

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 768**

51 Int. Cl.:

G01N 30/34 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2002 E 02721239 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1405066**

54 Título: **Cromatografía de complejos metálicos**

30 Prioridad:

02.03.2001 US 273220 P

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

24.07.2015

73 Titular/es:

**GALERA THERAPEUTICS LLC (100.0%)
4041 Forest Park Avenue, Suite 107
St. Louis, Missouri 63108, US**

72 Inventor/es:

**SLOMCZYNSKA, URSZULA J.;
TRAWICK, BOBBY N.;
RILEY, DENIS P. y
NAIK, ARATI**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 541 768 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

Cromatografía de complejos metálicos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución para la detección analítica y cuantificación de complejos metálicos, que tiene utilidad en aplicaciones farmacéuticas y de diagnóstico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) son enzimas que catalizan la dismutación del radical libre superóxido, el producto de reducción de un electrón del oxígeno molecular. La dismutación del radical libre superóxido implica la conversión de este producto de reducción de un electrón del oxígeno molecular en oxígeno molecular no radical. Las enzimas superóxido dismutasas son una clase de oxidoreductasas que contienen Cu/Zn, Fe o Mn en el sitio activo. Los compuestos miméticos de superóxido dismutasa (SOD) son catalizadores de bajo peso molecular que imitan la función de la enzima natural de las enzimas superóxido dismutasas. Por lo tanto, los compuestos miméticos de superóxido dismutasa también catalizan la conversión de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, eliminando rápidamente las especies superóxido generadas biológicamente dañinas, que se cree que contribuyen a la patología de tejidos en una serie de enfermedades y trastornos. Estas enfermedades y trastornos incluyen enfermedades de reperfusión, tales como aquellas después de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, trastornos inflamatorios tales como la artritis, y trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Parkinson, *Chem Reviews*, 1999 vol 99, No. 9, 2573-2587.

25

[0003] Los compuestos miméticos de superóxido dismutasa tienen varias ventajas frente a las propias enzimas superóxido dismutasas en cuanto a que sus propiedades químicas se pueden alterar para potenciar la estabilidad, actividad y biodistribución, mientras que todavía tienen la capacidad de dismutar el superóxido dañino. Los compuestos miméticos de superóxido dismutasa han generado un gran interés y han sido el centro de considerables esfuerzos para desarrollarlos como un agente terapéutico para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo lesión por reperfusión, neuropatías postisquémicas de miocardio isquémico, inflamación, trasplante de órganos y lesión inducida por radiación. La mayoría de los miméticos de superóxido dismutasa desarrollados actualmente como agentes terapéuticos son compuestos sintéticos de bajo peso molecular miméticos de superóxido dismutasa basados en manganeso. *Chem Reviews*, 2576.

35

[0004] Los compuestos miméticos de superóxido dismutasa son complejos metálicos en los que el metal se puede coordinar con ligandos axiales. Los ejemplos de dichos complejos metálicos incluyen, pero no se limitan a complejos de los metales Mn y Fe. Muchos de los complejos de los metales Mn y Fe no tienen actividad de superóxido dismutasa pero tienen propiedades que permiten su aplicación en otros usos terapéuticos y de diagnóstico. Estos usos terapéuticos y de diagnóstico incluyen agentes de potenciación de imagenología por IRM, catalizadores de descomposición de peroxinitrito e imitadores de catalasa. Sin embargo, estos complejos metálicos, comparten similitud estructural y tienen un metal que se puede coordinar con ligandos intercambiables. Estos complejos metálicos existen en agua como una mezcla de especies en las que son posibles diferentes ligandos. Una ilustración de dicha mezcla se proporciona por M40403, un complejo de Mn(II) de un ligando macrocíclico de 15 miembros que contiene nitrógeno, mostrado en el esquema 1. Una de las formas de este complejo metálico es el complejo dicloro, que cuando se disuelve en agua, genera otra forma donde uno de los aniones cloruro se disocia inmediatamente del metal generando el complejo $[Mn(Cl)(aq)]^+$. El problema en los sistemas de disolventes acuosos o cualquier disolvente que tenga un potencial átomo donador es que hay una variedad de potenciales ligandos disponibles para coordinarse axialmente con el ion Mn(II) del complejo. Cuando se lleva a cabo un análisis de una muestra que contiene un complejo metálico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el cromatograma tiende a ser muy ancho y no resuelto debido a la presencia de diferentes especies de complejos, como se muestra en el esquema 1. Este fenómeno hace que sean bastante difíciles la identificación y cuantificación de complejos metálicos por técnicas de HPLC estándar. Por lo tanto, a la vista del papel que están desarrollando los complejos metálicos como productos terapéuticos en el tratamiento de diferentes trastornos y como agentes de diagnóstico, existe una necesidad sustancial de un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución eficaz y viable para analizar complejos metálicos.

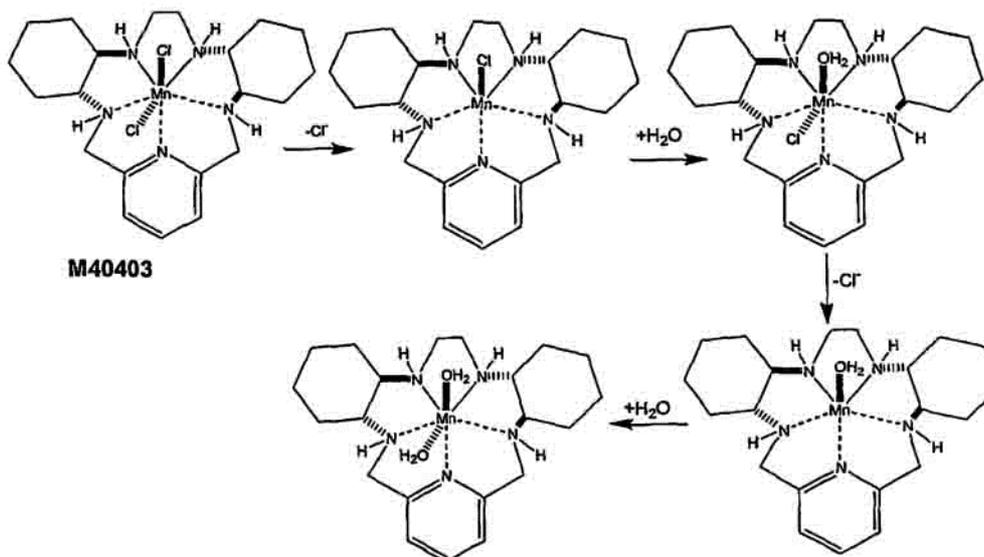
50

55

[0005] El documento US 6.177.419 B1 (CAMPBELL y col.) describe la HPLC realizada en diferentes compuestos que son eficaces como miméticos de superóxido dismutasa (SOD), y/o catalasa (CAT), y/o peroxidasa

(POD) y que, por lo tanto, tienen propiedades antioxidantes y/o depuradoras de radicales libres, y funcionan como antioxidantes in vivo, en particular, complejos de manganeso de derivados de bipyridina y formulaciones farmacéuticas que los contienen. El documento US 6.177.419 describe además dos sistemas de disolventes diferentes adecuados para usar como la fase móvil, que contiene cada uno acetato amónico.

5



Esquema 1

10 **[0006]** Una complicación adicional que existe es el problema de la estabilidad en ácido del complejo metálico. Al disminuir el pH, aumenta la velocidad a la que el complejo se protona y experimenta inestabilidad. Esto presenta problemas particulares para el uso de HPLC como un procedimiento de detección y cuantificación de los complejos metálicos porque la fase móvil usada para HPLC de fase inversa con frecuencia contiene mezclas de disolventes orgánicos y agua en diferentes combinaciones con ácido trifluoroacético. El ácido trifluoroacético normalmente está
 15 presente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5% en peso. La presencia de ácido trifluoroacético hace que el complejo se disocie. Esta disociación destruye el potencial de cualquier de dichos procedimientos para usarlo como prueba de pureza antes de la liberación. Además, el anión trifluoroacetato produce la formación de algo de complejo de trifluoroacetato, que podría tener un tiempo de retención diferente de los complejos de cloro, y por lo tanto, confundir la cromatografía. Por lo tanto, el fenómeno de intercambio de ligandos, acoplado con la inestabilidad
 20 en ácido de los complejos metálicos, proporciona un desafío considerable para el esfuerzo para detectar y cuantificar complejos metálicos usando HPLC. Estos desafíos y necesidades se cumplen, sorprendentemente, mediante la invención descrita a continuación.

[0007] La HPLC analítica es un procedimiento potente para obtener información sobre un compuesto de
 25 muestra, que incluye información relacionada con la identificación, cuantificación y resolución de un compuesto. La HPLC se ha usado en particular para el análisis de compuestos mayores y para el análisis de iones inorgánicos para los que la cromatografía líquida no es adecuada. Skoog, D.A., West, M.A., *Analytical Chemistry*, 1986, pág. 520. Como herramienta analítica, la HPLC tiene la ventaja de las diferencias en afinidad que un compuesto particular de interés tiene por la fase estacionaria y la fase móvil (con aplicación continua del disolvente a la columna). Los
 30 compuestos que tienen interacciones más fuertes con la fase móvil que con la fase estacionaria eluirán de la columna más rápido y por lo tanto tienen un tiempo de retención menor. La fase móvil se puede alterar con el fin de manipular las interacciones del compuesto objetivo y la fase estacionaria. En la HPLC en fase normal, la fase estacionaria es polar, tal como sílice, y la fase móvil es un disolvente no polar tal como hexano o éter isopropílico. En la HPLC de fase inversa, la fase estacionaria es no polar, a menudo un hidrocarburo, y la fase móvil es un disolvente
 35 relativamente polar. Desde 1974, cuando los materiales de empaquetamiento de la fase estacionaria estuvieron disponibles en el comercio, el número de aplicaciones para la HPLC de fase inversa ha aumentado, y ahora la HPLC de fase inversa es el tipo de HPLC más ampliamente usado. La popularidad de la HPLC de fase inversa se puede atribuir a su capacidad para separar una amplia variedad de compuestos orgánicos. La cromatografía de fase inversa es especialmente útil en la separación de componentes relacionados de mezclas de reacción, y por lo tanto

es una herramienta analítica útil para determinar los diferentes compuestos producidos por las reacciones.

[0008] Para crear una fase estacionaria no polar se modifican adsorbentes basados en sílice o polímeros sintéticos con hidrocarburos. Las fases unidas más populares son C1, C4, C8 y C18. Los adsorbentes basados en sílice modificados con trimetilclorosilano (C1) y butildimetilclorosilano (C4), tienen algunas aplicaciones en HPLC, principalmente para la separación o purificación de proteínas. Estos adsorbentes muestran interacciones polares significativas. Los adsorbentes modificados con octilo (C8) y octadecilo (C18) son los adsorbentes basados en sílice más ampliamente usados, desarrollándose casi 80% de todas las separaciones de HPLC con estos adsorbentes.

[0009] El parámetro más importante en la HPLC de fase inversa es la fase móvil. El tipo de fase móvil usada en la HPLC tendrá un efecto significativo en la retención de los analitos en la muestra, y la variación de la composición de la fase móvil permite al cromatógrafo ajustar los tiempos de retención de los componentes objetivo en la mezcla a los valores deseados. Esta capacidad proporciona flexibilidad al procedimiento de HPLC. La fase móvil en la cromatografía de fase inversa tiene que ser polar y tiene que proporcionar también una competición razonable para los sitios de adsorción para las moléculas de analito. Los disolventes que se usan normalmente como componentes del eluyente en la HPLC de fase inversa son acetonitrilo, dioxano, etanol, metanol, isopropanol, tetrahidrofurano y agua. En la HPLC de fase inversa de compuestos biológicos de alto peso molecular, los disolventes acetonitrilo, isopropanol o propanol son los usados con más frecuencia. Los aditivos populares para la fase móvil para mejorar la resolución incluyen mezclas de ácido fosfórico y aminas y ácidos carboxílicos perfluorados, en especial ácido trifluoroacético (TFA).

[0010] La HPLC explota las diferencias en afinidad que un compuesto particular de interés tiene por la fase estacionaria y la fase móvil. Este fenómeno se puede usar para separar compuestos basándose en las diferencias en sus propiedades físicas. Por lo tanto, la HPLC se puede usar para separar estereoisómeros, diastereoisómeros, enantiómeros, estereoisómeros imágenes especulares, e impurezas. Los estereoisómeros son aquellas moléculas que difieren entre sí solo en la forma en que sus átomos están orientados en el espacio. La disposición particular de los átomos que caracteriza a un estereoisómero particular se conoce como su configuración óptica, especificada por reglas de secuenciación conocidas, por ejemplo, + o - (también D o L) y/o R o S. Los estereoisómeros en general se clasifican como de dos tipos, enantiómeros o diastereoisómeros. Los enantiómeros son estereoisómeros que son imágenes especulares entre sí. Los enantiómeros se pueden clasificar además como estereoisómeros imágenes especulares que no se pueden superponer uno con otro y estereoisómeros imágenes especulares que se pueden superponer uno con otro. Los estereoisómeros imágenes especulares que se pueden superponer uno con otro se conocen como compuestos meso. Los diastereoisómeros son estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí. Los diastereoisómeros tienen diferentes propiedades físicas tales como puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidades en un disolvente dado, densidades, índices de refracción, etc. Los diastereoisómeros normalmente se pueden separar fácilmente uno de otro por procedimientos convencionales, tales como destilación fraccionada, cristalización fraccionada o cromatografía, incluyendo HPLC.

[0011] Sin embargo, los enantiómeros presentan retos especiales porque sus propiedades físicas son idénticas. En general no se pueden separar por procedimientos convencionales, en especial si están en forma de una mezcla racémica. Por lo tanto, no se pueden separar por destilación fraccionada porque sus puntos de ebullición son idénticos, y no se pueden separar por cristalización fraccionada porque sus solubilidades son idénticas (salvo que el disolvente sea ópticamente activo). Tampoco se pueden separar por cromatografía convencional tal como HPLC porque (salvo que el adsorbente sea ópticamente activo) se mantienen iguales en el adsorbente. Los métodos de HPLC que usan fases estacionarias quirales son un procedimiento bien conocido para la separación de enantiómeros. Para poder separar mezclas racémicas de estereoisómeros, la fase quiral tiene que formar un complejo diastereoisómero con uno de los isómeros, o tiene que tener algún otro tipo de interacción estereoespecífica. El mecanismo exacto de reconocimiento quiral no se entiende todavía completamente. En la HPLC de fase inversa, un tipo común de fase unida quiral es la fase de cavidades quirales.

[0012] La capacidad para poder separar diastereoisómeros y enantiómeros por HPLC es una capacidad útil para evaluar el éxito de esquemas sintéticos. A menudo es deseable separar estereoisómeros como medio para evaluar la pureza enantiomérica de las muestras de producción.

55 RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] La presente invención se dirige a un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo con la reivindicación 1, para detectar y cuantificar complejos metálicos de forma rutinaria y reproducible.

[0014] La elución del complejo de la columna con la fase móvil genera un complejo metálico en el que el anión de coordinación (que es un ligando competente) supera competitivamente todos los demás ligandos potenciales presentes para los sitios de coordinación disponibles en el metal. Por lo tanto, la función de este ligando es, por el principio de acción de masas, ocupar todos los sitios de ligandos disponibles, creando una especie. Los complejos metálicos usados en el procedimiento de la invención pueden ser complejos metálicos diferentes o pueden ser estereoisómeros de los mismos complejos metálicos. Por lo tanto, el procedimiento de HPLC de la presente invención es adecuado para la separación de diastereoisómeros de los mismos complejos metálicos.

[0015] Otro aspecto que no es parte de la presente invención, se dirige a un procedimiento de HPLC quiral para separar enantiómeros de complejos metálicos. En este procedimiento de HPLC quiral, se usa una columna quiral para lograr la separación de los enantiómeros de complejos metálicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 **[0016]**

La figura 1 es un cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 1.

La figura 2 es un cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 2.

La figura 3 es un cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 3.

La figura 3a es un cromatograma de HPLC de M40403 y compuestos relacionados usando el procedimiento 3.

20 La figura 4 es un cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 4.

La figura 4a es un cromatograma de HPLC de M40403 y compuestos relacionados usando el procedimiento 4.

La figura 5 es un cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 1.

La figura 6 es un cromatograma de HPLC de M40401 con diferentes concentraciones de NaCl.

La figura 7 es un cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 2.

25 La figura 8 es un cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 3.

La figura 9 es un cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 4.

La figura 9a es un cromatograma de HPLC de una mezcla de M40401 y compuestos relacionados.

La figura 10 es un cromatograma de HPLC de M40403-(HCOO⁻)₂ usando anión formiato.

La figura 11 es un cromatograma de HPLC de M40403-(CH₃COO⁻)₂ usando anión acetato.

30 La figura 12 es un análisis de HPLC de diastereoisómeros de M40403.

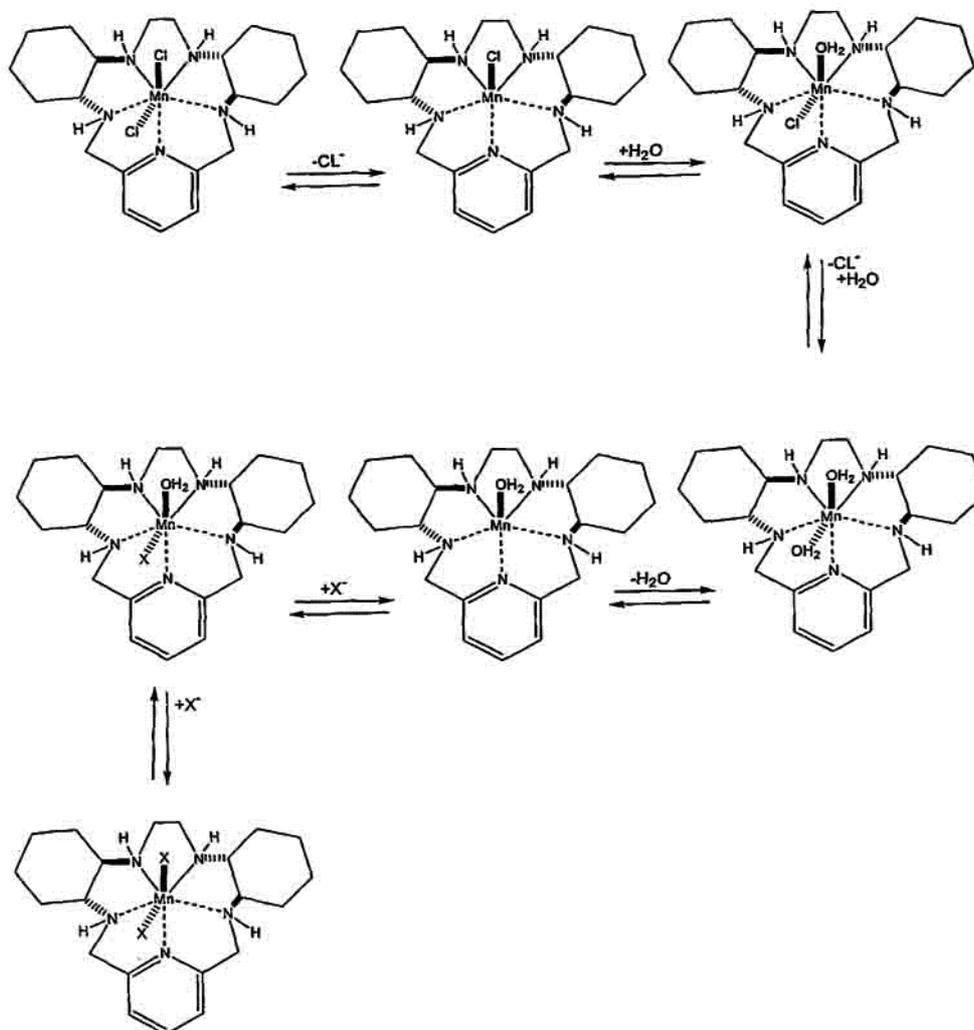
La figura 13 es un perfil de HPLC quiral de los enantiómeros bis(tiocianato) de M40403 y M40419.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 **[0017]** El procedimiento de la presente invención proporciona un exceso de un contraión de coordinación en una fase móvil que se unirá en los sitios de ligandos en el metal de complejos metálicos. Se cargan soluciones que contienen complejos metálicos en una columna y los complejos metálicos se eluyen con la fase móvil. Mediante la inclusión del exceso del contraión, la reacción se dirige hacia la generación de una especie única durante la elución con la fase móvil, de modo que solo un tipo de ligando, el contraión, se une al metal del complejo metálico y todos o sustancialmente todos los sitios de unión de ligandos del metal están ocupados por este contraión único. La formación de la especie única se muestra en el esquema 2. La formación de una especie única del o de los complejos metálicos presentes, permite que los complejos metálicos sean fácilmente detectables mediante un detector sin interferencia de otras especies de complejos. Los picos en un cromatograma que resulta de esta detección son más agudos y están más resueltos que los de un cromatograma que resulta de un procedimiento de

40 cromatografía en el que se usa una fase móvil tradicional, como se demuestra en los ejemplos 1 (fase móvil tradicional) y 2 (fase móvil que contiene exceso de sal de un anión de coordinación).

45

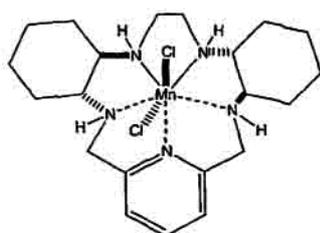


Esquema 2

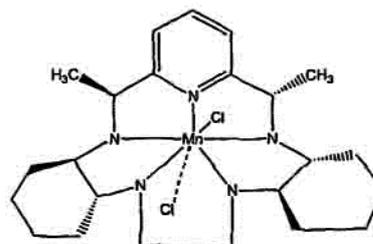
5 **[0018]** Se puede usar en la presente invención cualquier complejo metálico que tenga un metal que sea capaz de coordinar un ligando monodentado. Los ejemplos de dichos complejos metálicos incluyen, pero no se limitan a complejos de los metales Mn y Fe. Los complejos metálicos de la invención preferiblemente tienen utilidades terapéuticas y de diagnóstico. Estas utilidades terapéuticas y de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a uso como compuestos miméticos de superóxido dismutasa, agentes potenciadores de imagenología por IRM, catalizadores de descomposición de peroxinitrito y miméticos de catalasa. Los complejos metálicos preferidos para usar en la invención son compuestos miméticos de superóxido dismutasa. Los ejemplos de dichos compuestos miméticos de superóxido dismutasa incluyen, pero no se limitan a los siguientes complejos de los metales Mn y Fe. Los miméticos de superóxido dismutasa basados en hierro incluyen, pero no se limitan a complejos de Fe^{III}(salen), derivados de Fe^{III}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano) y complejos de Fe^{III}(porfirinato). Los compuestos miméticos de superóxido dismutasa basados en manganeso incluyen, pero no se limitan a complejos metálicos que contienen manganeso(II) o manganeso(III). Los ejemplos de compuestos miméticos de superóxido dismutasa basados en manganeso incluyen complejos de Mn^{III}(porfirinato), complejos de Mn^{III}(salen) y derivados de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano). Los derivados de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano) son más preferidos para usar en la invención. Los ejemplos de derivados de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano) preferidos para usar en la invención incluyen, pero no se limitan a M40403 y M40401, como se muestra en el esquema 3 a continuación.

[0019] Además, se pueden usar estereoisómeros de todos los complejos metálicos anteriores en el procedimiento

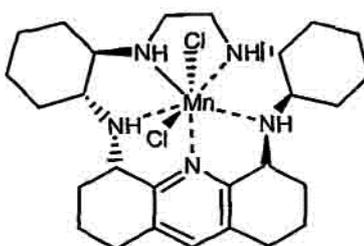
de la presente invención. Los diastereoisómeros de los mismos complejos metálicos también se pueden detectar y separar por el procedimiento de la presente invención. Puesto que a menudo es conveniente separar los estereoisómeros como medio para evaluar la pureza química y óptica de las muestras de producción, los metales complejos también pueden comprender productos de una corriente de reacciones. Los enantiómeros de cualquiera de los complejos metálicos a los que se ha hecho referencia antes se pueden usar en el procedimiento de HPLC quiral de la invención para la separación de enantiómeros de un complejo metálico.



M40403



M40401

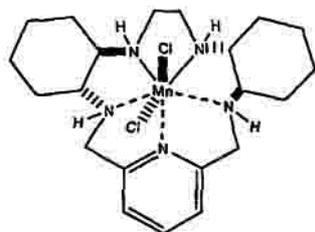


M40484

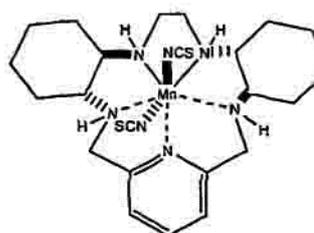
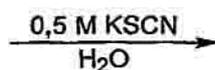
10

Esquema 3

[0020] El ligando es un anión de coordinación que se une al catión metálico del complejo metálico. El anión de coordinación puede servir como un ligando axial para un compuesto mimético de superóxido dismutasa. Los ejemplos de dichos aniones incluyen, pero no se limitan a aniones cloruro, aniones tiocianato, aniones estearato, aniones acetato, aniones trifluoroacetato, aniones carboxilato, aniones formiato, o aniones azida. Los aniones preferidos incluyen aniones cloruro, aniones tiocianato y aniones formiato. Los aniones más preferidos son los aniones cloruro. Los aniones más preferidos en la realización de HPLC quiral de la invención son aniones tiocianato. Cuando están presente en exceso, los aniones tiocianato se unen al metal de coordinación de los complejos preferentemente a los aniones cloruro. Un exceso de aniones tiocianato producirá complejos de bis(tiocianato) de M40403 y M40419, como se muestra en el esquema 4.



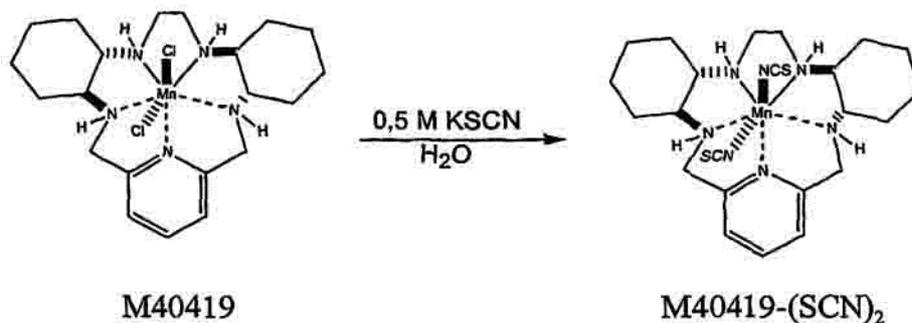
M40403



M40403-(SCN)₂

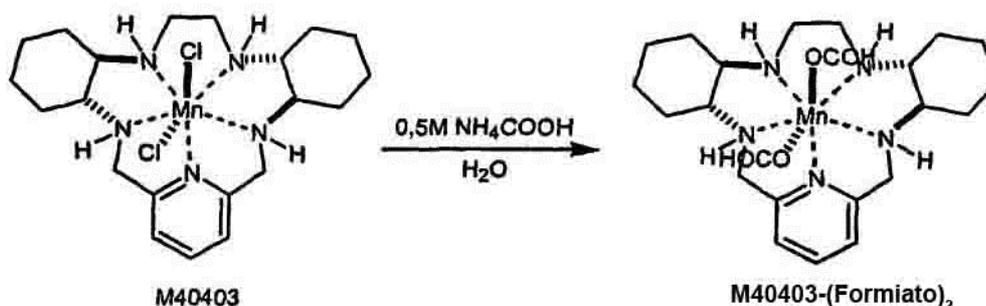
Esquema 4

[0021] Un ejemplo del uso del anión acetato como anión de coordinación con M40403 se muestra en el esquema 5 a continuación. El esquema 6 ilustra el uso del anión formiato como el anión de coordinación con M40403.



5

Esquema 5



10

Esquema 6

[0022] El anión de coordinación se suministra mediante una sal del anión de coordinación. Las sales del anión cloruro incluyen, pero no se limitan a cloruro de sodio, cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, o cloruro de tetraalquilamonio. Las sales preferidas del anión cloruro incluyen cloruro de sodio, cloruro de litio, y cloruro de 15 tetraalquilamonio. Las sales del anión tiocianato incluyen, pero no se limitan a tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, tiocianato de amonio o tiocianato de litio. Las sales preferidas del anión tiocianato incluyen tiocianato de sodio y tiocianato de potasio. Las sales del anión acetato incluyen, pero no se limitan a acetato de potasio, acetato de sodio, trifluoroacetato de amonio y acetato de litio.

20 [0023] Las sales del anión formiato incluyen, pero no se limitan a formiato de potasio, formiato de sodio, formiato de amonio y formiato de litio. Las sales preferidas del anión formiato incluyen formiato de amonio. Las sales del anión cianato incluyen, pero no se limitan a cianato de sodio, cianato de potasio o cianato de amonio. Las sales del anión carboxilato incluyen, pero no se limitan a carboxilato de potasio, carboxilato de amonio y carboxilato de sodio. Las sales del anión estearato incluyen, pero no se limitan a estearato de litio y estearato de sodio. Las sales del 25 anión azida incluyen, pero no se limitan a azida de sodio, azida de potasio y azida de litio. Las sales añadidas a la fase móvil también pueden ser una mezcla de cualquiera de estas sales. Los ejemplos incluyen una mezcla de cloruro de tetraalquilamonio y cloruro de litio.

[0024] El sistema de disolventes puede comprender cualquier disolvente usado en procedimientos de HPLC. El 30 sistema de disolventes puede comprender un solo disolvente o una mezcla de disolventes, siempre que las sales del anión de coordinación sean solubles en el sistema de disolventes. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a acetonitrilo, dioxano, etanol, metanol, isopropanol, tetrahidrofurano y agua. Los disolventes preferidos para todas las realizaciones de la invención incluyen acetonitrilo, isopropanol, propanol, agua y metanol. Los disolventes más preferidos son acetonitrilo, agua y metanol. Las mezclas adecuadas de disolventes pueden ser, 35 por ejemplo, mezclas de acetonitrilo y agua, o mezclas de metanol y agua. El disolvente más preferido para la

realización de HPLC quiral de la invención es el metanol.

[0025] El sistema de disolventes que contiene el exceso de sal y opcionalmente una base o ácido para el ajuste de pH comprende la fase móvil. La composición de la fase móvil es importante para el éxito del procedimiento de la presente invención. La cantidad de la sal del anión de coordinación debe ser en suficiente exceso para que el anión de coordinación sature sustancialmente todos, y preferiblemente todos los sitios de unión de ligandos intercambiables en el metal de los complejos metálicos, dirigiendo la formación de una sola especie durante la elución con la fase móvil. La especie única se forma sustancialmente durante la elución con la fase móvil. Una formación sustancial de una especie única, un complejo en el que el anión de coordinación de la sal comprende los ligandos, es la cantidad de la especie única que produce una resolución potenciada y forma de los picos mejorada en un cromatograma, comparado con un cromatograma de una HPLC en la que no se ha usado sal o se ha usado una cantidad insuficiente en la fase móvil. La resolución potenciada y la forma del pico mejorada se ilustran en el cromatograma de la figura 2 del ejemplo 2 y debe producirse sin que se disocie el complejo metálico. Un ejemplo de un cromatograma de una HPLC en la que no se ha usado sal o se ha usado una cantidad insuficiente en la fase móvil es la figura 1 en el ejemplo 1.

[0026] La sal del anión de coordinación está presente en exceso en la fase móvil. La concentración de la sal en la fase móvil puede variar considerablemente, dependiendo de la composición de la fase móvil y del tipo particular de sal usada. Los límites superiores en la concentración de sal en la fase móvil se fijan por la solubilidad de la sal en la fase móvil. Los límites inferiores en la concentración de sal en la fase móvil se fijan por la concentración de sal que proporciona una cantidad de un anión de coordinación suficiente para producir la formación de un complejo metálico que tiene sustancialmente solo el anión de coordinación como ligandos. El límite inferior de la concentración de sal en la fase móvil es al menos mayor que una cantidad estequiométrica. Preferiblemente, la sal está presente en la fase móvil en una concentración que maximiza la formación de una especie única. Sin embargo, en general, la concentración de la sal en la fase móvil varía de entre aproximadamente 0,004 M y aproximadamente 6 M. Preferiblemente, la concentración de la sal en la fase móvil varía de entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1 M. Más preferiblemente, la concentración de la sal en la fase móvil varía de entre aproximadamente 0,15 M y aproximadamente 0,6 M.

[0027] Estos intervalos diferirán dependiendo del tipo de sal usada en la fase móvil. Por ejemplo, la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil está en el intervalo de NaCl de entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1 M. Preferiblemente, la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,7 M. Más preferiblemente, la concentración de cloruro de sodio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,4 M y aproximadamente 0,6 M. La concentración de cloruro de litio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 1 M. Preferiblemente, la concentración de cloruro de litio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,7 M. Más preferiblemente, la concentración de cloruro de litio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,4 M y aproximadamente 0,6 M. La concentración de cloruro de tetrabutilamonio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,005 M y aproximadamente 0,15 M. Preferiblemente, la concentración de cloruro de tetrabutilamonio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 0,13 M. Más preferiblemente, la concentración de cloruro de tetrabutilamonio en la fase móvil está en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 M y aproximadamente 0,125 M.

[0028] La fase móvil debe tener un pH que sea adecuado para los complejos metálicos usados en el procedimiento y la columna usada en el procedimiento. Un pH que es adecuado para los complejos metálicos usados en el procedimiento, es un pH al que el complejo metálico es estable, es decir, no hace que el complejo metálico se disocie. Un pH que es adecuado para la columna usada en el procedimiento de la invención, es un pH al que la columna es estable y funciona adecuadamente. El pH de la fase móvil se puede ajustar por la adición de una base o un ácido. La necesidad de ajuste del pH dependerá de muchos factores, incluyendo los complejos metálicos particulares usados, el tipo de columna usada y la composición de la fase móvil. Por lo tanto, el pH de la fase móvil puede ser cualquier entre 2-14.

[0029] Sin embargo, para los complejos metálicos preferidos de la invención, el pH está preferiblemente entre 6-8. Un pH entre 6-8 minimiza la disociación del complejo. La disociación del complejo asistida por protones es un fenómeno por el cual el complejo metálico se protona y debido a esta protonación se disocia más fácilmente. El complejo experimenta más protonación a valores de pH inferiores. Más preferiblemente, el pH de la fase móvil está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5. Incluso más preferiblemente, el pH de la fase móvil está entre aproximadamente 6,4 y aproximadamente 7,2. El pH de la fase móvil se puede ajustar a estos valores preferidos usando cualquier base adecuada. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, pero no se limitan a hidróxido de

sodio, hidróxido de litio, hidróxido de potasio e hidróxido de amonio. Preferiblemente, el catión de la base corresponde al catión de la sal en la fase móvil. Por ejemplo, una base preferida en una fase móvil que contiene cloruro de tetrabutilamonio sería hidróxido de amonio. La cantidad de base en la fase móvil será la cantidad necesaria para ajustar la fase móvil al pH adecuado.

5

[0030] Por lo tanto, un ejemplo de una fase móvil adecuada es acetonitrilo en agua que contiene entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 0,7 M de una sal a un pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Otra fase móvil adecuada es metanol al 1-5% en agua que contiene entre aproximadamente 0,15 M y aproximadamente 0,6 M de sal a un pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Una fase móvil preferida sería acetonitrilo que contiene cloruro de sodio entre aproximadamente 0,3 M y aproximadamente 0,7 M a un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5. Otra fase móvil preferida sería acetonitrilo al 5-15% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 0,13 M a un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5. Otra fase móvil preferida más sería acetonitrilo al 5-15% en agua que contiene una mezcla de cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 0,13 M y cloruro de litio entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,7 M a un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5.

[0031] Una fase móvil más preferida sería acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene cloruro de sodio entre aproximadamente 0,4 M y aproximadamente 0,6 M a un pH de entre aproximadamente 6,4 y aproximadamente 7,2. Otra fase móvil más preferida sería acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,05 M y aproximadamente 0,125 M a un pH de entre aproximadamente 6,4 y aproximadamente 7,2. Otra fase móvil preferida más sería acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene una mezcla de cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,05 M y aproximadamente 0,125 M y cloruro de litio entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,6 M a un pH entre aproximadamente 6,4 y aproximadamente 7,2.

20

[0032] Para la realización de HPLC quiral de la invención, una fase móvil preferida incluiría metanol al 1-5% en agua que contiene tiocianato de sodio entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 2,5 M. Otra fase móvil preferida sería metanol al 1-5% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,05 M y aproximadamente 0,3 M. Una fase móvil preferida más para la realización de HPLC quiral sería metanol al 1-5% en agua que contiene tiocianato de amonio entre aproximadamente 0,2 M y aproximadamente 0,3 M de. Otra fase móvil preferida sería metanol al 1-5% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre aproximadamente 0,05 M y aproximadamente 0,15 M.

25

[0033] En la primera etapa del procedimiento analítico, se carga una solución que contiene el complejo metálico en la columna. La carga se puede realizar por inyección u otro medio adecuado de poner la solución que contiene el complejo metálico en la columna. Preferiblemente, la solución que contiene el complejo metálico se carga en la columna por inyección mediante un inyector. El procedimiento de inyección puede ser manual o puede ser automático. La preparación del complejo metálico para inyección podría producirse de varias formas. Preferiblemente, el complejo metálico se disuelve directamente en la fase móvil. Sin embargo, dependiendo de la solubilidad del complejo metálico, el complejo metálico también se puede disolver en un disolvente y después se le puede añadir la fase móvil. Otra forma de llevar a cabo la etapa de combinación es disolver el complejo metálico en un disolvente con una sal del mismo anión de coordinación que está presente en la fase móvil, y después diluir con una fase móvil. Los disolventes adecuados en los que se podrían disolver los complejos metálicos incluyen disolventes orgánicos tales como metanol, etanol y propanol. El disolvente en el que se pueden disolver los complejos metálicos no tiene que ser el mismo disolvente o disolventes que comprende el sistema de disolventes en la fase móvil. Sin embargo, se prefiere que el disolvente en el que se disuelven los metales complejos sea el mismo disolvente o disolventes que comprende el sistema de disolventes en la fase móvil. Por lo tanto, la solución que contiene complejos metálicos puede ser la fase móvil, un disolvente adecuado que disuelve los complejos metálicos, o un disolvente adecuado que disuelve los complejos metálicos que se han diluido además con la fase móvil.

30

[0034] Las fases estacionarias adecuadas para usar en el procedimiento de la invención incluyen columnas usadas habitualmente en procedimientos de HPLC. Se puede usar cualquier columna de HPLC con la condición de que pueda proporcionar separación satisfactoria de complejos metálicos. Las columnas típicamente están en el intervalo de 2-5 mm de diámetro con tamaños de partículas en el intervalo de 3-10 mm. Los ejemplos de columnas adecuadas incluyen columnas modificadas C1, columnas modificadas C3, columnas modificadas C4, columnas modificadas con octilo (C8), columnas modificadas con octadecilo (C18), columna de polímero C18, columnas de fenilo y columnas de amino-ciano. Los tipos preferidos de columnas incluyen columnas modificadas con octadecilo, columnas de fenilo y columnas de amino-ciano. Los tipos más preferidos de columnas incluyen columnas modificadas con octadecilo. Los ejemplos de estas columnas modificadas con octadecilo más preferidas incluyen

35

40

45

50

55

columna YMC ODS-AQ S5® disponible en Waters Corporation, columna Vydac® disponible en Vydac, y la columna Symmetry Shield RP18® disponible en Waters Corporation.

5 **[0035]** En la realización del HPLC quiral de la invención debe usarse una fase estacionaria quiral. Se puede usar cualquier tipo de columna quiral usada en HPLC en la invención, con la condición de que separe satisfactoriamente enantiómeros de complejos metálicos. Las columnas quirales usadas con la cromatografía líquida de alta resolución son preferidas para usar en la invención. Por lo tanto, las columnas preferidas típicamente están en el intervalo de 2-5 mm de diámetro con tamaños de partículas en el intervalo de 3-10 mm. Los ejemplos de fases estacionarias quirales adecuadas incluyen columnas basadas en celulosa y columnas de tipo Pirkle. Una columna quiral preferida
10 es la columna Chiralcel-OD-RH® disponible en Chiral Technology.

[0036] La elución del complejo de la columna con la fase móvil genera un complejo metálico en el que el anión de coordinación (que es un ligando competente) supera competitivamente todos los demás ligandos potenciales presentes para los sitios de coordinación disponibles en el metal. La composición de la fase móvil se puede variar
15 durante la elución para cumplir los objetivos de un experimento de cromatografía particular. Por lo tanto, se puede usar elución isocrática o con gradiente con el procedimiento de la invención. La fase móvil se pasa a través de la columna con un caudal determinado. La evaluación de estos factores y llegar a un caudal adecuado para los objetivos del procedimiento de HPLC, lo puede llevar a cabo el experto en la materia. La velocidad a la que eluirá el compuesto de la columna dependerá de la afinidad del complejo metálico por la fase móvil con respecto a su afinidad por la columna. Esto a su vez dependerá del tipo de columna usado en el procedimiento de la invención, la composición de la fase móvil, y el caudal de la fase móvil a través de la columna. El caudal adecuado para una columna dependerá de la naturaleza de la columna, incluyendo la longitud de la columna y la tolerancia de presión, los complejos metálicos particulares que se eluyen de la columna, y la composición de la fase móvil. En general, el caudal puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10,0 ml/min. Un caudal preferido
20 estaría entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 ml/min. Por ejemplo, para una columna de 25 cm SymmetryShield RP18® un caudal típico estará entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 ml/min. Un caudal preferido sería entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,2 ml/min. El caudal típico para una columna YMC ODS-AQ S5® que es de 5 cm de longitud está en el intervalo de 0,5 a 4 ml/min. El caudal preferido para una columna YMC ODS-AQ S5® está en el intervalo de 2 a 3 ml/min.
30

[0037] Después de eluir el complejo metálico de la columna, el compuesto se detecta mediante un detector. La detección se puede llevar a cabo mediante cualquier detector adecuado para cumplir los objetivos del procedimiento de HPLC. La detección se puede realizar mediante un detector "en línea" o un detector "fuera de línea". Un detector "en línea" como se usa en el presente documento, es un detector que está directamente acoplado a la columna y
35 detecta el complejo metálico cuando eluye de la columna. Un detector "fuera de línea", como se usa en el presente documento, es un detector que no está directamente acoplado a la columna, pero detecta el complejo metálico después de que se haya recogido y transferido manualmente al detector. Por lo tanto, la detección puede ser manual o automática. Se prefieren los detectores en línea para usar en la invención. Los ejemplos de detectores adecuados para los complejos metálicos incluyen, pero no se limitan a detectores de índice de refracción, detectores radioquímicos, detectores electroquímicos y detectores de espectroscopía de masas. Los detectores de absorción ultravioleta/visible son un tipo preferido de detector para usar en el procedimiento cromatográfico de la invención. Los detectores de absorción ultravioleta/visible incluyen detectores de longitud de onda fija, detectores de longitud de onda variable, y detectores de matriz de diodos. Los detectores de longitud de onda fija miden a una longitud de onda, típicamente 254 o 264 nm. Los detectores de longitud de onda variable miden a una longitud de onda cada
40 vez, mientras que los detectores de matriz de diodos miden un espectro de longitudes de onda simultáneamente. Se prefieren los detectores de UV de longitud de onda fija para usar en la invención.
45

[0038] Los procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución se usan ampliamente en procedimientos analíticos que son muy familiares para los expertos en la materia. La selección del equipo y parámetros adecuados
50 para un procedimiento de HPLC adecuados y el hacer las variaciones adecuadas en el procedimiento para cumplir los objetivos de un experimento particular, lo lleva a cabo fácilmente el experto en la materia. Los procedimientos de cada realización de la invención se pueden usar con cualquier máquina de HPLC, con la condición de que se use una columna quiral en la realización de HPLC quiral de la invención. El procedimiento de la presente invención se puede usar con HPLC de fase normal o inversa dependiendo de la selección de disolventes o columnas. Además,
55 los procedimientos de la presente invención no están limitados a ninguna escala particular, sin embargo, se prefiere que el procedimiento se lleve a cabo usando tamaños de muestras de complejos metálicos similares a los usados en la cromatografía líquida de alta resolución.

[0039] Por lo tanto, en cada realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento de HPLC en el

que se puede generar fácilmente una sola especie del o de los complejos metálicos presentes de modo que la detección y cuantificación de los complejos metálicos se puede realizar sin interferencia de otros complejos. Los siguientes ejemplos están previstos para ilustrar, pero no limitar, la invención.

5 EJEMPLOS

Procedimiento experimental para los ejemplos 1-8

Productos químicos, disolventes y materiales

10

[0040] Todos los disolventes usados en el estudio eran de calidad para HPLC o equivalentes. Todos los productos químicos eran de calidad reactivo ACS o equivalente.

Sistema de HPLC y análisis de datos

15

[0041] La cromatografía de HPLC se llevó a cabo usando un sistema Gilson (bomba modelo 306, detector de UV-V modelo 155, manipulador de líquidos modelo 215, Software Unipoint, Win98), un sistema Varian (bomba modelo 310, detector de UV-V modelo 340 UV-V, muestreador automático modelo 410 Star Workstation, Win98) o sistema SSI (bomba Acuflo Series IV, detector de UV-V Acutech 500, muestreador automático Alcott modelo 718, integrador HP modelo 3395).

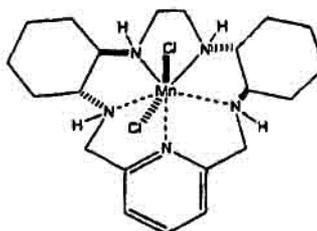
20

Ejemplo 1 (no forma parte de la invención)

Análisis de HPLC de M40403 usando el procedimiento 1

25

[0042]



M40403

30 **[0043]** Procedimiento 1: Columna analítica: Waters YMC ODS-AQ S5 120Å (4,6 x 50 mm); Sistema A: ácido trifluoroacético al 0,1% en H₂O; Sistema B: ácido trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo; Gradiente: 10-50% de Sistema B a lo largo de 10 min; Caudal: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265. Inyectados 20 µl de solución madre de M40403 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml de agua y diluyendo con 1 ml de Sistema A. El cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 1 se muestra en la figura 1.

35

Ejemplo 2

Análisis de HPLC de M40403 usando el procedimiento 2

40 **[0044]** Procedimiento 2: Columna analítica: Waters YMC 9DS-AQ S5 120Å (4,6 x 50 mm); Sistema A: NaCl acuoso 0,5 N; Sistema B: agua/CH₃CN 1:4; Gradiente: 10-50% de Sistema B a lo largo de 9 min; Caudal: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265 nm. Inyectados 20 µl de solución madre de M40403 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml del Sistema A. El cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 2 se muestra en la figura 2.

45 **Ejemplo 3**

Análisis de HPLC de M40403 usando el procedimiento 3

[0045] Procedimiento 3: Columna analítica: Waters Symmetry Shield RP18, 5 μm , 250 x 4,6 mm; Fase móvil: acetonitrilo: cloruro de tetrabutilamonio 0,125 M en agua (pH 6,5), 5%: 95% H_2O (v/v); Caudal: 1 ml/min; Longitud de onda de detección: 265 nm. Inyectados 20 μl de solución madre de M40403 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml de fase móvil. El cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 3 se muestra en la figura 3.

5

[0046] El cromatograma de HPLC de M40403 y compuestos relacionados usando el procedimiento 3 se muestra en la figura 3a. El procedimiento 3 permite una separación de M40402 (bisimina de M40403), M40414 (monoimina de M40403) y M40475 (ligando libre de M40403) (véase el cromatograma en la figura 3a).

10 **Ejemplo 4**

Análisis de HPLC de M40403 usando el procedimiento 4

[0047] Procedimiento 4: Columna analítica: Waters Symmetry Shield RP18, 5 μm , 250 x 4,6 mm; Fase móvil: 15 acetonitrilo: cloruro de tetrabutilamonio 0,125 M y LiCl 0,5 M en agua (pH 6,5), 5%: 95% H_2O (v/v); Caudal: 1 ml/min; Longitud de onda de detección: 265 nm. Inyectados 20 μl de solución madre de M40403 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml del Sistema A. El cromatograma de HPLC de M40403 usando el procedimiento 4 se muestra en la figura 4.

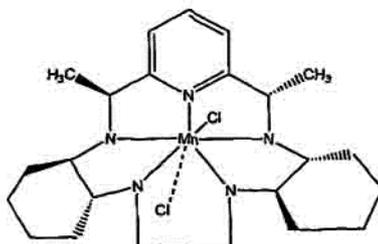
[0048] El cromatograma de HPLC de M40403 y compuestos relacionados usando el procedimiento 4 se muestra 20 en la figura 4a. El procedimiento 4 permite la separación de M40402 (bisimina de M40403), M40414 (monoimina de M40403) y M40475 (ligando libre de M40403) y todos los diastereoisómeros de M40403 (véase el cromatograma en la figura 4a).

Ejemplo 5

25

Análisis de HPLC de M40401 usando el procedimiento 1

[0049]



M40401

30

[0050] Procedimiento 1: Columna analítica: Waters YMC ODS-AQ S5 120Å (4,6 x 50 mm); Sistema A: ácido 35 trifluoroacético al 0,1% en H_2O ; Sistema B: ácido trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo; Gradiente: 10-50% de Sistema B a lo largo de 10 min; Caudal: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265. Inyectados 20 μl de solución madre de M40401 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml de agua y diluyendo con 1 ml del Sistema A. El cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 1 se muestra en la figura 5.

Ejemplo 6

40 HPLC con diferentes concentraciones de NaCl:

[0051] Se llevó a cabo una HPLC de M40401 con diferentes concentraciones de NaCl. Columna analítica: Waters 45 YMC 9DS-AQ S5 120 A (4,6 x 50 mm); Sistema A: (A) H_2O (sin NaCl); (B) NaCl 0,01 M en agua; (C) NaCl 0,5 M en agua; Sistema B: acetonitrilo; Gradiente: 0-100% de Sistema B a lo largo de 10 min; Flujo: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265 nm. Inyectados 20 μl de solución madre de M40401 preparada disolviendo 1 mg en ml del Sistema A. El cromatograma de HPLC de M40401 usando diferentes concentraciones de NaCl se muestra en la figura 6.

Ejemplo 7

Análisis de HPLC de M40401 usando el procedimiento 2

[0052] Procedimiento 2: Columna analítica: Waters YMC ODS-AQ S5 120Å (4,6 x 50 mm); Sistema A: NaCl acuoso 0,5 N; Sistema B: agua/CH₃CN 1:4; Gradiente 1: 10-50% del Sistema B a lo largo de 9 min; Caudal: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265 nm. Inyectados 20 µl de solución madre de M40403 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml del Sistema A.

[0053] El cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 2 se muestra en la figura 7. El procedimiento 2 permite una separación de M40472 (bisimina de M40401), M40473 (monoimina de M40401), ligando libre de M40403 y dos isómeros de M40401 (M40406, M40404).

Ejemplo 8

15 Análisis de HPLC de M40401 usando el procedimiento 3

[0054] Procedimiento 3: Columna analítica: Waters Symmetry Shield RP18, 5 m, 250 x 4,6 mm; Fase móvil: acetonitrilo: cloruro de tetrabutilamonio 0,125 M en H₂O (pH 6,5), 5:95% H₂O (v/v); Caudal: 1 ml/min; Longitud de onda de detección: 265 nm.

[0055] El cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 3 se muestra en la figura 8. El procedimiento 3 permite una separación de M40472 (bisimina de M40401), M40473 (monoimina de M40401), ligando libre de M40403 y dos isómeros de M40401 (M40406, M40404).

Ejemplo 9

Análisis de HPLC de M40401 usando el procedimiento 4

[0056] Procedimiento 4: Columna analítica: Waters Symmetry Shield RP18, 5 µm, 250 x 4,6 mm; Fase móvil: acetonitrilo: cloruro de tetrabutilamonio 0,125 M y LiCl 0,5 M en agua (pH 6,5), 5:95% H₂O (v/v); Caudal: 1 ml/min; Longitud de onda de detección: 265 nm; Inyectados 20 µl de solución madre de M40401 preparada disolviendo 1 mg en 1 ml de una fase móvil. El cromatograma de HPLC de M40401 usando el procedimiento 4 se muestra en la figura 9.

[0057] El cromatograma de HPLC de M40401 y compuestos relacionados usando el procedimiento 4 se muestra en la figura 9a. El procedimiento 4 permite la separación de M40472 (bisimina de M40401), M40473 (monoimina de M40401), ligando libre de M40403 y dos isómeros de M40401 (M40406, M40404).

Ejemplo 10

40 HPLC de M40403-(HCOO⁻)₂ usando anión formiato

[0058] Se llevó a cabo una HPLC de M40403 usando el anión formiato.

[0059] Columna analítica: Waters YMC 9DS-AQ S5 120 A (4,6 x 50 mm); Sistema A: formiato amónico 0,025 M en agua; Sistema B: 1:4 = formiato amónico 0,125 M en agua/acetonitrilo; Gradiente: 0-100% del Sistema B a lo largo de 10 min; Flujo: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265 nm. Inyectados 20 µl de solución madre de M40403-(formiato)₂ preparada disolviendo 1 mg en 1 ml del Sistema A.

[0060] El cromatograma de HPLC de M40403-(HCOO⁻)₂ se muestra en la figura 10.

Ejemplo 11 (no es parte de la invención)

55 HPLC de M40403-(OAc)₂ usando anión acetato

[0061] Se llevó a cabo una HPLC de M40403 usando el anión acetato.

[0062] Columna analítica: Waters YMC 9DS-AQ S5 120 A (4,6 x 50 mm);

Sistema A: acetato amónico 0,025 M en agua; Sistema B: 1:4 = acetato amónico 0,125 M en agua/acetonitrilo; Gradiente: 0-100% del Sistema B a lo largo de 10 min; Flujo: 3 ml/min; Longitud de onda del detector: 265 nm. Inyectados 20 μ l de solución madre de M40403-(OAc)₂ preparada disolviendo 1 mg en 1 ml del Sistema A.

5

[0063] El cromatograma de HPLC de M40403-(OAc)₂ se muestra en la figura 11.

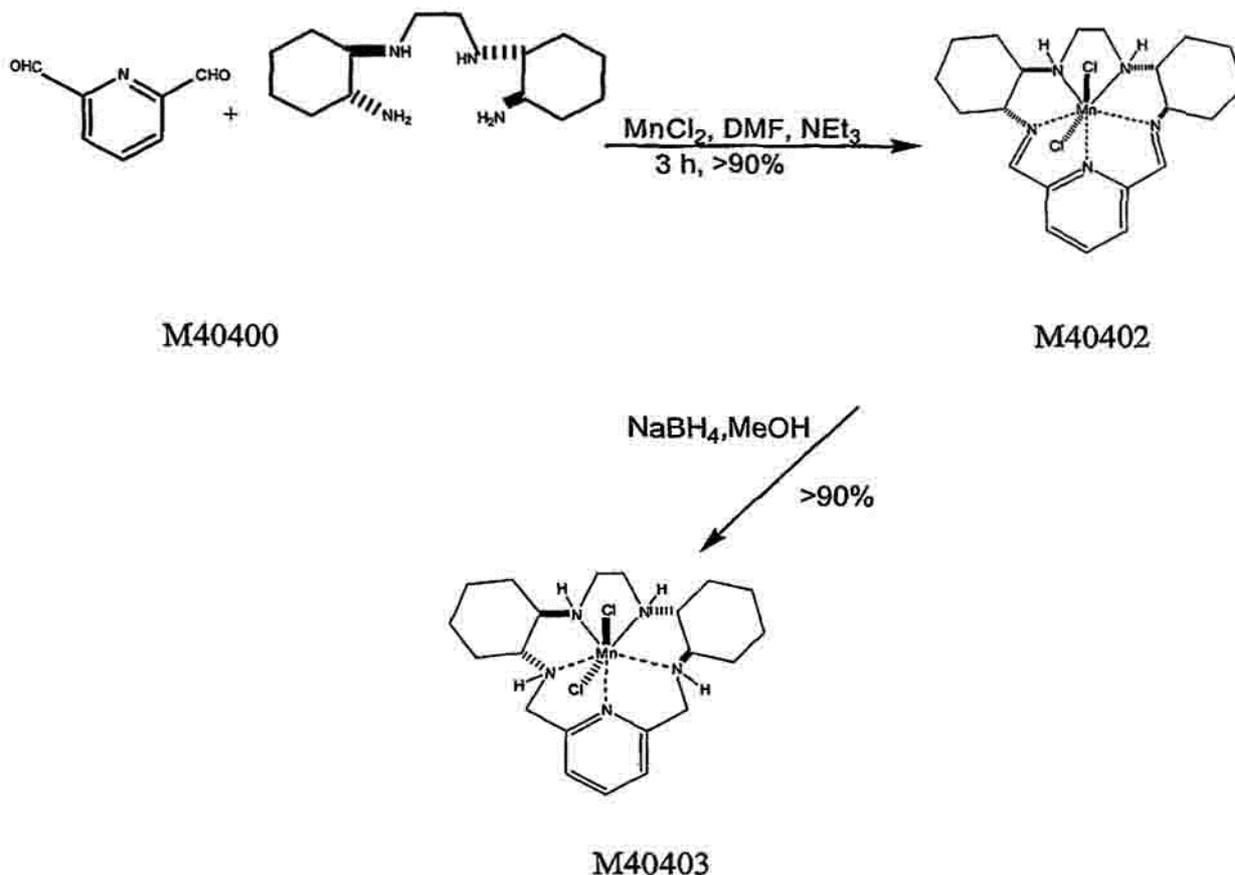
Ejemplo 12 (no es parte de la invención)

- 10 [0064] Un procedimiento de HPLC para separar los diastereoisómeros del compuesto mimético de superóxido dismutasa M40403. Se prepararon cuatro mezclas de estereoisómeros (parte A) como se muestra en los esquemas 5-9 y después se separaron (parte B) por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa.

Parte A: Síntesis de los estereoisómeros de M40403

15

[0065] M40403 se sintetiza a partir de su isómero individual, el precursor de tetraamina de M40400 en la reacción mostrada en el esquema 7.

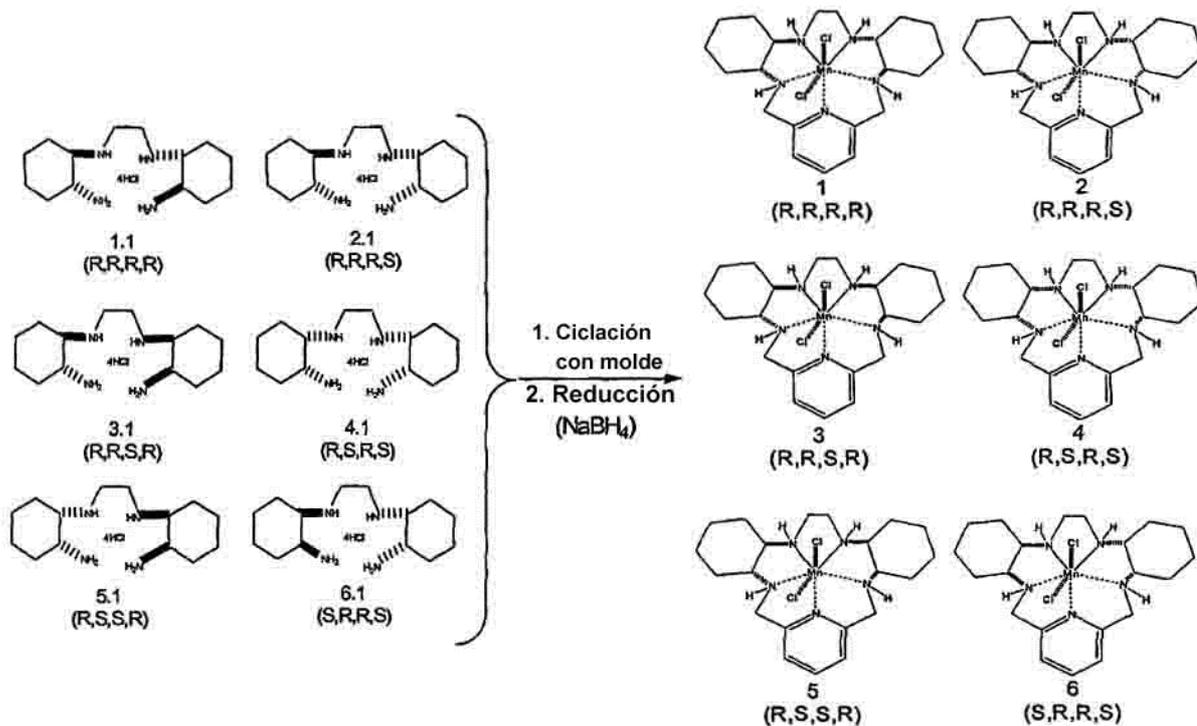


20

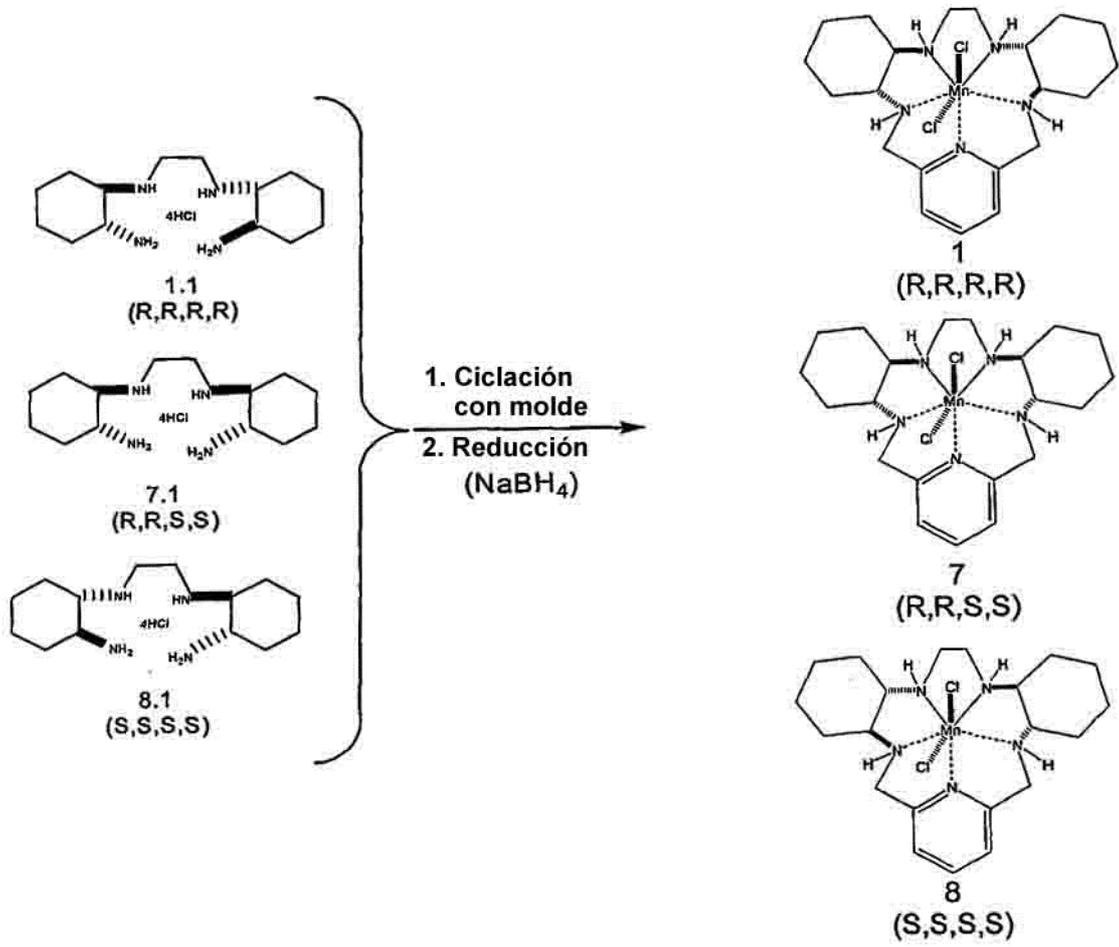
Esquema 7

- [0066] Los diferentes estereoisómeros de M40403 se sintetizan a partir de diferentes isómeros de 1,2-diaminociclohexano que proporciona los centros de carbonos quirales en M40403. Los isómeros del 1,2-diaminociclohexano usados para preparar la mezcla de estereoisómeros de M40403 (R,R + R,S) del Grupo 1, se muestran en el esquema 6. De forma similar, los isómeros del 1,2-diaminociclohexano usados para preparar la mezcla de estereoisómeros de M40403 (R,R + S,S) del Grupo 2, se muestran en el esquema 7. Los isómeros del

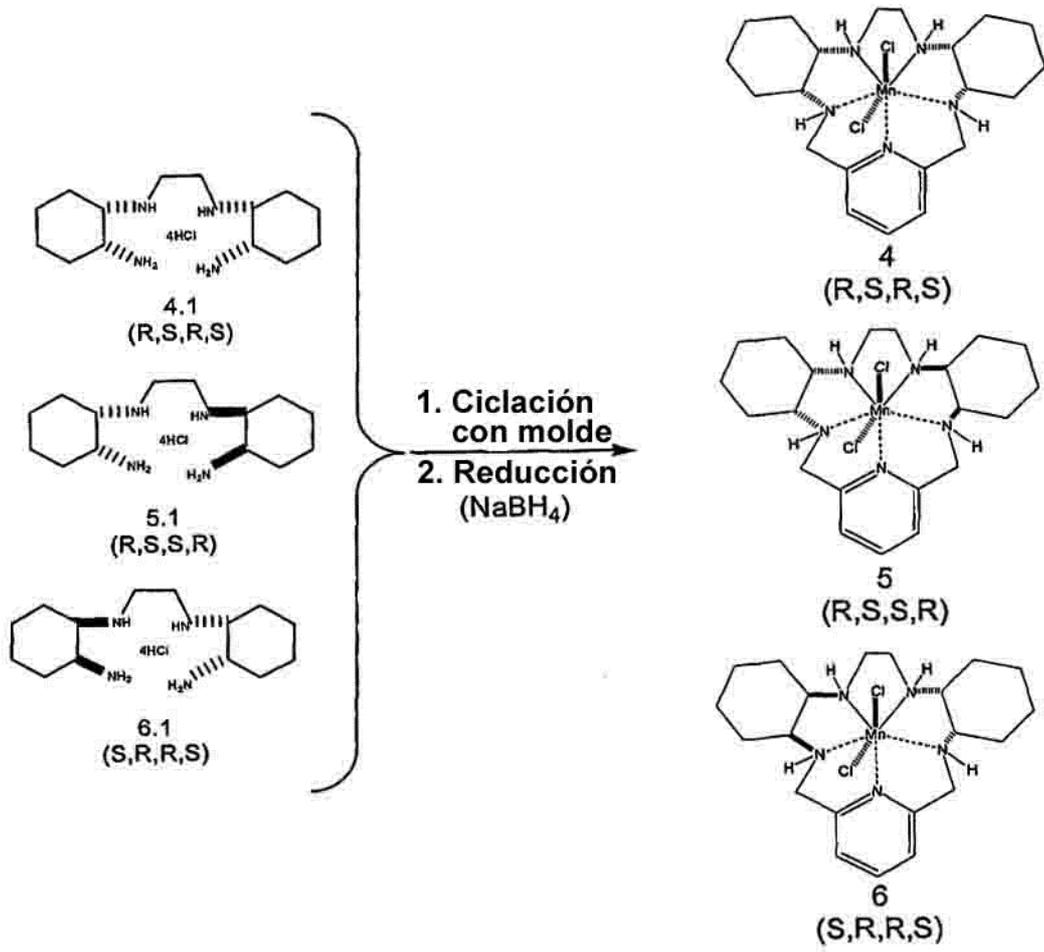
1,2-diaminociclohexano usados para preparar la mezcla de estereoisómeros de M40403 (R,S + R,S) del Grupo 3, se muestran en el esquema 8. Los isómeros del 1,2-diaminociclohexano usados para preparar la mezcla de estereoisómeros de M40403 (S,S + R,S) del Grupo 4, se muestran en el esquema 9. Como se muestra en los esquemas 6-9, los diastereoisómeros de M40403 se preparan por ciclación con molde, seguido de reducción con 5 borohidruro de sodio.



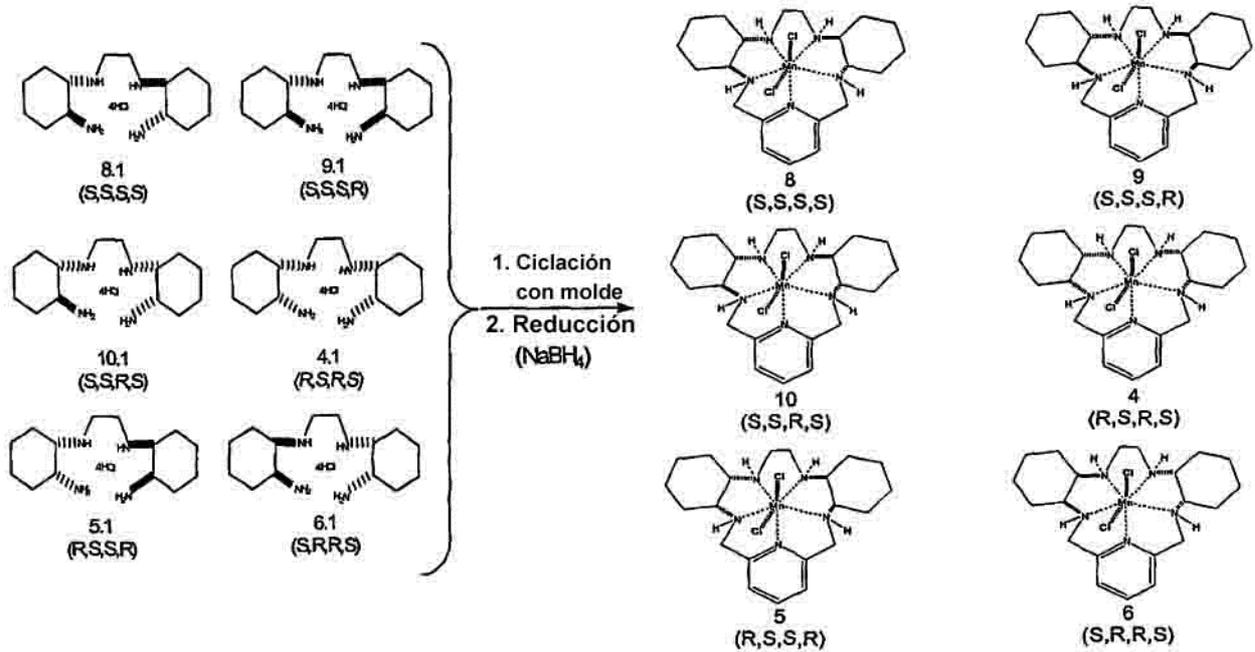
Esquema 8



Esquema 9



Esquema 10



Esquema 11

5

Tabla 1

Tabla 1.		Mezclas de estereoisómeros de M40403		
Grupo 1	Compuesto	ID	Relación de enantiómeros	Cromatograma de HPLC previsto
		1	1 y 8	Grupo 1
R, R, + R, S	R, R, R, R = S, R, R, R	2	2 y 9	5 picos
	R, R, S, R = R, S, R, R	3	3 y 10	(3 estereoisómeros individuales,
	R, S, R, S = S, R, S, R	4	4-meso	1 isómero meso,
	R, S, S, R	5	5 y 6	1 pareja de enantiómeros)
	S, R, R, S	6		
Grupo 2				Grupo 2
	R, R, R, R	1		2 picos
R, R + S, S	R, R, S, S = S, S, R, R	7	7-meso	(1 pareja de enantiómeros,
	S, S, S, S	8		1 isómero meso)
Grupo 3				Grupo 3
	R, S, R, S = S, R, S, R	4		2 picos
R, S + R, S	R, S, S, R	5		(1 isómero meso,
	S, R, R, S	6		1 pareja de enantiómeros)
Grupo 4				Grupo 4
	S, S, S, S	8		5 picos
S, S + R, S	S, S, S, R = R, S, S, S	9		(3 estereoisómeros individuales,
	S, S, R, S = S, R, S, S	10		1 isómero meso,
	R, S, R, S = S, R, S, R	4		1 pareja de enantiómeros)
	R, S, S, R	5		
	S, R, R, S	6		

4 Centros de carbonos quirales = $2^4 = 16$ estereoisómeros teóricos debido a la simetría C_2 de la molécula - 10 posibles estereoisómeros

4 parejas con relación enantiómera y 2 isómeros meso

HPLC (normal): Grupo 1 y grupo 2 - el mismo perfil de cromatografía (número de picos y tiempos de retención)

Grupo 1 menos grupo 3 - se pueden asignar isómeros con un centro quiral S

Parte B: Separación de mezclas de estereoisómeros

Productos químicos, materiales y procedimientos

5

[0067] El cloruro de tetrabutilamonio hidrato (98%, 34.585-7) se adquirió en Aldrich Chemical Company. El cloruro de sodio (99,6%, S-9888) se adquirió en Sigma Chemical Company. Todos los demás disolventes (calidad para HPLC salvo que se indique otra cosa) y reactivos se adquirieron en Fisher Scientific y eran de la calidad más alta posible. La columna RP₁₈ SymmetryShield® (4,6 mm x 250 mm, tamaño de partículas de 5 µm) y su correspondiente precolumna se adquirieron en Waters Corporation.

10

Experimentos de HPLC de fase inversa

Preparación de soluciones de referencia

15

[0068] La fase móvil A de HPLC era una solución acuosa que consistía en cloruro de tetrabutilamonio 0,125 M (TBAC) y LiCl 0,5 M, preparada por adición de cloruro de tetrabutilamonio hidrato (36,99 g) y LiCl sólido (21,2 g) a un matraz aforado de 1 litro, dilución hasta el volumen con agua Millipore, e inversión del matraz varias veces para obtener una solución homogénea. La solución resultante se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 µm antes de usar. La fase móvil B era acetonitrilo de calidad para HPLC. Las muestras de cada grupo de diastereoisómeros para el análisis por HPLC-UV se prepararon con concentraciones de ~ 3,0 mg/ml en una mezcla 50:50 de LiCl 0,5 M en MeOH:Fase móvil A.

20

Condiciones cromatográficas

25

[0069] La columna usada para los experimentos de HPLC era la columna RP₁₈ SymmetryShield®, 4,6 mm x 250 mm, tamaño de partículas de 5 µm (Waters Corporation). Las separaciones se lograron con condiciones de flujo isocrático usando una fase móvil compuesta de 95% de fase móvil A y 5% de acetonitrilo (fase móvil B en un sistema de bomba doble). El caudal era 1,0 ml/min, usando un tiempo de ejecución de 15 minutos, y la longitud de onda de detección era 265 nm. El volumen de inyección de cada muestra era 20 µl.

30

[0070] La figura 12 contiene los cromatogramas que resultan de los análisis de HPLC de las mezclas de diastereoisómeros de los Grupos 1-4. La tabla 1 resume los resultados previstos de los análisis de HPLC de las mezclas de diastereoisómeros de los Grupos 1-4. El cromatograma que resulta del análisis de HPLC de la mezcla de estereoisómeros (R,R+R,S) de M40403 del Grupo 1 muestra solo 5 picos, aunque hay un total de 6 estereoisómeros producidos. Sin embargo, de los 6 estereoisómeros producidos, los compuestos 5 y 6 tienen relación de enantiómeros. Como resultado tienen las mismas características de adsorción y eluyen como un solo pico.

35

[0071] El cromatograma que resulta del análisis de HPLC de la mezcla de estereoisómeros (R,R+R,S) de M40403 del Grupo 2 muestra solo 2 picos, aunque hay un total de 3 estereoisómeros producidos. De los 3 estereoisómeros producidos, los compuestos 1 y 8 tienen relación de enantiómeros. Como resultado tienen las mismas propiedades de adsorción y eluyen como un solo pico.

40

[0072] Igualmente, el cromatograma que resulta del análisis de HPLC de la mezcla de estereoisómeros (R,S+R,S) de M40403 del Grupo 3 muestra solo 2 picos, aunque hay un total de 3 estereoisómeros producidos. De los 3 estereoisómeros producidos, los compuestos 5 y 6 tienen relación de enantiómeros y eluyen como un solo pico.

45

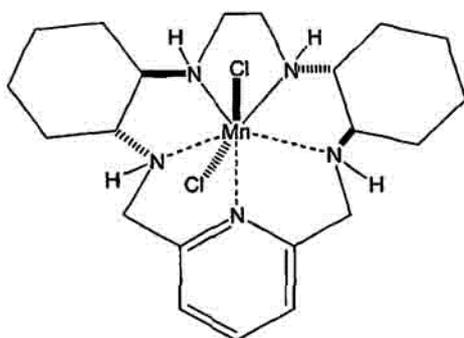
[0073] El cromatograma que resulta del análisis de HPLC de la mezcla de estereoisómeros (S,S+R,S) de M40403 del Grupo 4 muestra solo 5 picos, aunque hay un total de 6 estereoisómeros producidos. De los 6 estereoisómeros producidos, los compuestos 5 y 6 tienen relación de enantiómeros y eluyen como un solo pico.

50

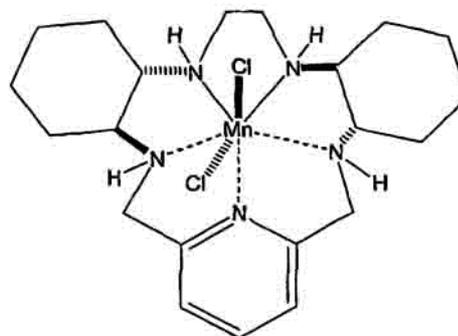
Ejemplo 13 (no es parte de la invención)

[0074] Se usó el siguiente procedimiento de HPLC quiral para separar los enantiómeros todo-R y todo-S de M40403 y M40419:

55

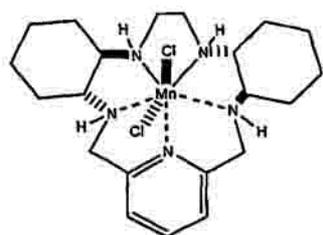


M40403

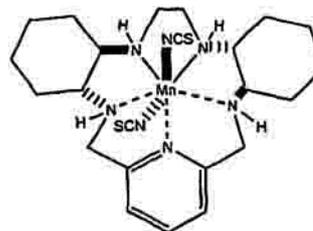
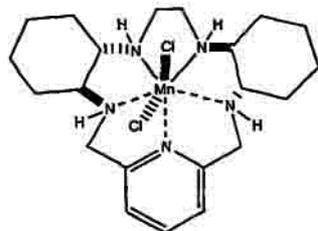


M40419

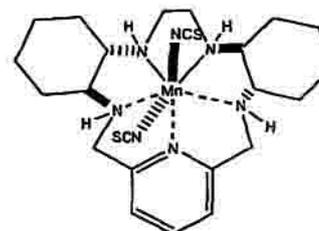
[0075] Primero los complejos se convirtieron en sus correspondientes formas de bis(tiocianato) por reacciones de intercambio de ligandos con KSCN, como se muestra en el esquema 10. Los derivados de $(\text{SCN})_2$ de M40403 y 5 M40419 resultantes después se separaron por HPLC quiral.



M40403

M40403-(SCN)₂

M40419

M40419-(SCN)₂

10

Esquema 12

Productos químicos, materiales y procedimientos

Preparación de complejos de bis(tiocianato) de M40403 y M40419, respectivamente.

15

[0076] M40403 $(\text{SCN})_2$: El complejo de M40403 (5,0 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1,0 ml de H_2O . A esta solución se añadió KSCN (49,0 mg, 0,5 mmol) para llevar su concentración a 0,5 M. Se formó inmediatamente un precipitado blanco tras la adición de KSCN. La reacción se mezcló enérgicamente durante 60 min a temperatura ambiente, y la suspensión resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 1,0 ml). Los extractos de CH_2Cl_2 combinados después se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron para dar el producto en forma de un sólido blanco. El producto se disolvió en MeOH (2,5 ml), y se mezclaron partes alícuotas de la solución de MeOH en una relación 1:1 con la fase móvil de HPLC (NH_4SCN 0,26 M en MeOH) antes de inyección.

20

[0077] M40419 (SCN)₂: El complejo de M40419 (5,0 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1,0 ml de H₂O. A esta solución se añadió KSCN (49,0 mg, 0,5 mmol) para llevar su concentración a 0,5 M. Se formó inmediatamente un precipitado blanco tras la adición de KSCN. La reacción se mezcló enérgicamente durante 60 min a temperatura ambiente, y la suspensión resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 1,0 ml). Los extractos de CH₂Cl₂ combinados después se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar el producto en forma de un sólido blanco. El producto se disolvió en MeOH (2,5 ml), y se mezclaron partes alícuotas de la solución de MeOH en una relación 1:1 con la fase móvil de HPLC (NH₄SCN 0,26 M en MeOH) antes de inyección.

10 Preparación de soluciones de referencia

[0078] La fase móvil de HPLC era una solución de NH₄SCN 0,2 M en MeOH, preparada añadiendo 2,0 g de NH₄SCN en 100 ml de MeOH (calidad para HPLC). La solución de la fase móvil se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 µm (Osmonics) antes de usar.

15

Condiciones cromatográficas

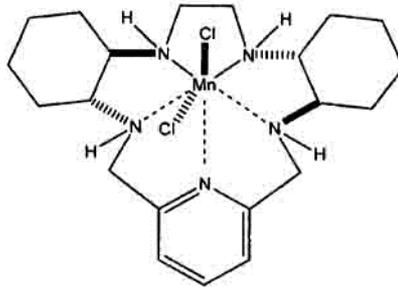
[0079] La columna usada para el experimento de HPLC quiral era la columna Chiralcel OD-RH, 4,6 mm x 150 mm, tamaño de partículas de 5 µm (Chiral Technologies). Las separaciones se lograron usando un flujo isocrático simple con un caudal de 0,5 ml/min. La longitud de onda de detección era 265 nm, y el volumen de inyección de cada muestra era 20 µl.

[0080] Los perfiles de la HPLC quiral de los enantiómeros de bis(tiocianato) de M40403 y M40419 se muestran en la figura 13. Los perfiles de la HPLC quiral de los enantiómeros M4043-(SCN)₂ y M40419(SCN)₂ se muestran por separado en los perfiles A y B. Como se pone de manifiesto en los perfiles, el enantiómero todo-R de M40403-(SCN)₂ tiene un tiempo de retención (t_R) de 6,8 min, mientras que su imagen especular todo-S de M40419-(SCN)₂ tiene un tiempo de retención de 6,5 min. Los enantiómeros se analizaron por experimento de coinyección para confirmar que se han resuelto verdaderamente en estas condiciones cromatográficas. El perfil de HPLC resultante para los enantiómeros coinyectados se muestra en el perfil C. Los enantiómeros se separaron durante aproximadamente 0,3 min, confirmando así los resultados iniciales.

30

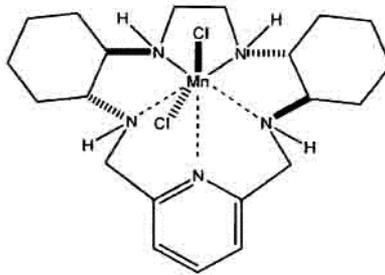
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cromatografía líquida de alta resolución que comprende:
- 5 cargar una solución que contiene complejos metálicos en una columna, en el que los complejos metálicos se seleccionan de compuestos miméticos de superóxido dismutasa, agentes potenciadores de imagenología por IRM, miméticos de catalasa y catalizadores de descomposición de peroxinitrito,
- 10 eluir los complejos metálicos de la columna con una fase móvil, comprendiendo dicha fase móvil una sal de un anión de coordinación en un sistema de disolventes, estando la cantidad de la sal del anión de coordinación en exceso suficiente para que el anión de coordinación sature todos los sitios de unión de ligandos intercambiables en el metal de los complejos metálicos, dirigiendo la formación de una especie única durante la elución con la fase móvil, y
- 15 detectar los complejos metálicos con un detector, en el que la sal comprende al menos una sal seleccionada de cloruro de sodio, cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de tetrabutilamonio, tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, tiocianato de amonio, tiocianato de litio, acetato de potasio, acetato de sodio, trifluoroacetato de amonio, acetato de litio, formiato de potasio, formiato de sodio, formiato de amonio, formiato de litio, cianato de sodio, cianato de potasio, cianato de amonio, carboxilato de potasio, carboxilato de sodio, estearato de litio, estearato de sodio, azida de sodio, azida de potasio o azida de litio.
- 20 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos se seleccionan de complejos de manganeso y complejos de hierro.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden
- 25 diferentes complejos metálicos.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden estereoisómeros del mismo complejo metálico.
- 30 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden diastereoisómeros del mismo complejo metálico.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden enantiómeros del mismo complejo metálico.
- 35 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden productos de una corriente de reacciones.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos se seleccionan
- 40 del grupo que consiste en complejos de Fe^{III}(salen), derivados de Fe^{III}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano), complejos de Fe^{III}(porfirinato), complejos de Mn^{III}(porfirinato), complejos de Mn^{III}(salen) y complejos de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano).
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los complejos metálicos se seleccionan
- 45 de un grupo que consiste en complejos de Mn^{III}(porfirinato), complejos de Mn^{III}(salen) y complejos de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano).
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los complejos metálicos comprenden
- 50 complejos de Mn^{II}(1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano).
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los complejos metálicos comprenden estereoisómeros de un complejo metálico que tiene la siguiente estructura:

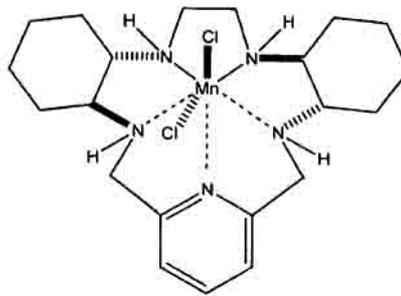


12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los complejos metálicos comprenden enantiómeros seleccionados de las siguientes estructuras:

5

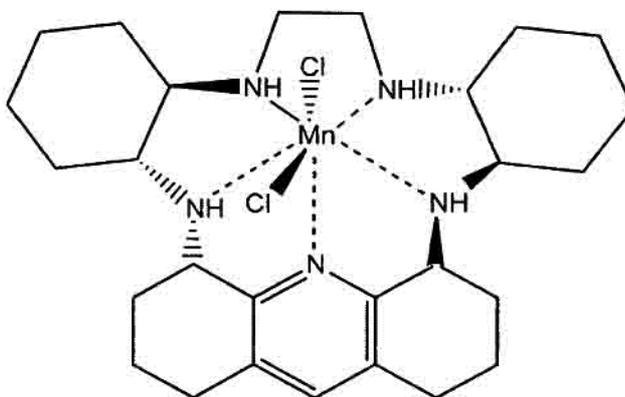


y



10

13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los complejos metálicos tienen la siguiente estructura:

**M40484**

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema de disolventes comprende una mezcla de disolventes.
- 5
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el sistema de disolventes comprende al menos un disolvente seleccionado de acetonitrilo, dioxano, etano, metanol, isopropanol, tetrahidrofurano o agua.
16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el sistema de disolventes comprende una mezcla de acetonitrilo y agua.
- 10
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el sistema de disolventes comprende una mezcla de metanol y agua.
- 15
18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal está presente en la fase móvil en una concentración de entre 0,004 M a 6 M, preferiblemente entre 0,1 M y 1 M, por ejemplo, entre 0,15 M y 0,6 M.
19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal es cloruro de sodio y está presente en la fase móvil en una concentración de entre 0,1 M y 1 M, preferiblemente entre 0,3 M y 0,7 M, por ejemplo, entre 0,4 M y 0,6 M.
- 20
20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal es cloruro de tetrabutilamonio y está presente en la fase móvil en una concentración de entre 0,005 M y 0,15 M, preferiblemente entre 0,01 M y 0,13 M, por ejemplo entre 0,05 M y 0,125 M.
- 25
21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fase móvil está a un pH de entre 6 y 8 y comprende:
- (a) acetonitrilo en agua que contiene entre 0,1 M y 0,7 M de sal; o
- 30 (b) metanol en agua que contiene entre 0,15 M y 0,6 M de sal.
22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fase móvil está a un pH de entre 6,0 y 7,5 y comprende:
- 35 (i) acetonitrilo que contiene cloruro de sodio entre 0,3 M y 0,7 M; o
- (ii) acetonitrilo al 5-15% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,01 M y 0,13 M; o
- (iii) acetonitrilo al 5-15% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,01 M y 0,13 M y cloruro de litio entre 0,3 M y 0,7 M.
- 40
23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fase móvil está a un pH de entre 6,4 y 7,2 y comprende:

- (iv) acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene cloruro de sodio entre 0,4 M y 0,6 M; o
- (v) acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,05 M y 0,125 M; o
- (vi) acetonitrilo al 5-10% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,05 M y 0,125 M y cloruro de litio entre 0,4 M y 0,6 M.

5

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fase móvil comprende:

- (vii) metanol al 1-5% en agua que contiene tiocianato de amonio entre 0,1 M y 2,5 M; o
- (viii) metanol al 1-5% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,05 M y 0,3 M; o
- 10 (ix) metanol al 1-5% en agua que contiene tiocianato de amonio entre 0,2 M y 0,3 M; o
- (x) metanol al 1-5% en agua que contiene cloruro de tetrabutilamonio entre 0,05 M y 0,15 M.

25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la columna es una columna modificada C1, una columna modificada C3, una columna modificada C4, una columna modificada con octilo (C8), una columna modificada con octadecilo (C18), una columna de polímero C18, una columna de fenilo o una columna de amino-ciano, preferiblemente una columna de octadecilo, una columna de fenilo o una columna de amino-ciano.

15

26. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la columna comprende una columna quiral, por ejemplo una columna de tipo Pirkle o una columna de celulosa.

20

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el detector comprende un detector de UV.

Figura 1

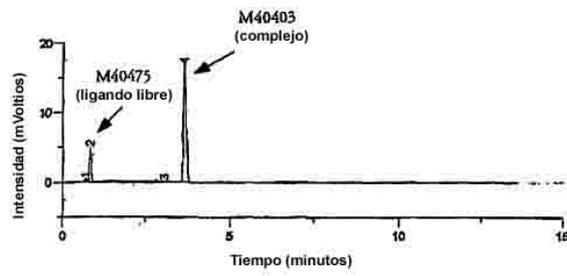


Figura 2

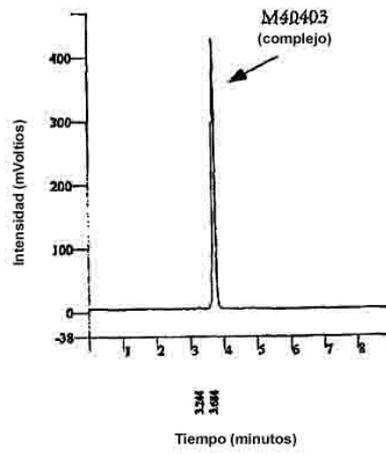


Figura 3

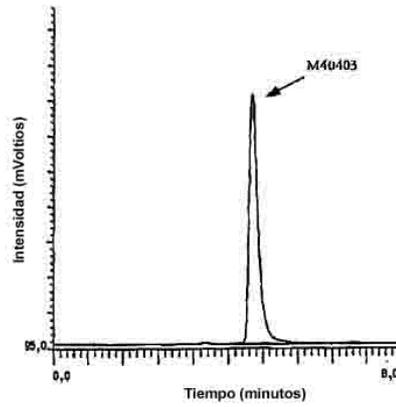


Figura 3a

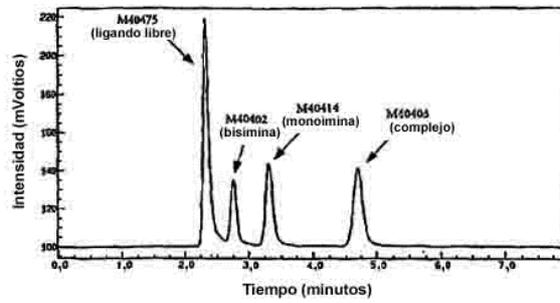


Figura 4

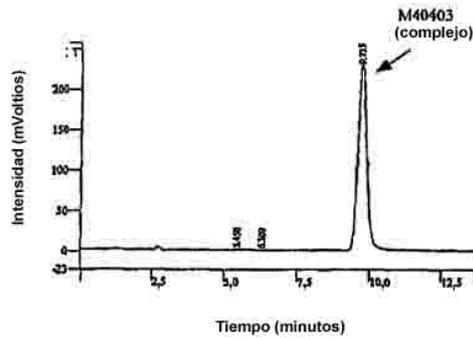


Figura 4a

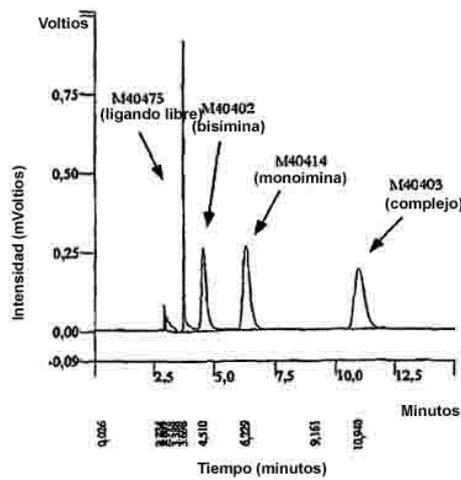


Figura 5

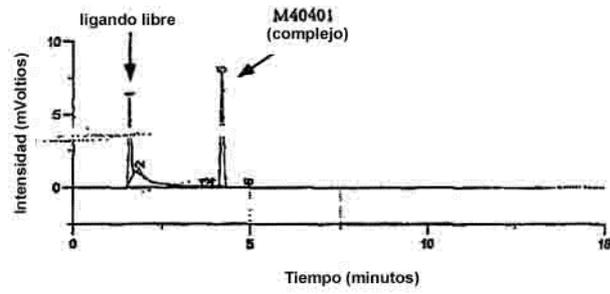
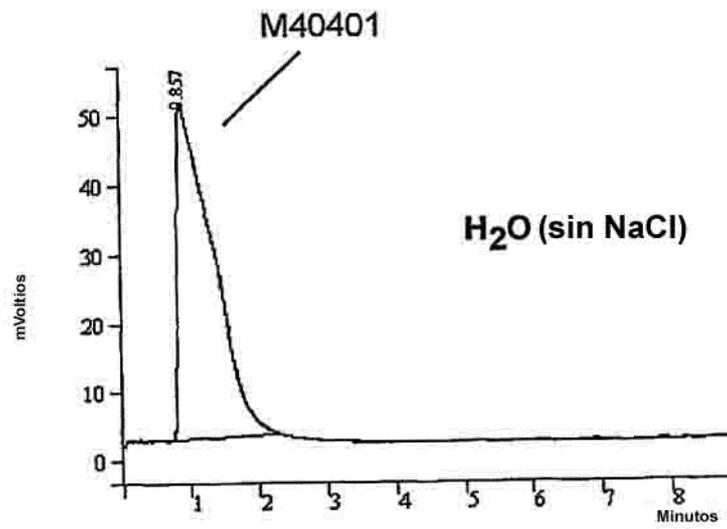
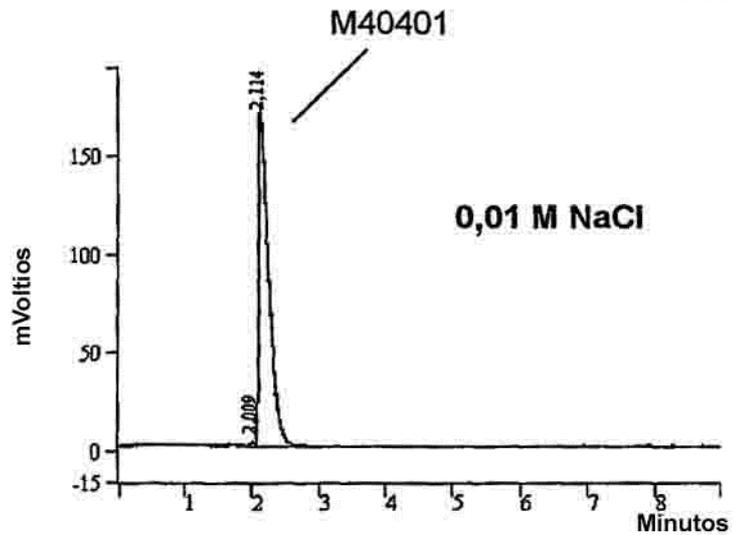
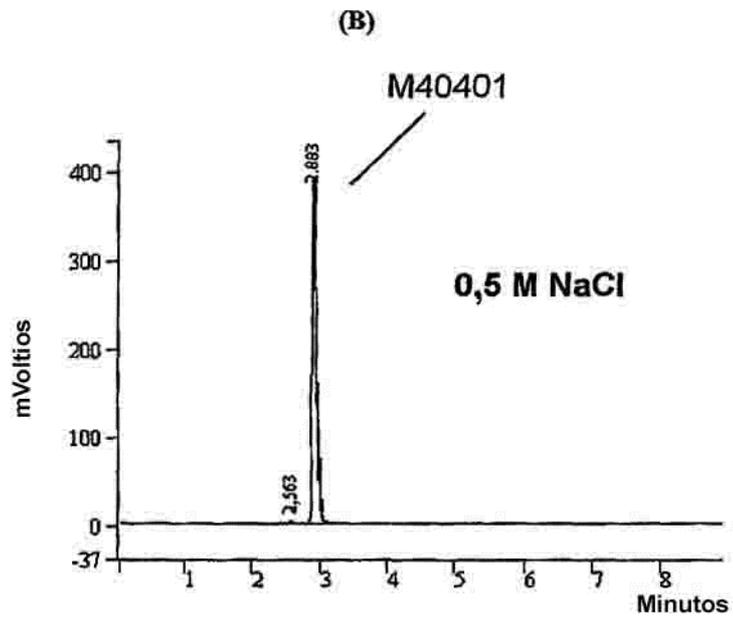


Figura 6

(A)





(C)

Figura 7

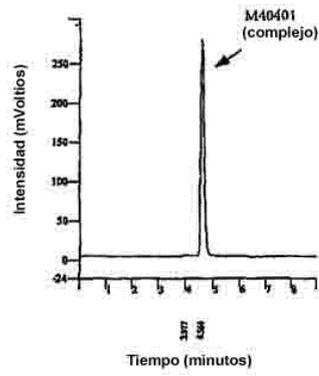


Figura 8

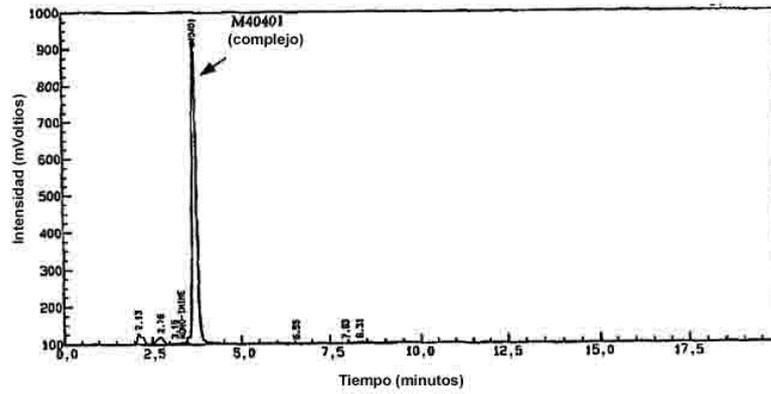


Figura 9

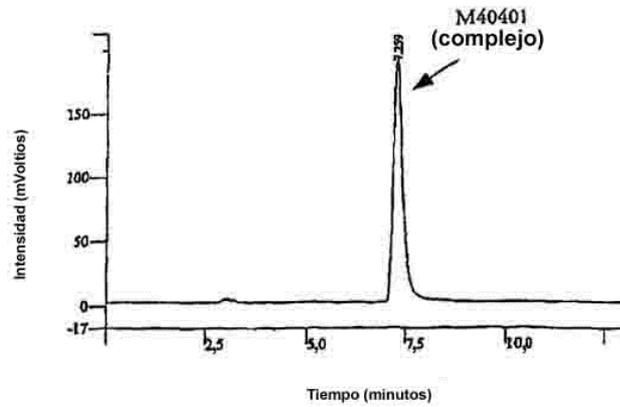


Figura 9a

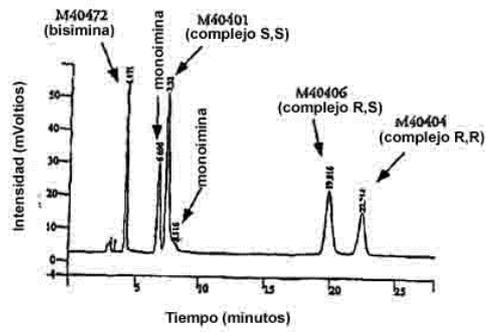


Figura 10

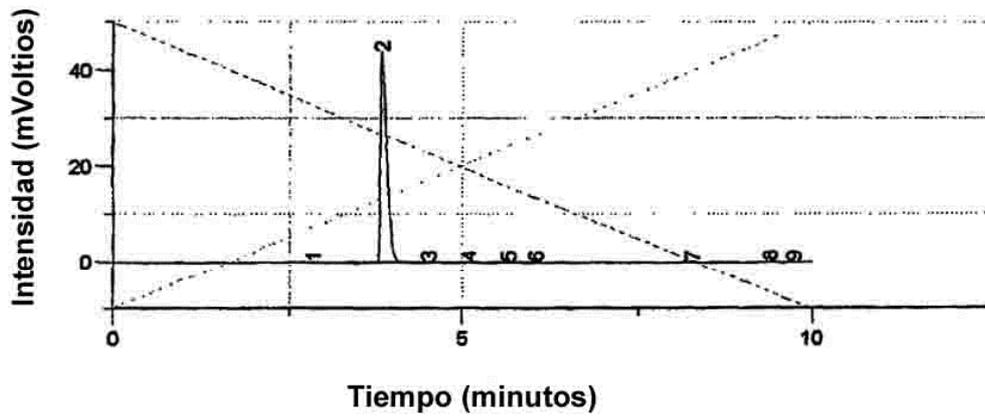


Figura 11

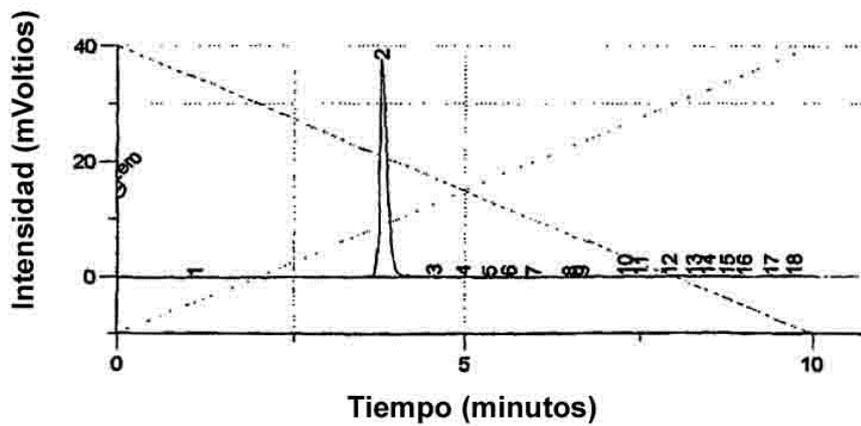


Figura 12

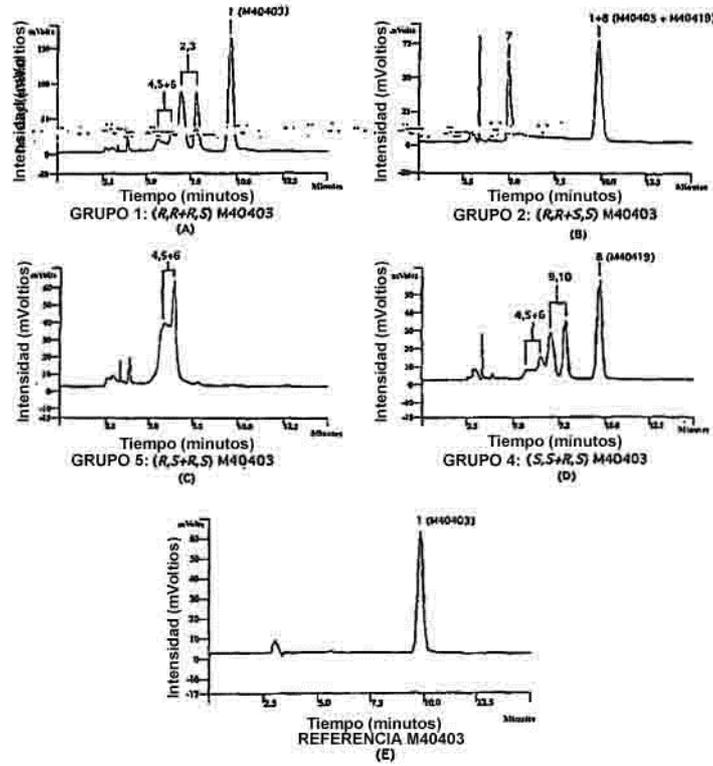


Figura 13

