiciones farmacéuticas, o formulaciones, y administrados, de acuerdo a los conocimientos existentes en el estado la técnica del desarrollo galénico, de distintas formas tales como: por inyección intradérmica o por vía oral mediante cápsulas, grageas o tabletas.

De igual forma, las formas sólidas se elaboran en presencia de los excipientes necesarios seleccionados del grupo que comprende pero no se limita a: manitol, polivinilpirrolidona, celulosa microcristalina, silicagel, talco, estearato magnésico, óxido de titanio, colorantes y antioxidantes.

Los complejos metálicos de la invención superan los problemas citados en el estado de la técnica al tener una toxicidad disminuida y bajos valores de IC<sub>50</sub>. El bajo valor del índice IC<sub>50</sub> de los complejos metálicos de la presente invención tiene importantes implicaciones debido a que cuanto menor sea dicho valor, menor será la cantidad de complejo necesaria

para causar el efecto mimético deseado. Por lo tanto, el uso de menor cantidad de complejo para conseguir la reacción de dismutación reducirá considerablemente los efectos secundarios.

5 Además, los complejos metálicos de la invención presentan alta estabilidad (Ejemplo 2, Tabla 2) y vida media, evitando los problemas de distribución en los tejidos tras su administración, así como el desarrollo de inmunogenicidad.

10 La metodología seguida para estudiar la capacidad catalítica de descomposición del anión superóxido de estos complejos metálicos en relación al enzima nativa, ha sido previamente descrita por Mccord y Fridovich [C. Beauchamp, I. Fridovich, *Analytical Biochemistry*, 1971, 44, 276] y ha sido optimizada para los complejos metálicos de Cu(II), Fe(II) y Mn(II).

15 Así, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de complejos metálicos miméticos de la enzima SOD que comprende la coordinación del metal por los nitrógenos de los compuestos de fórmula 1 ó 2.

En una realización preferida de la invención el procedimiento se caracteriza porque los iones metálicos que se unen al compuesto de Fórmula 1 ó 2 se seleccionan entre: Cu (II), Fe (II) y Mn (II).

20 En otra realización preferida de la invención, dicho procedimiento se caracteriza porque los compuestos intermediarios de fórmula 1 y 2 se sintetizan previamente mediante un proceso que comprende la reacción del compuesto de Fórmula 3 con el aldehído de 2 ó 4 quinolina disuelto en etanol, dependiendo respectivamente de si el compuesto intermediario a sintetizar es el compuesto de Fórmula 2 o el compuesto de Fórmula 1, y posteriormente la adición de borohidruro sódico para la reducción de la imina formada.

25 Otros aspectos de la presente invención hacen referencia a los propios compuestos intermediarios de Fórmula 1 ó 2, a su uso para la síntesis de complejos metálicos miméticos de la enzima SOD preferentemente con los iones Cu (II), Fe (II) o Mn (II), al propio complejo metálico que comprende el compuesto de Fórmula 1 ó 2 y al menos un ión metálico preferentemente Cu (II), Fe (II) o Mn (II) y al uso de dichos complejos metálicos como miméticos de la enzima SOD, para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en alteraciones de la actividad de la SOD endógena o, particularmente, como antiinflamatorio, analgésico o protector del estrés oxidativo celular.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1.** Esquema del modo en que el compuesto de Fórmula 1 forma un complejo de coordinación con un átomo de  $Mn^{2+}$ .

**Figura 2.** Estructura cristalográfica del complejo metálico formado a partir del compuesto intermediario de Fórmula 1.

**Figura 3.** Estructura cristalográfica del complejo metálico formado a partir del compuesto intermediario de Fórmula 2.

40 **Figura 4.** Esquema del método de reducción del NBT (azul de ditetrazolio).

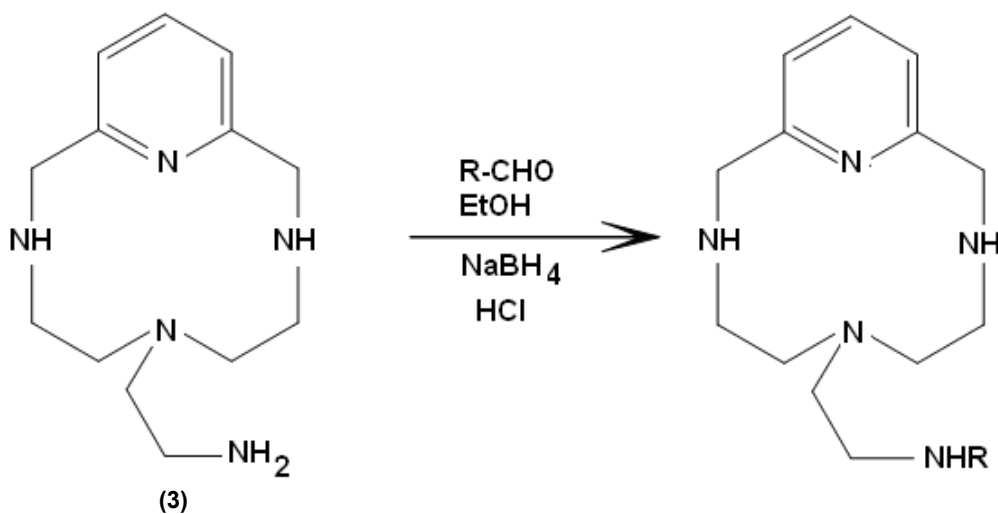
**Figura 5.** Formación de aniones superóxido a partir de Xantina / Xantina oxidada.

### EJEMPLOS

#### 45 **Ejemplo 1. Preparación de los compuestos intermediarios de Fórmula 1 y 2**

50 La síntesis de los compuestos intermediarios de Fórmula 1 y 2 se realizó a partir de la reacción del compuesto de Fórmula 3 (ver esquema I) con el aldehído de 2 quinolina (en el caso de que el compuesto intermediario a sintetizar sea el compuesto de Fórmula 2) o de 4 quinolina (en el caso de que el compuesto intermediario a sintetizar sea el compuesto de Fórmula 1), disueltos ambos en etanol. Posteriormente se añadió borohidruro sódico para la reducción de la imina formada. La mezcla se trata convenientemente para extraer el producto de reacción compuesto de Fórmula 1 ó 2, del que se prepara la sal amónica mediante adición de ácido clorhídrico.

55 El esquema del procedimiento de síntesis de los compuestos intermediarios de Fórmula 1 ó 2 es el siguiente:



5 Las sales de los compuestos **1** y **2** son sólidas y se purificaron a través de lavados sucesivos con etanol o metanol.

### Ejemplo 2. Caracterización de los compuestos intermedarios de Fórmula 1 y 2

10 Los compuestos intermedarios de Fórmula **1** y **2** fueron perfectamente caracterizados por espectroscopia de RMN, espectrometría de masas, análisis cristalográfico y a través de análisis elemental.

Se realizaron medidas potenciométricas para determinar el comportamiento como ácido-base de la nueva familia de compuestos, obteniéndose las constantes globales de protonación, necesarias para el estudio posterior de formación de complejos metálicos con Cu(II), Fe(II) y Mn(II).

15 La **Tabla 1** muestra los logaritmos de las constantes de protonación determinadas en NaClO<sub>4</sub> 0.15 mol·dm<sup>-3</sup> a 298.1 ± 0.1 K. Las cargas están omitidas. Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. <sup>a)</sup> La constante de basicidad global es  $\beta = \sum K_{HjL}$

20 **Tabla 1**

Reacción	Comp. 2	Comp. 1
L+H $\rightleftharpoons$ HL	10.03(1)	9.93(1)
HL+H $\rightleftharpoons$ H <sub>2</sub> L	8.40(1)	8.31(1)
H <sub>2</sub> L+H $\rightleftharpoons$ H <sub>3</sub> L	6.23(1)	5.94(1)
H <sub>3</sub> L+H $\rightleftharpoons$ H <sub>4</sub> L		2.82(1)
Log $\beta^a$	24.66(2)	27.00(1)

25 La **Tabla 2** muestra constantes de estabilidad para la formación de complejos metálicos con Mn<sup>2+</sup> determinadas en NaClO<sub>4</sub> 0.15 mol·dm<sup>-3</sup> a 298.1 ± 0.1 K. Las cargas están omitidas y los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. Esta tabla muestra las constantes de estabilidad para la formación de complejos metálicos de Mn(II). La estabilidad exhibida por los complejos formados por los compuestos de Fórmula 1 y 2, que viene reflejada por las constantes de formación de sus complejos ([Mn(II)-compuesto de Fórmula **1**]<sup>2+</sup> (log K = 8.91(1) y [Mn(II)-compuesto de Fórmula **2**]<sup>2+</sup> (log K = 11.08(1)), es suficiente para evitar la disociación de los complejos en plasma a pH próximo a la neutralidad. Por otra parte, los compuestos sólidos [Mn(II)- compuesto de Fórmula **1**-H<sub>2</sub>O](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y [Mn(II)- compuesto de Fórmula **2**](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> se obtuvieron evaporando lentamente durante varias semanas disoluciones acuosas de perclorato de Mn(II) y el clorhidrato del compuesto de Fórmulas **1** y **2** a pH neutro en las que no se tomó  
30 precaución alguna sobre la desoxigenación del disolvente. De hecho, la evaporación se realizó en matraces en contacto  
35

con el oxígeno atmosférico. Estas observaciones experimentales demuestran una gran estabilidad frente a la oxidación atmosférica y apoyan la mencionada estabilidad en plasma de los compuestos objeto de la invención.

5

Tabla 2

Reacción	Compuesto 2	Compuesto 1
$Mn+L \rightleftharpoons MnL$	11.08(1)	8.91(1)
$Mn+L+H \rightleftharpoons HMnL$	16.23(6)	
$Mn+L+H_2O \rightleftharpoons MnL(OH)+H^+$		-1.36(1)
$MnL+H \rightleftharpoons HMnL$	5.15(2)	
$MnL+OH \rightleftharpoons MnL(OH)$		3.45(1)

10 La **Tabla 3** muestra los datos cristalográficos obtenidos para los complejos metálicos formados a partir de los compuestos de Fórmula 1 y 2:

Tabla 3

	Compuesto 1	Compuesto 2
Fórmula	$C_{23}H_{32}MnN_6O_9Cl_2$	$C_{23}H_{30}MnN_6Cl_2O_8$
Peso molecular	662.39	644.37
Tamaño cristal, mm	$0.5 \times 0.3 \times 0.3$	$0.4 \times 0.2 \times 0.2$
Sistema cristal	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P 21	P 21/c
T K	293(2)	293(2)
a, Å	8.938(3)	15.299(1)
b, Å	15.366(5)	12.8930(13)
c, Å	10.3010(17)	28.233(3)
$\alpha$ , deg	90	90
$\beta$ , deg	94.673(14)	92.971(7)
$\gamma$ , deg	90	90
V, Å <sup>3</sup>	1410.1(7)	5561.5(9)
Z	2	8
$d_{calc}$ , g/cm <sup>3</sup>	1.560	1.539
$\mu$ , mm <sup>-1</sup> (MoK $\alpha$ )	0.719	0.725
F(000)	686	2664
Refls. recogidos	1913	12195
Reflexiones únicas	1913	5066
Limitaciones	16	26
Params	370	722
R1, wR2 (all)	0.0800, 0.2182	0.1542, 0.4082

15

**Ejemplo 3. Estudio de la actividad de los complejos metálicos de la invención como miméticos de la enzima SOD.**

20 La actividad mimética del enzima SOD en estos complejos metálicos, se determinó mediante metodología de reducción del azul de ditetrazolio (nitroblue tetrazolium, NBT) por el anión superóxido descrita por Mccord y Fridovich (**Figura 4**). La generación de aniones superóxido se realizó a través del complejo enzimático xantina oxidasa (**Figura 5**), y estos aniones reaccionarán con la NBT y con el compuesto cuya actividad se desea probar.

25 Los ensayos se realizaron utilizando una disolución 50 mM de tampón HEPES a pH 7.4 y temperatura de 25° C. Se midió la variación de la absorbancia a 560 nanómetros, en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible. Se determinaron



los valores de velocidad de reacción a través de la variación de la absorbancia con el tiempo y se obtuvieron los valores de  $IC_{50}$  y de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) donde  $IC_{50}$  viene determinada por la ecuación:

$$IC_{50} = 1/(1-2f)K$$

5

y  $k_{cat}$  es:

$$k_{cat} = K_{NBT}[NBT]/IC_{50}$$

10 La **Tabla 4** muestra los valores de  $IC_{50}$  y de la  $k_{cat}$  obtenidos para los complejos metálicos formados a partir del compuesto de Fórmula 1 y 2 con el ión Mn(II).

**Tabla 4**

	<b>Complejo 2</b>	<b>Complejo 1</b>
<b><math>IC_{50}</math> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	1,17.10 <sup>-6</sup>	2,39.10 <sup>-7</sup>
<b><math>k_{cat}</math> (mol L<sup>-1</sup> Ls<sup>-1</sup>)</b>	3.10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>

15

Todos los complejos metálicos formados a partir del compuesto de Fórmula 1 ó 2 poseen una actividad ( $K_{cat}$ ) SOD significativa, destacando el complejo metálico formado a partir del compuesto 1.

20

**Ejemplo 4. Estudio de la toxicidad de los complejos metálicos de la invención.**

Se realizaron cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* (*Candida albicans* y cepas mutantes 96687 y 96688 de la colección americana de cultivos tipo) en medio líquido YNB, en presencia de diversas concentraciones de los complejos miméticos de SOD de la invención (hasta 0.5mM), y se observó un normal crecimiento de los cultivos.

25

Por lo tanto se deduce que los compuestos ensayados no presentan toxicidad ni inhiben el crecimiento.

30

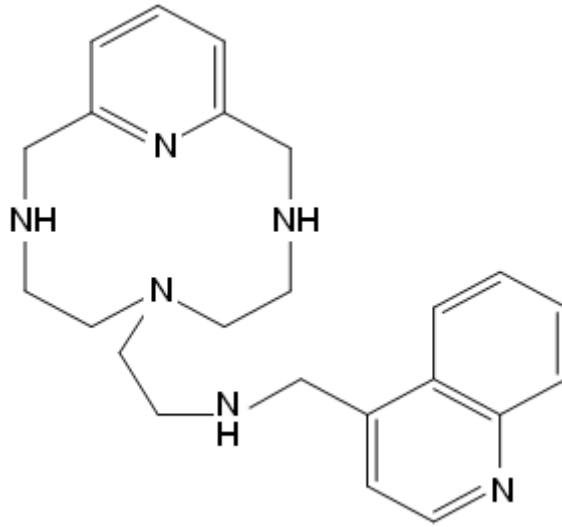
35

40

45

**REIVINDICACIONES**

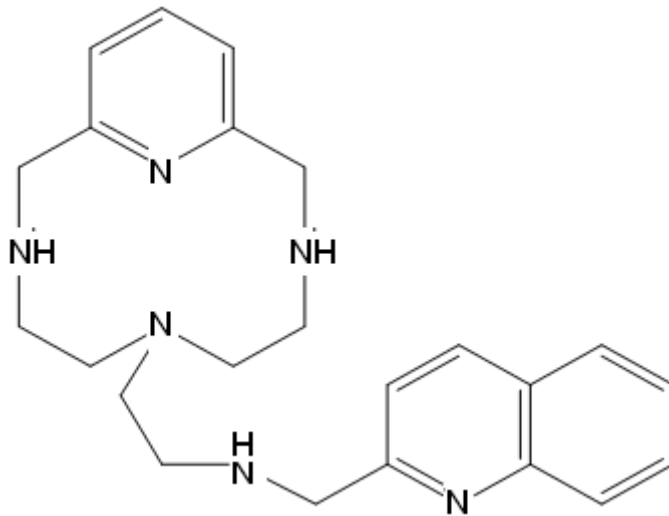
1. Compuesto intermedio de Fórmula 1:



(1)

5

2. Compuesto intermedio de Fórmula 2:



(2)

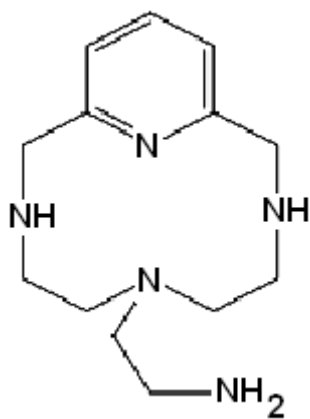
10

3. Procedimiento para la síntesis de complejos metálicos miméticos de la enzima SOD que comprende la unión de iones metálicos a un compuesto de Fórmula 1 o 2, o a cualquier derivado de los mismos.

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque los iones metálicos que se unen al compuesto de Fórmula 1 ó 2 se seleccionan entre: Cu (II), Fe (II) y Mn (II).

15

5. Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque los compuestos intermediarios de Fórmula 1 ó 2 se sintetizan previamente mediante un proceso que comprende la reacción del compuesto de Fórmula 3:



(3)

- 5 con el aldehído de 2 ó 4 quinolina disuelto en etanol, dependiendo respectivamente de si el compuesto intermediario a sintetizar es el compuesto de Fórmula 2 o el compuesto de Fórmula 1, y posteriormente la adición de borohidruro sódico para la reducción de la imina formada.
6. Complejo metálico que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o 2 y al menos un ión metálico.
- 10 7. Complejo metálico, según la reivindicación 6, donde el ión metálico se selecciona entre: Cu (II), Fe (II) o Mn (II).
8. Complejo metálico, según la reivindicación 7, en que el ión metálico es Mn (II).
9. Complejo metálico según las reivindicaciones 6 a 8 para uso como medicamento.
- 15 10. Complejo metálico, según la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en alteraciones de la actividad o carencia de la SOD endógena.
- 20 11. Complejo metálico, según la reivindicación 9, para uso como un antiinflamatorio, un analgésico o un protector del estrés oxidativo celular.
12. Uso del complejo metálico de las reivindicaciones 6 a 8, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en alteraciones de la actividad o carencia de la SOD endógena.
- 25 13. Uso, según la reivindicación 12, en que el medicamento se selecciona entre: un antiinflamatorio, un analgésico o un protector del estrés oxidativo celular.
- 30 14. Composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo al menos un complejo metálico de las reivindicaciones 6 a 8, o combinaciones de los mismos y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

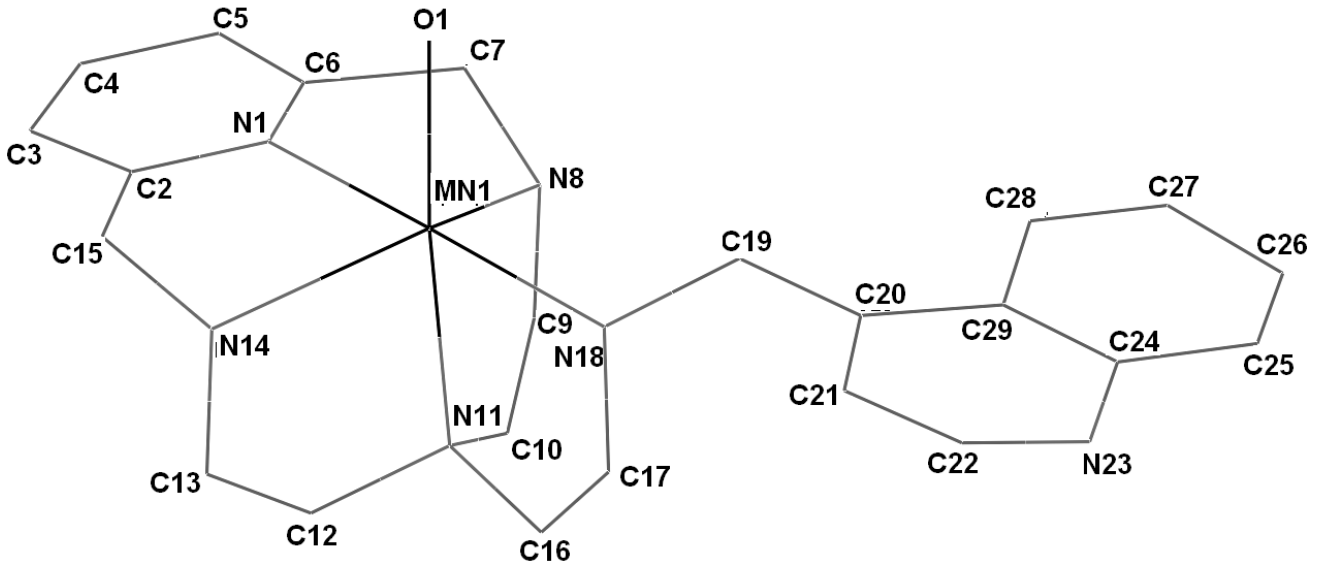


FIG. 2

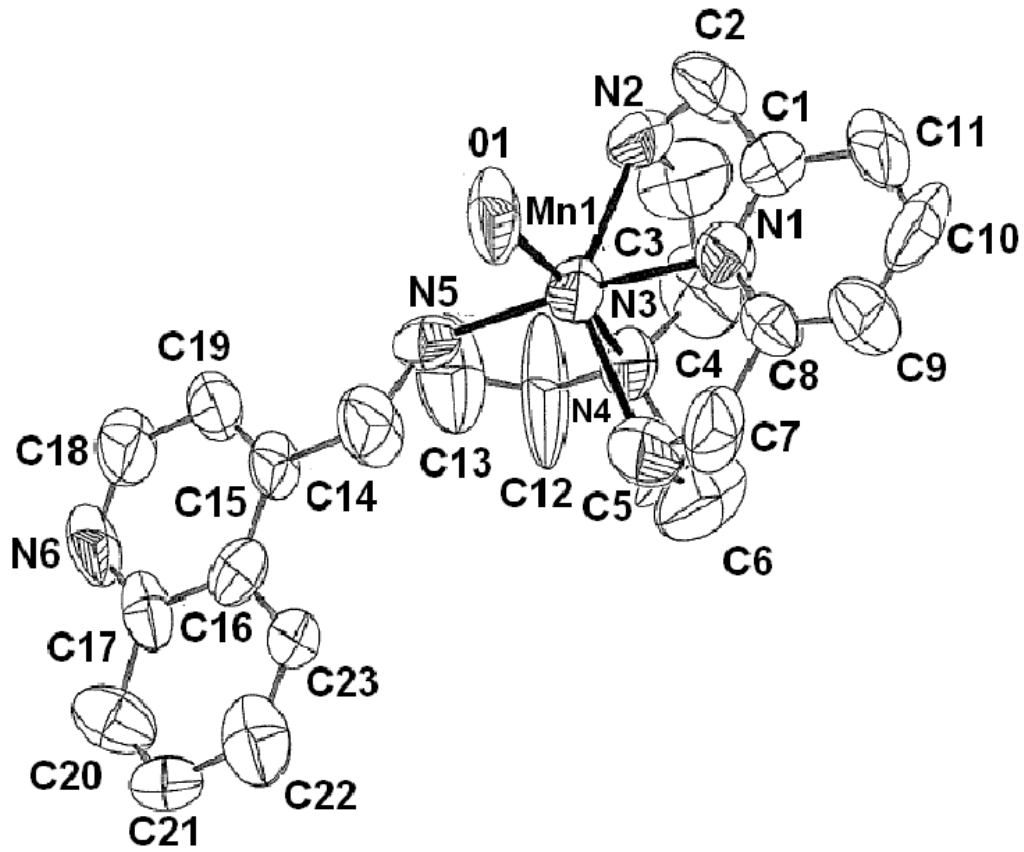


FIG. 3

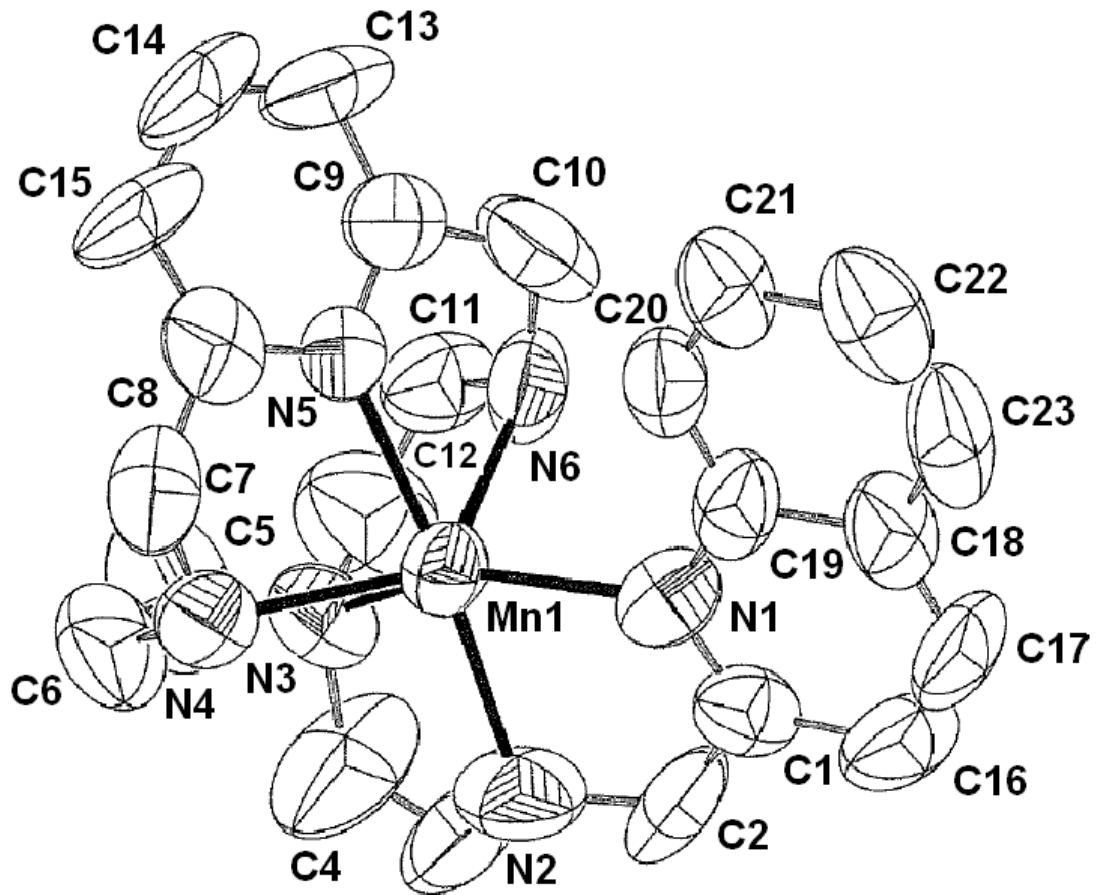


FIG. 4

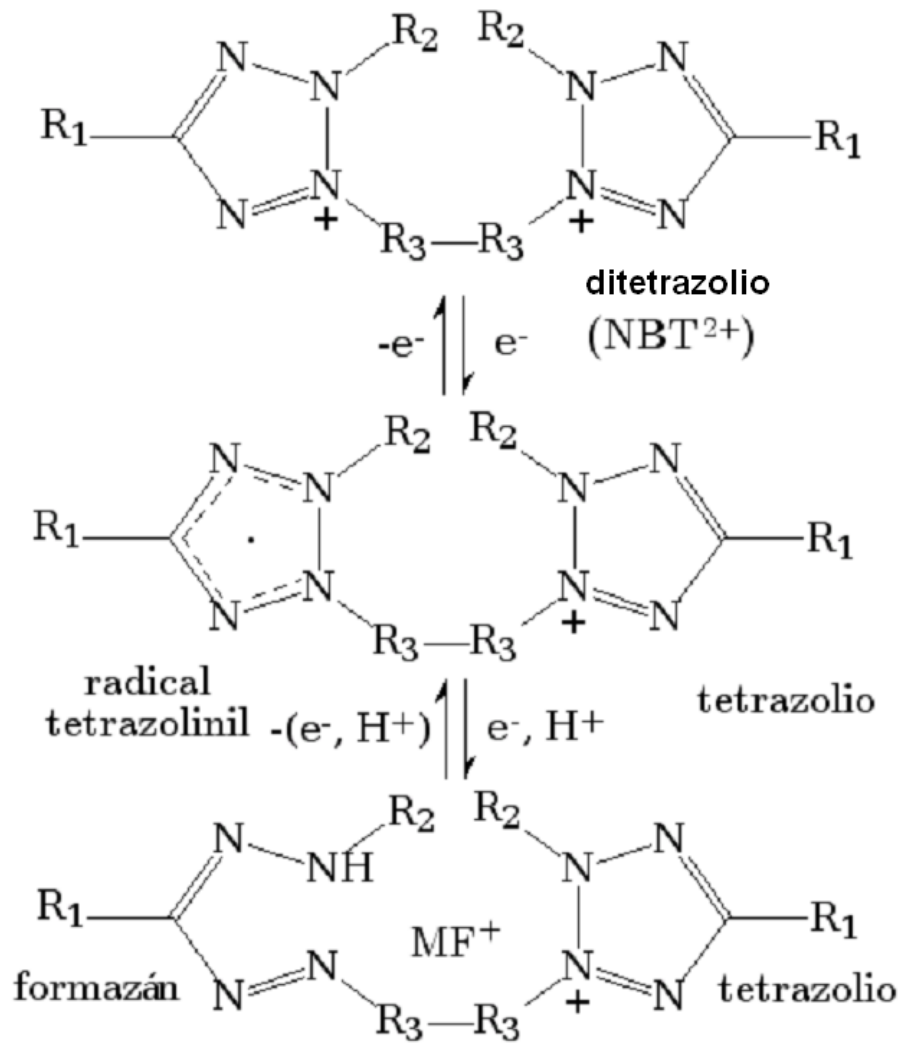
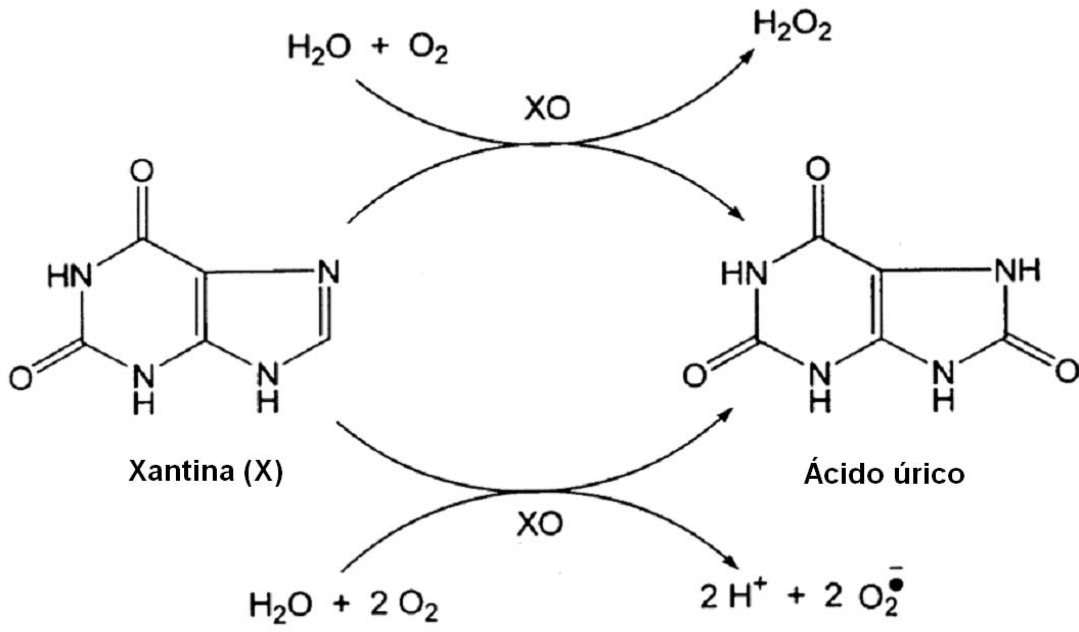


FIG. 5





**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 20071298354 A1, Ding N [0011]
- US 6794371 B1, Keith FR. [0012]
- US 2008085883 A1, Piganelli JD [0013]
- EP 1392328 B1, Crapo JD [0014]

**Documentos no literatura patente citados en la descripción**

- **ELCHURI et al.** CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 2005, vol. 24, 367-380 [0004]
- **MULLER et al.** Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, vol. 40, 1993-2004 [0004]
- **LI et al.** Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.*, 1995, vol. 11, 376-381 [0005] [0007]
- **MARITIM AC et al.** Diabetes. Oxidative stress and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2003, vol. 17, 24-38 [0006]
- **VOZENIN-BROTONS, MC. et al.** Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med.*, 2001, vol. 30 ((1)), 30-42 [0007]
- **LEBOVITZ et al.** Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, vol. 93, 9782-9787 [0007]
- **ZELKO et al.** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, vol. 33, 337-349 [0007]
- **CHEN et al.** Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1998, vol. 30, 2281-2289 [0007]
- **KELLER et al.** Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.*, 1998, vol. 18, 687-697 [0007]
- **FLORES et al.** Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7632-7636 [0007]
- **WESTENDORP.** HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *Embo. J.*, 1995, vol. 14, 546-554 [0007]
- **YAN.** Altered levels of primary antioxidant enzymes in progeria skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 257, 163-167 [0007]
- **VERDEJO B et al.** Equilibrium and kinetics properties of Cull cyclophane complexes: The effect of changes in the macrocyclic cavity caused by changes in the substitution at the aromatic ring. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 1497-1507 [0008]
- **VERDEJO B et al.** Hydrogen and copper iron-induced molecular reorganizations in scorpionand-like ligands. A potentiometric, mechanistic, and solid-state study. *Inorg. Chem.*, 2007, vol. 46, 5707-19 [0009]
- **ALGARRA A et al.** Geometric isomerism in penta-coordinate Cu<sup>2+</sup> complexes: Equilibrium, kinetic and density functional theory studies reveal the existence of equilibrium between square pyramidal and trigonal bipyramidal forms for a tren-derived ligand. *Inorg. Chem.*, 2009, vol. 48, 902-14 [0010]
- **Mimics of copper proteins: structural and functional aspects.** **FERREIRA AM et al.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* January 2000, 51-8 [0015]
- **C. BEAUCHAMP ; I. FRIDOVICH.** *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 44, 276 [0034]