

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 165**

51 Int. Cl.:

A61K 49/10 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 471/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010** **PCT/EP2010/070029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011** **WO11073371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010** **E 10805224 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2512524**

54 Título: **Quelatos de manganeso y su uso como agentes de contraste en estudios de imagen por resonancia magnética (IRM)**

30 Prioridad:

18.12.2009 NO 20093555

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

23.03.2017

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE AS (100.0%)
Nycoveien 1-2 P.O. Box 4220 Nydalen
0401 Oslo, NO

72 Inventor/es:

MEIJER, ANDREAS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 165 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

Quelatos de manganeso y su uso como agentes de contraste en estudios de imagen por resonancia magnética (IRM)

La invención se refiere a quelatos de manganeso (II), a dichos quelatos de manganeso (II) unidos a otras moléculas y a su uso como agentes de contraste en estudios de imagen por resonancia magnética (IRM).

5 La IRM es una técnica de imagen médica en la que se visualizan áreas del cuerpo a través de los núcleos de átomos seleccionados, especialmente núcleos de hidrógeno. La señal de IRM depende del entorno que rodea a los núcleos visualizados y de sus tiempos de relajación longitudinal y transversal, T1 y T2. De esta manera, en el caso en el que el núcleo visualizado sea un protón, la intensidad de señal de IRM dependerá de factores tales como la densidad de protones y el entorno químico de los protones. A menudo se usan agentes de contraste en IRM con el
10 objetivo de mejorar el contraste de la imagen. Actúan afectando al tiempo de relajación T1, T2 y/o T2*, influyendo de este modo en el contraste de las imágenes.

Los tiempos de relajación T1, T2 y/o T2* se pueden optimizar para un agente de contraste paramagnético quelado mediante modificación estructural. De particular importancia son la presencia y el tiempo de residencia de una molécula de agua ligada al ion paramagnético y el tiempo de correlación rotacional del agente de contraste. La
15 presencia y el tiempo de residencia de una molécula de agua, ligada al ion paramagnético, pueden modularse a través de la elección del ion paramagnético y del resto quelante. El tiempo de correlación rotacional puede modularse variando el tamaño del agente de contraste.

El ion paramagnético puede interferir con las rutas biológicas e inducir toxicidad, por tanto es necesario retener el ion paramagnético dentro de un quelato. La estabilidad de un complejo paramagnético se puede modular mediante el
20 diseño estructural del resto quelante. De particular interés es la estabilidad cinética, medida como una vida media de disociación, que indica el grado de inercia hacia entornos químicos alterados (es decir, iones endógenos).

En IRM se han usado varios tipos de agentes de contraste. Los agentes de contraste de RM sanguíneos, por ejemplo partículas de óxido de hierro superparamagnéticas, son retenidos dentro de la vasculatura durante un tiempo prolongado. Se ha demostrado que son extremadamente útiles para potenciar el contraste en el hígado, pero
25 también para detectar anomalías de permeabilidad capilar, p.ej., paredes capilares con "fugas" en tumores que son resultado de angiogénesis tumoral.

Los quelatos paramagnéticos solubles en agua, es decir, los complejos de un quelante y un ion de metal paramagnético –por ejemplo quelatos de gadolinio como OMniscan™ (GE Healthcare)- son ampliamente empleados como agentes de contraste de RM. Debido a su bajo peso molecular, se distribuyen rápidamente en el
30 espacio extracelular (es decir, en la sangre y el intersticio) cuando se administran a la vasculatura. También son eliminados del cuerpo con relativa rapidez.

La solubilidad del quelato paramagnético en agua también es un factor importante cuando se usan como agentes de contraste para IRM debido a que se administran a pacientes en dosis relativamente grandes. Un quelato paramagnético altamente soluble en agua requiere un menor volumen de inyección, y por tanto es más fácil de
35 administrar a un paciente y produce menos incomodidades.

La lectura de documentos de la técnica anterior sobre quelatos paramagnéticos a menudo tiende a referirse a iones paramagnéticos en general, pero normalmente se centran y se diseñan para gadolinio. Puesto que el diseño estructural de un quelato es específico para cada ion paramagnético, un quelato diseñado para gadolinio no será óptimo, en términos de relajación o estabilidad, para otros iones paramagnéticos tales como manganeso (II) o hierro
40 (III). El gadolinio (III) es el ion metálico paramagnético más ampliamente usado en quelatos de IRM.

El documento WO2006/080022 (Degani et al.) describe conjugados bifuncionales que comprenden un resto ligando receptor asociado a tumores malignos y un resto de unión metálico, y complejos de los mismos con metales de transición y lantánidos paramagnéticos.

El documento US5334371 (Gries et al.) describe compuestos biciclo poliaza macrocíclicos que contienen iones de manganeso (II). Los compuestos de manganeso (II) descritos son inferiores a los compuestos de la presente invención en términos de estabilidad y capacidades de generación de señal y, por tanto, son menos adecuados como agentes de estudios de imagen.
45

El documento WO94/26313 (Kiefer et al.) describe complejos de ácido biciclopoliazamacrociclocarboxílico y sus conjugados con iones de Mn para uso como agentes de contraste en IRM.

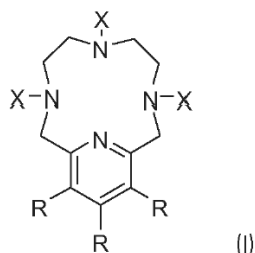
50 Aime et al. describen en J. Med. Chem., 2000, 43, 4017-4024, un macrociclo que contiene piridina que porta dos brazos acéticos y un brazo de ácido metileno-fosfónico (PCP2A), y su complejo con Gd (III) para uso como agente de contraste en IRM.

El ion de manganeso (II) es una especie paramagnética con un alto número de spin y un tiempo de relajación electrónica largo, y en bibliografía se ha reportado el potencial de un agente de contraste de alta relajabilidad basado

en manganeso (II). Sin embargo, la baja estabilidad de los quelatos de manganeso ha demostrado ser un problema y por tanto ha limitado la posibilidad de uso de los mismos en medios de contraste.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar quelatos basados en manganeso (II) que sean cinéticamente estables y muestren una cinética de intercambio en agua óptima, y que puedan usarse como agentes de contraste en RM.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I):



en donde

X es alquilo, $C(Y)_2COOZ$ o un ligando;

Y es alquilo, -PEG, -COOH, -PO(OH)₂, -H o un ligando;

R es alquilo, -PEG, -N(alquilo)₂, -N(PEG)₂, -O(alquilo), -O(PEG), -NMe₂, -NH₂, -OMe, -OH, -H o un ligando; y

Z es Mn (II) o -H;

con la condición de que dos de los tres grupos X presentes sean $C(Y)_2COOZ$,

con una condición adicional de que si Z es Mn (II), dos grupos X que contienen Z comparten un Mn (II); en donde el compuesto está unido a otra molécula a través de un ligando, si hay presente un ligando; y en donde el ligando es tal como se define en la reivindicación 1.

El grupo X que no es $C(Y)_2COOZ$ es un grupo alquilo o un ligando.

El término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un hidrocarburo, preferiblemente un alquilo inferior, por ejemplo un alquilo C₁-C₆ y más preferiblemente -CH₃.

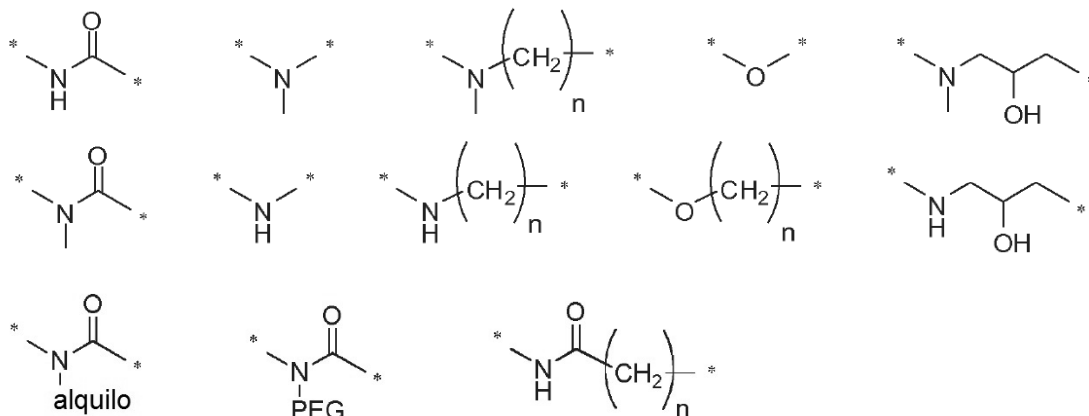
El término PEG significa polietilen glicol de cualquier peso molecular. Preferiblemente de 1 a 5 kD unidades PEG.

Y puede ser preferiblemente metilo, -COOH, -PO(OH)₂, -H o un ligando. Lo más preferiblemente Y es -H o un ligando.

R puede ser preferiblemente metilo, -NMe₂, -NH₂, -OMe, -OH o un ligando. Lo más preferiblemente R es un ligando.

El ligando, si está presente, une el compuesto de fórmula (I) a otra molécula. La elección de dicha molécula adicional afectará a las propiedades de biodistribución y de señal del agente de contraste.

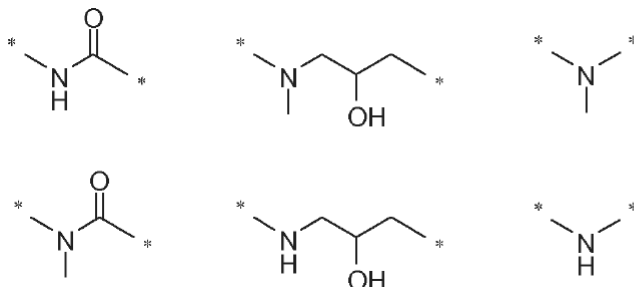
El resto ligando se selecciona del grupo que consiste en:



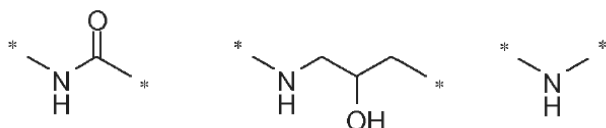
en donde n es un número entero de 1 a 7.

* denota la posición a través de la cual el ligando se une al compuesto de fórmula (I) y a la otra molécula definida anteriormente.

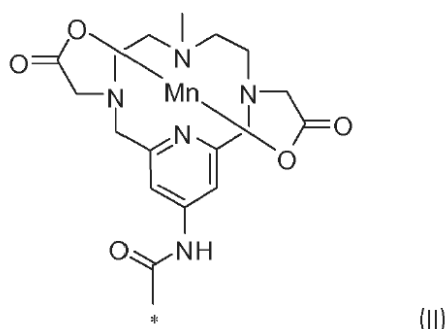
Preferiblemente el ligando se selecciona del grupo



Lo más preferiblemente, el ligando es

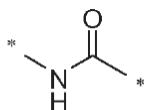


Por lo tanto, una realización preferida de un compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II)



10 en donde * indica el punto de unión a dicha otra molécula.

En esta realización un X es CH₃, un X es C(Y)₂COOZ, y un X es C(Y)₂COO⁻, Z es Mn (II), Y es -H y el ligando es:



15 Los compuestos de la presente invención pueden usarse como agentes de contraste de RM y, tal como se ha explicado anteriormente, pueden estar unidos o no a otras moléculas tales como péptidos naturales o sintéticos, aminoácidos o derivados de los mismos, poliaminas o derivados de las mismas, peptidomiméticos, polipéptidos, proteínas o anticuerpos. Mediante la unión de compuestos de la presente invención con dichas moléculas, se pueden obtener los agentes de contraste de RM deseados si, por ejemplo, el péptido o proteína es un vector que se une a una diana como un receptor o marcador celular superficial. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención pueden unirse a restos poliméricos tales como polímeros naturales o sintéticos o dendrímeros. Dicha

20 unión proporciona a los compuestos de la presente invención una movilidad molecular más reducida y por lo tanto aumenta su relajabilidad a las elevadas fuerzas de campo usadas en los escáneres de IRM modernos. En otra realización, los compuestos de la presente invención pueden unirse a compuestos lipofílicos y los compuestos anfifílicos resultantes pueden dispersarse. Dichas dispersiones pueden usarse como agente de contraste de RM para la obtención de imágenes tumorales. En otra realización adicional, los compuestos de la presente invención

25 pueden unirse a nanopartículas. Nuevamente, dicho enlace proporciona a los compuestos de la presente invención una movilidad molecular más reducida y por lo tanto aumenta su relajabilidad.

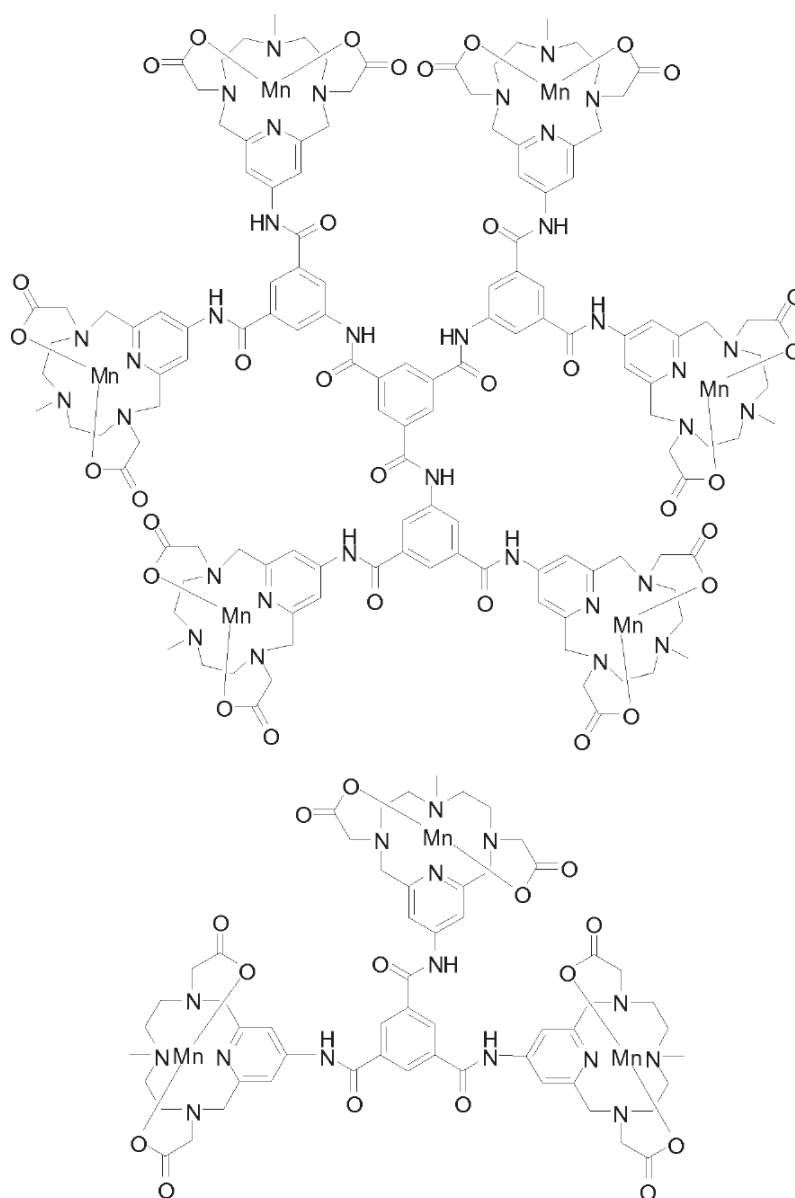
Por lo tanto, en un segundo aspecto de la invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido previamente unido a otra molécula a través del grupo X, Y ó R. En este contexto, el término "otra molécula"

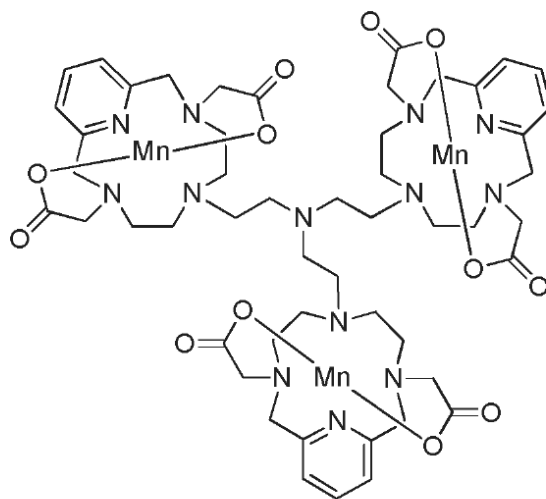
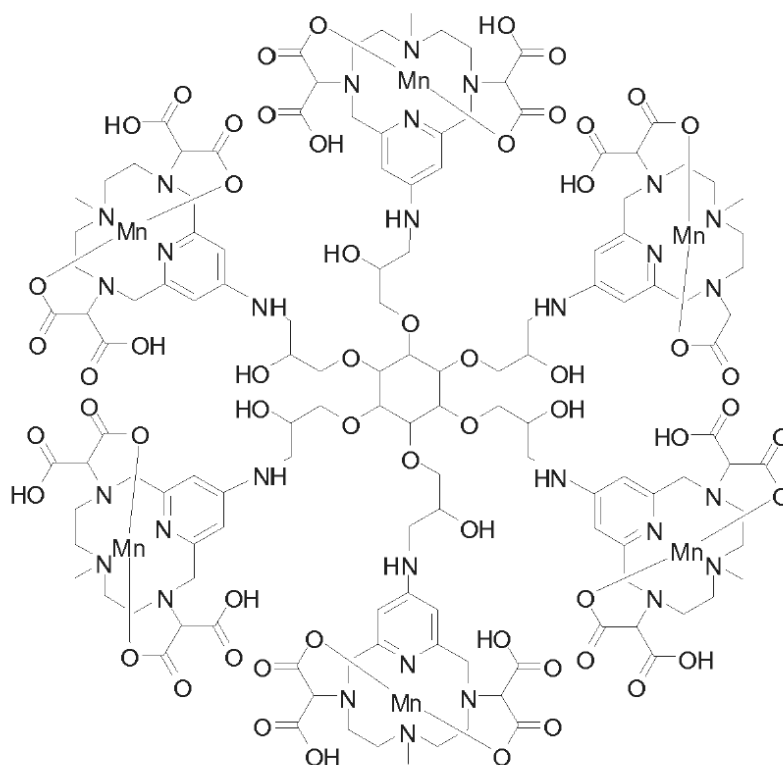
incluye átomos. En una realización preferida, dicha otra molécula es O, S, P ó N, lo más preferiblemente N. En otra realización preferida, dicha otra molécula es O, S, P ó N, lo más preferiblemente N. En otra realización preferida, dicha otra molécula es un anillo aromático, inositol o carbohidrato, o cualquier derivado de los mismos. En otra realización preferida, dicha otra molécula es un péptido natural o sintético, aminoácidos o derivados de los mismos, poliaminas o derivados de las mismas, un peptidomimético, un polipéptido, una proteína, un anticuerpo, un polímero natural o sintético, un dendrímero, una nanopartícula o un compuesto lipofílico. Mediante la unión de compuestos de fórmula (I) a otras moléculas, se alterará la biodistribución y el agente de contraste puede internalizarse o ser ligado a células con una afinidad por la molécula unida al compuesto de fórmula (I).

Será evidente para el especialista en la técnica que el resto ligando del grupo X, Y ó R puede unirse a otras moléculas mediante cualquier método conocido en la técnica.

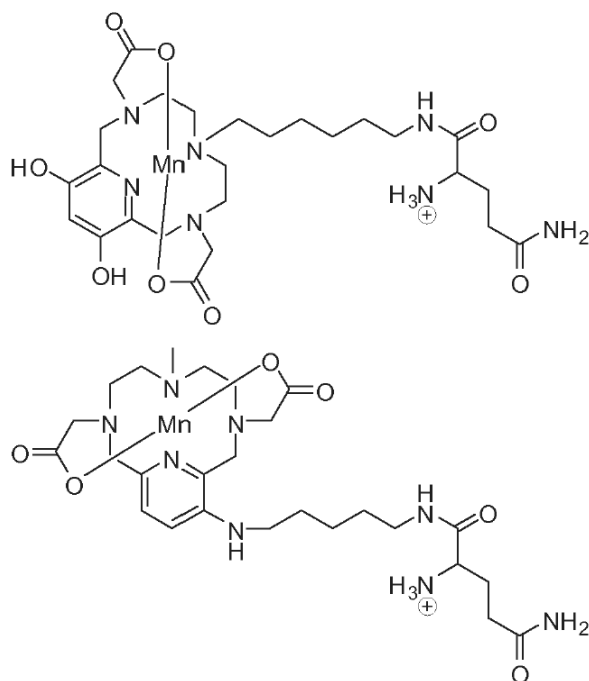
En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se unen a un dendrímero. Un dendrímero es una molécula repetidamente ramificada que actuará como estructura para la unión de múltiples compuestos de fórmula (I). En su forma más sencilla, un dendrímero puede consistir solo en una estructura de núcleo pero que permita la unión de multiplicidad de compuestos de fórmula (I). Las construcciones dendriméricas presentarán una biodistribución alterada y una señal potenciada con respecto a los quelatos monoméricos.

Los compuestos dendriméricos adecuados que incorporan compuestos de fórmula (I) son:



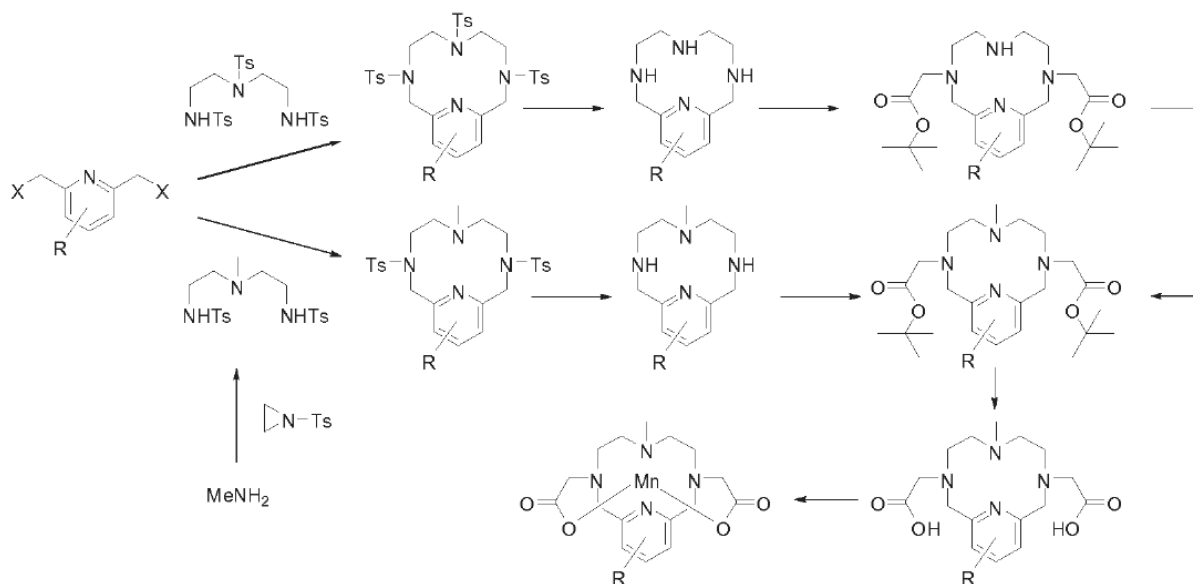


Los derivados adecuados de péptidos naturales o sintéticos, aminoácidos o derivados de los mismos, poliaminas y derivados de las mismas, peptidomiméticos, o polipéptidos, que incorporan los compuestos de fórmula (I) son:



En el caso de que dicha otra molécula sea un resto ligando receptor asociado a tumores malignos, R no puede ser un ligando que contenga una cadena de hidroxycarbileno C₂-C₁₀.

5 Los compuestos de fórmula (I) pueden sintetizarse mediante varias rutas sintéticas conocidas por los especialistas en la técnica a partir de materiales de partida disponibles comercialmente siguiendo el procedimiento generalizado.



10 Se puede obtener un compuesto de 2,6-bis-metil-piridina provisto de grupos salientes (X) en las posiciones metilo a partir de materiales disponibles comercialmente mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los ejemplos de grupos salientes adecuados son grupos cloro, bromo, tosilato, nosilo y mesilo. El anillo de piridina puede estar sustituido con un grupo (R) que puede usarse como punto de unión si el quelato va a acoplarse a otra molécula. Un ejemplo de grupo R adecuado es -NH₂. El grupo R también puede ser un precursor inerte del grupo utilizado en la posterior reacción de acoplamiento, es decir, el grupo -NO₂ es un precursor del grupo -NH₂.
 15 También se pueden considerar grupos R con la única función de aumentar la estabilidad del complejo de manganeso correspondiente, mediante deslocalización electrónica, del nitrógeno de la piridina. Los ejemplos de dichos grupos R son -CH₃ y -OCH₃. El compuesto 2,6-bis-metil-piridina provisto de grupos salientes adecuados, tal como se ha definido anteriormente, es ciclado a continuación mediante reacción con un nucleófilo bis-amino adecuado para formar un tetraazamacrociclo mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los nitrógenos nucleofílicos pueden estar provistos de grupos tosilato que favorecen la reacción de ciclación, como

es conocido por los especialistas en la técnica. La eliminación posterior de los grupos tosilato se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. La introducción de dos grupos carboximetilo a dos de los tres nitrógenos alifáticos puede lograrse mediante una alquilación regioselectiva controlada, llevada a cabo preferiblemente bajo un control estricto del pH con métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. El nitrógeno secundario restante puede ser alquilado posteriormente con un electrófilo de carbono. Ejemplos de dichos electrófilos carbonados son el CH_3I y el $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OCH}_3$. El grupo alquilo también puede ser introducido antes de la reacción de ciclación haciendo reaccionar un derivado de bis-tosilamida alquilado con un compuesto de piridina electrofílico. Una introducción temprana del grupo alquilo evita la necesidad de una introducción regioselectiva de grupos carboximetilo en una etapa de reacción posterior. Los grupos carboximetilo pueden protegerse en forma de éster. Esto es especialmente útil cuando el quelante se va a acoplar a otra molécula, mediante reacción del grupo R usando métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, ya que la solubilidad en disolventes, útiles para la reacción de acoplamiento, se ve reducida drásticamente para el derivado de ácido carboxílico libre. Ejemplos de dichos grupos éster son los ésteres de t-butilo, etilo y metilo. La eliminación de grupos éster es bien conocida por los especialistas en la técnica. La reacción de complejación se puede llevar a cabo en disolución acuosa haciendo reaccionar una fuente adecuada de ion de manganeso (II) empleando métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Los compuestos de la presente invención unidos a otras moléculas a través del grupo X, Y ó R pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, si dicha otra molécula es un péptido, polipéptido o proteína, los compuestos de fórmula (I) se pueden unir fácilmente a grupos funcionales adecuados en dichas otras moléculas, p.ej., grupos carboxilo. Puede ser necesario activar los grupos funcionales en dichas otras moléculas, p.ej., generando un cloruro de acilo a partir de un grupo carboxilo. Los métodos para activar grupos funcionales con el objetivo de potenciar su reactividad son conocidos por los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, Sandler y Karo, eds. Organic Functional Group preparation, Academic Press, San Diego 1998).

Los compuestos de fórmula (I) y los compuestos de fórmula (I) unidos a otras moléculas, preferiblemente a péptidos naturales o sintéticos, aminoácidos y derivados de los mismos, poliaminas y derivados de las mismas, peptidomiméticos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, polímeros naturales o sintéticos, dendrímeros, compuestos lipofílicos o nanopartículas pueden usarse como agentes de contraste de RM. Por tanto, un tercer aspecto de la presente invención proporciona compuestos para uso como agentes de contraste de RM.

Para este fin, los compuestos de fórmula (I) y los compuestos de fórmula (I) unidos a otras moléculas se formulan con vehículos fisiológicamente tolerables convencionales tales como vehículos acuosos, p.ej., agua y disoluciones tamponadas, y opcionalmente con excipientes. La composición resultante se denomina "medio de contraste de RM".

Un cuarto aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) o un compuesto de fórmula (I) unido a otras moléculas y al menos un vehículo fisiológicamente tolerable. Dicha composición puede usarse como medio de contraste de RM en IRM.

Para usarse como medio de contraste de RM en IRM del cuerpo humano y de cuerpos de animales no humanos, dicho medio de contraste de RM debe ser adecuado para administración a dicho cuerpo. De forma adecuada, los compuestos de fórmula (I) o los compuestos de fórmula (I) unidos a otras moléculas y opcionalmente excipientes y aditivos farmacéuticamente aceptables pueden ser suspendidos o disueltos en al menos un vehículo fisiológicamente tolerable, p.ej. agua o una(s) disolución(es) tamponada(s). Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente compatibles tales como hidrócloruro de trometamina, quelantes tales como DTPA, DTPA-BMA o compuestos de fórmula (I), complejos débiles de iones fisiológicamente tolerables tales como quelatos de calcio, p.ej., DTPA de calcio, CaNaDTPA-BMA , compuestos de fórmula (I) en los que X forma un complejo con Ca^{2+} o sales de Ca/Na de compuestos de fórmula (I), sales de calcio o sodio tales como cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico. Los excipientes y aditivos se describen más detalladamente, p.ej., en los documentos WO-A-90/03804, EP-A-463644, EP-A-258616 y US 5.876.695.

Un quinto aspecto de la invención es un método de imagen por RM en donde un sujeto que sido administrado previamente con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) o un compuesto de fórmula (I) unido a otra molécula y al menos un vehículo fisiológicamente tolerable, es sometido a un examen mediante RM en donde las señales de RM son detectadas en el sujeto o en partes del sujeto en las que se distribuye la composición, y opcionalmente se generan imágenes de RM y/o espectros de RM a partir de las señales detectadas. En una realización preferida, el sujeto es un humano vivo o un cuerpo de animal no humano. En una realización preferida, la composición se administra en una cantidad que es efectiva para potenciar el contraste, es decir, una cantidad que es adecuada para potenciar el contraste en el método de estudio de imágenes por RM.

En otra realización preferida, el sujeto es un humano vivo o un animal no humano vivo y el método de estudio de imágenes por RM es un método de detección de tumores por RM o un método de delineación de imágenes tumorales.

El término "ha sido previamente administrado" significa que cualquier etapa que requiera que una persona médicamente cualificada administre la composición al paciente ha sido llevada a cabo antes de que el método de estudio por imágenes de RM y/o espectroscopía de RM según la invención dé comienzo.

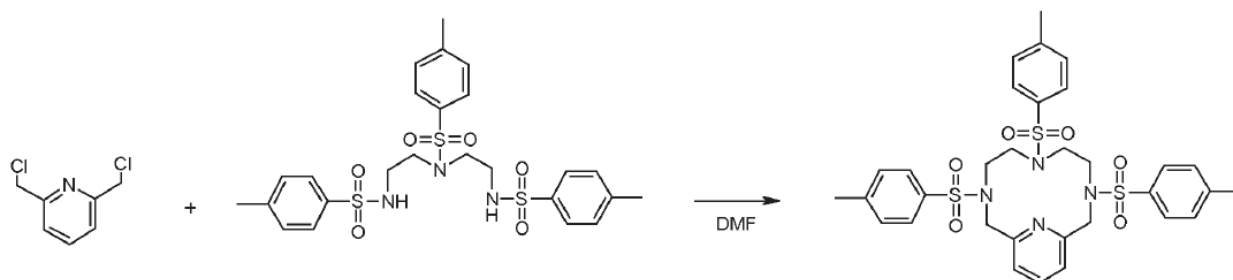
En un aspecto, la descripción se refiere al uso de un compuesto según la invención para la fabricación de un agente de diagnóstico para uso como medio de contraste de RM.

La invención se describirá ahora con mayor detalle a través de los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1

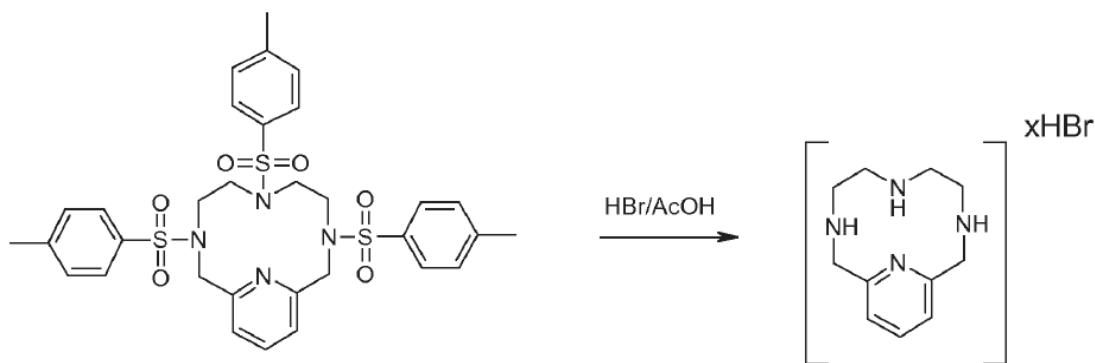
a) Síntesis de 3,6,9-tris-(tolueno-4-sulfonyl)-3,6,9,15-tetraaza-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



Se calentó sal disódica de N,N',N''-tri-p-tosildietilen-triamina (6,90 g, 11,4 mmol) en dimetilformamida (DMF) (92 mL) a 100°C en atmósfera de N₂. Se añadió 2,6-bis(clorometil)piridina (2,01 g, 11,4 mmol) en DMF (37 mL) gota a gota a lo largo de 45 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 40°C en atmósfera de N₂ durante 12 horas. A continuación se añadieron 75 mL de agua a la mezcla de reacción. La suspensión resultante se filtró entonces y el sólido se lavó con agua y se secó a vacío. El producto sin purificar se intentó disolver en agua:acetonitrilo 1:1. Se separó mediante filtración un precipitado blanco y se secó para dar lugar a 5,52 g (72%) del producto.

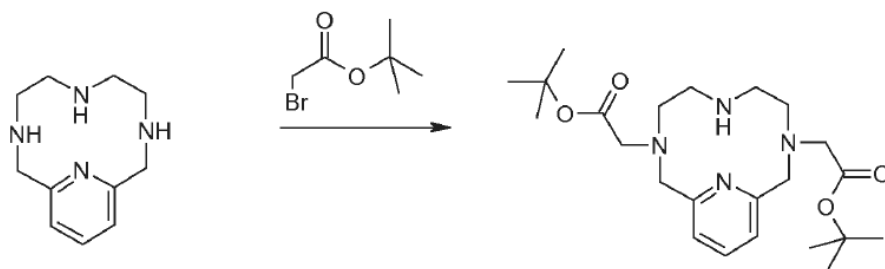
El producto se analizó usando LC-MS (*m/z* observado: 669,3 MH⁺, *m/z* calculado: 669,2).

b) Síntesis de sal de HBr de 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



Se preparó una disolución de HBr y ácido acético mezclando HBr al 48% y ácido acético glacial en una proporción de 65:35. A 111 mL de la mezcla de HBr/AcOH se añadió el producto obtenido en la etapa 1a (5,0 g, 7,5 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo suave con agitación constante durante 80 horas. A continuación la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró hasta aproximadamente 1/10 del volumen original. La mezcla restante se agitó vigorosamente y se añadieron 50 mL de dietil éter. El sólido blanquecino se filtró, se lavó con dietil éter y se secó a vacío dando lugar a 3,8 g del producto sin purificar. El producto sin purificar se usó directamente sin purificación. El producto sin purificar se analizó usando LC-MS (*m/z* observado: 207,3 MH⁺, *m/z* calculado: 207,2).

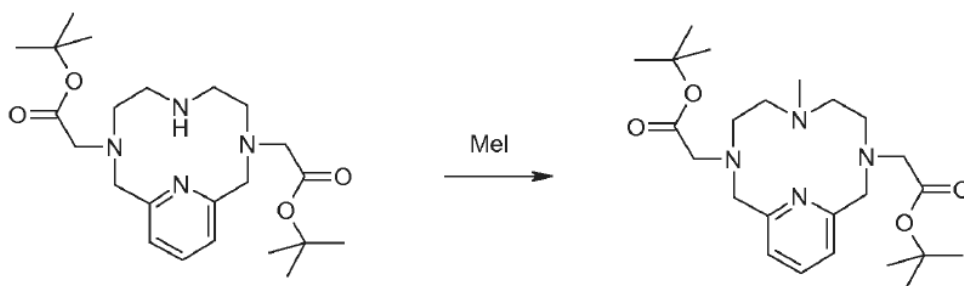
c) Síntesis de 3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(terc-butilcarbonilmetil)-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



El compuesto obtenido en la etapa 1b (1,5 g, 3,3 mmol) se disolvió en dioxano:agua 1:1 (30 mL) y el pH se ajustó a 3 con NaOH (2 M) antes de añadir terc-butilbromo acetato (0,66 mL, 4,5 mmol) en dioxano:agua (35 mL). El pH tras la adición se ajustó a 9 con NaOH (2 M). Después de 3,5 horas se añadió más acetato de terc-butilbromo (0,10 mL, 0,68 mmol) y el pH se ajustó a 9 con NaOH (2 M). La adición de más acetato de terc-butilbromo se repitió dos veces (2 x 0,116 mL, 0,79 mmol) después de 14 y 17 horas. El pH también se ajustó a 9. La mezcla de reacción se cargó en una columna C18 preparativa y el producto se purificó usando HPLC preparativa. Se aislaron 0,9 g (63%) de compuesto puro.

El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 435,1 MH^+ , m/z calculado: 435,3).

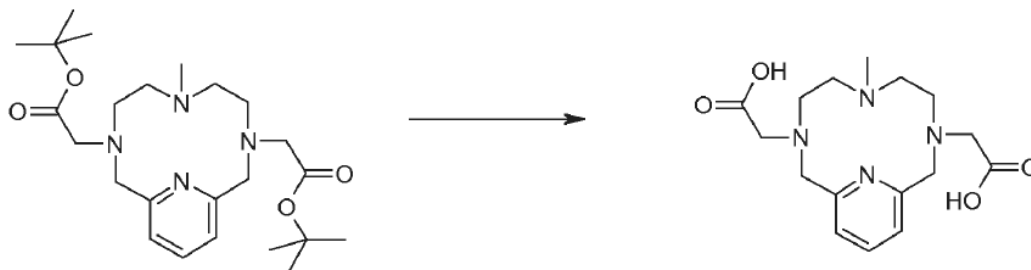
d) Síntesis de 3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(terc-butilcarbonilmetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



Al compuesto obtenido en la etapa 1c (200 mg, 0,460 mmol) en dimetilformamida (10 mL) se añadió trietil amina (65,3 mg, 64,1 μ L, 0,460 mmol) y yodometano (65,3 mg, 28,7 μ L, 0,460 mmol). Se añadieron alícuotas de 1,1,3,3-tetrametilguanidina (58 μ L, 0,46 mmol) y yodometano (29 μ L, 0,46 mmol). La reacción se siguió mediante LC-MS y después se añadió agua. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa. Se aislaron 106 mg, 0,24 mmol (51%) de compuesto puro.

El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 449,1 MH^+ , m/z calculado: 449,3).

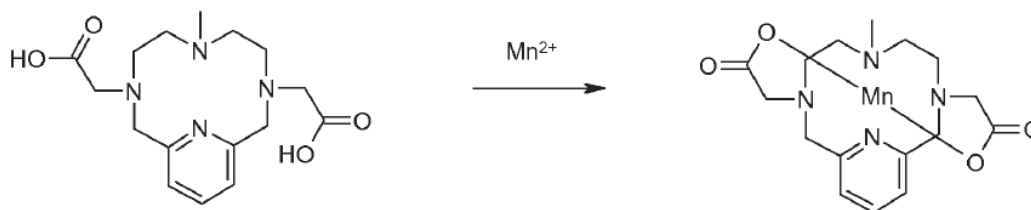
e) Síntesis de 3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carboximetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



El compuesto obtenido en la etapa 1d (0,11 g, 0,24 mmol) en ácido fórmico (30 mL) se calentó a reflujo y se enfrió a temperatura ambiente. El ácido fórmico se evaporó a presión reducida. Se añadió tolueno (2 x 20 mL) y se evaporó a presión reducida. El producto sin purificar se usó en la siguiente etapa sin purificación.

El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 337,1 MH^+ , m/z calculado: 336,2).

f) Síntesis del complejo de manganeso (II) de 3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carboximetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno

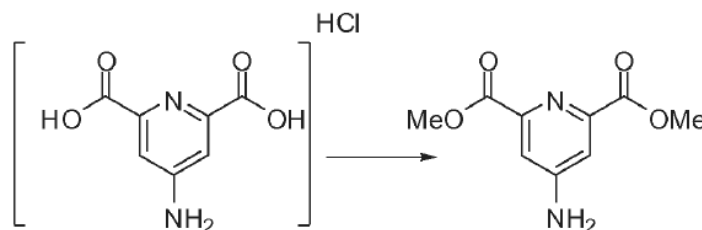


El compuesto obtenido en la etapa 1e (81 mg, 0,24 mmol) se disolvió en agua desgasificada (15 mL) antes de ajustar el pH de 2,8 a 6,7 usando 200 μ L de NaOH en agua desgasificada (2,33M). Se añadió 1,1 mL de cloruro de manganeso (II) en agua desgasificada (465 mg en 10 mL, 0,23 M). El pH cayó hasta 3,5. Se ajustó el pH a 5,9 con alícuotas de NaOH (ac.). Después de 15 minutos, se ajustó el pH a 9,3 con alícuotas de NaOH (ac.) y la mezcla se dejó reposar durante 15 minutos. El pH se ajustó a 7,0 usando alícuotas de HCl (150 μ L en 1 mL de agua desgasificada) antes de que la disolución fuera filtrada y cargada en una columna C18 preparativa y el producto se purificase usando HPLC preparativa. Se aislaron 0,11 mmol, 42 mg (45%) de compuesto puro.

El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 390,0 MH^+ , m/z calculado: 390,1).

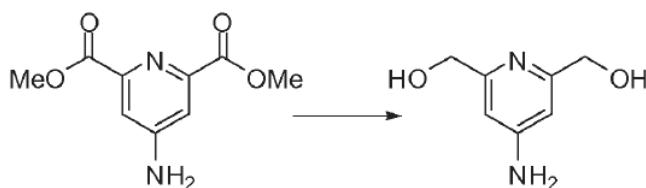
Ejemplo 2.

a) Síntesis de dimetil 4-aminopiridina-2,6-dicarboxilato



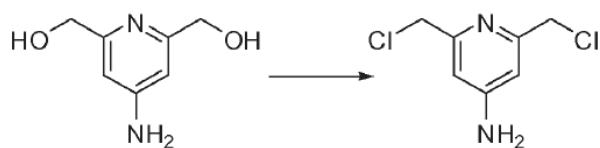
Se añadió cloruro de tionilo (2,5 mL) lentamente a metanol enfriado en hielo (20 mL) en atmósfera de nitrógeno. A continuación se añadió por lotes la sal clorhídrica de ácido 4-aminopiridin-2,6-dicarboxílico (2,5 g, 11,5 mmol) a la disolución enfriada con hielo. Entonces se llevó la mezcla de reacción a reflujo durante 4h y después se concentró para producir un sólido amarillo amorfo. El sólido se disolvió en HCl acuoso (0,8 M, 50 mL) y la disolución se filtró y se alcalinizó hasta pH 9. El precipitado formado se retiró por filtración para dar lugar al producto no deseado (1,6 g, 66%). El producto se analizó usando RMN ($(CD_3)_2SO$), 7,36 (s, 2H), 6,70 (bs 2H), 3,84 (s, 6H).

b) Síntesis de (4-aminopiridina-2,6-diil)dimetanol



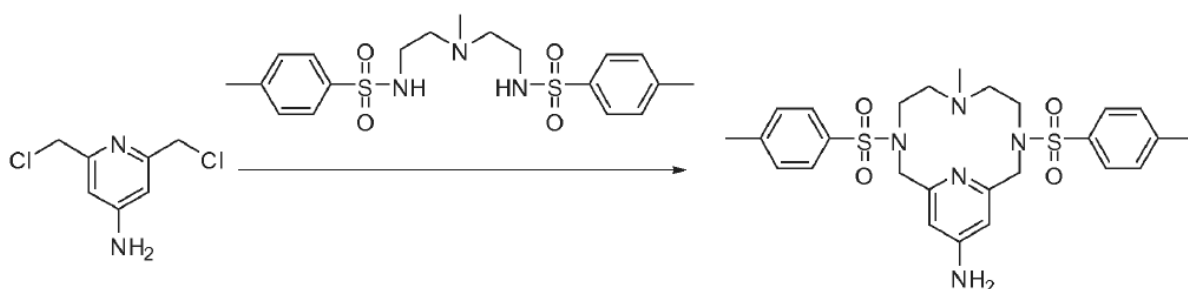
Al compuesto obtenido en la etapa 2a (2,8 g, 13,3 mmol) se añadió metanol (100 mL). La adición por lotes de porciones de borohidruro sódico (un total de 4g, 11 mmol) a lo largo de 1h proporcionó una disolución transparente. A continuación la mezcla de reacción se sometió a reflujo y se añadieron porciones adicionales de borohidruro sódico (otros 4 g, 11 mmol) por lotes durante 1h. A continuación se añadió agua (25 mL) y la mezcla de reacción se concentró para producir un polvo amorfo blanco. Los sólidos se sometieron a extracción soxhlet en acetato de etilo durante 72h. Después se concentró la fase orgánica y se añadió agua (100 mL). El pH se ajustó a 11 y la suspensión resultante se calentó a 75°C durante 1h para dar lugar a una disolución transparente. El pH se ajustó a 12 y la disolución se enfrió a 0°C. El precipitado formado se retiró por filtración para dar lugar al producto deseado en forma de sólido amorfo (1,3 g, 66%). El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 155,1 MH^+ , m/z calculado: 155,1).

c) Síntesis de 2,6-bis(clorometil)piridin-4-amina



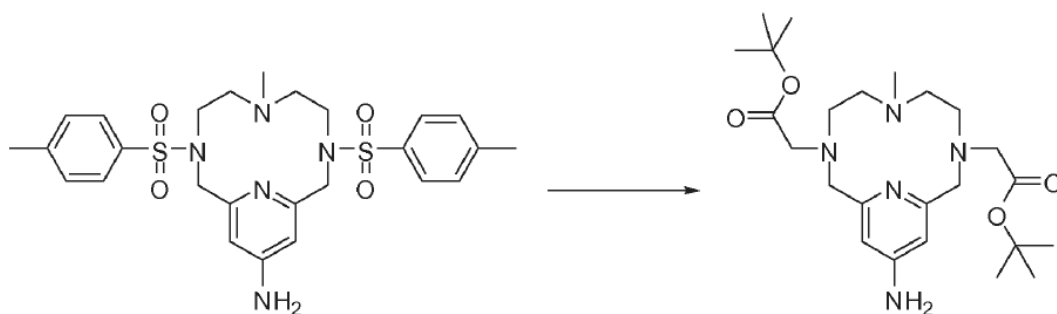
Al compuesto obtenido en la etapa 2b (2,3 g, 14,9 mmol) se añadió cloruro de tionilo (15 mL) y después el gel espumoso resultante se llevó a reflujo durante 2h. A continuación la mezcla de reacción se concentró para producir un sólido amorfo al cual se añadió agua (30 mL). La suspensión resultante se alcalinizó hasta pH 8 y el precipitado se retiró mediante filtración para producir el producto deseado (2,6 g, 88%). El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 191,0 MH^+ , m/z calculado: 191,0).

d) Síntesis de 13-amino-3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(tolueno-4-sulfonyl)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



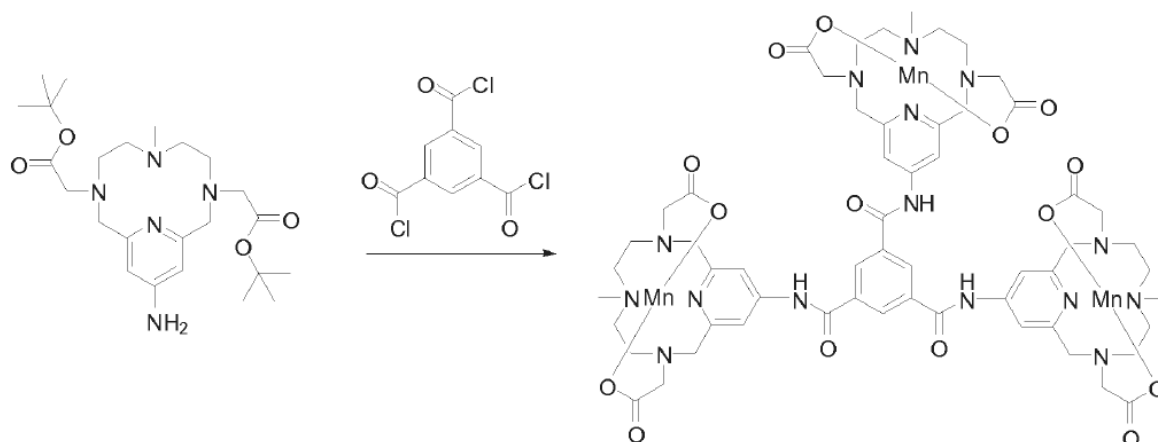
Al compuesto obtenido en la etapa 2c (2,5 g, 13,1 mmol), N,N'-(2,2'-(metilazanedil)bis(etano-2,1-diil))bis(4-metilbencenosulfonamida) (2,8 g, 6,6 mmol) y K_2O_3 (11g, 79,7 mmol) y se añadió dimetil formamida (250 mL). La suspensión resultante se agitó a 100°C en atmósfera de nitrógeno durante 2h. A continuación se añadió más N,N'-(2,2'-(metilazanedil)bis(etano-2,1-diil))bis(4-metilbencenosulfonamida) (2,8 g, 6,6 mmol) y se continuó la calefacción durante 4h. Después se evaporaron 125 mL de dimetil formamida y la suspensión restante se añadió gota a gota a un recipiente que contenía agua (1,6 L). La suspensión resultante se acidificó hasta pH 1 y después se calentó a 75°C. Se dejó que la disolución se enfriara hasta temperatura ambiente durante la noche y el precipitado resultante se retiró mediante filtración para dar lugar al producto deseado (5,1 g, 72%). El producto se analizó usando LC-MS (m/z observado: 544,1 MH^+ , m/z calculado: 544,2).

e) Síntesis de 13-amino-3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(terc-butilcarbonilmetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



Al compuesto obtenido en la etapa 2d (2,5g, 4,6 mmol) se añadió ácido sulfúrico concentrado (15 mL). La suspensión resultante se agitó a 100°C durante 8h y después se vertió bruscamente en agua enfriada en hielo (40 mL). Entonces se añadió una disolución acuosa de NaOH (25%, 90 mL) para producir una suspensión blanca. A la suspensión se añadió acetonitrilo (50 mL) K_2CO_3 (1,2 g, 8,7 mmol) y terc-butilbromoacetato (1,36 mL, 9,2 mmol). La suspensión bifásica se agitó vigorosamente durante 5h y después se añadió más terc-butilbromoacetato (1,36 mL, 9,2 mmol). Después de 12h, la fase orgánica se separó y se añadió a una disolución tampón ($NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0,1M a pH 10) solución saturada con NaCl. A la disolución bifásica se añadió terc-butilbromoacetato (1,36 mL, 9,2 mmol) y después la mezcla se agitó vigorosamente durante 24h. A continuación se añadió más terc-butilbromoacetato (1,36 mL, 9,2 mmol) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 24h. La fase orgánica se separó y se añadió a un tampón de fosfato (300 mL, 0,1M, pH 7). La disolución acuosa se extrajo entonces repetidamente con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto deseado (2,7 g). El producto se analizó usando LC-MS (m/z encontrado: 464,2 MH^+ , m/z calculado: 464,3).

f) Síntesis del complejo de manganeso (II) de N1, N3, N5-tris [3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carbonilmetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-13-trienil]benceno-1,3,5-tricarboxamida



El compuesto obtenido en la etapa 2e (1,0 g, 1,1 mmol) se disolvió en acetonitrilo (10 mL), a continuación se añadió N-etildiisopropilamina (185 μ L, 1,1 mmol) y cloruro de ácido benceno tricarboxílico (64 μ L, 0,36 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1h. A continuación se concentró la mezcla de reacción para producir un sólido amorfo blanco. El sólido se disolvió entonces en ácido fórmico (10 mL) y se calentó a reflujo durante 1h. La mezcla de reacción se concentró entonces y el material resultante se disolvió en tampón de NaHCO_3 saturado y se calentó a 80°C durante 24h. La mezcla de reacción se neutralizó y después se añadió MnCl_2 (435 mg, 2,2 mmol). Entonces se ajustó el pH a 7,6 y se agitó a temperatura ambiente durante 1h. A continuación se filtró y se concentró la mezcla de reacción. La HPLC preparativa dio lugar al complejo trimérico de manganeso (II) (230 mg, 47% en las tres etapas). El producto se analizó mediante LC-MS (m/z observado: 457,0 M^+H^+ , m/z calculado: 457,1).

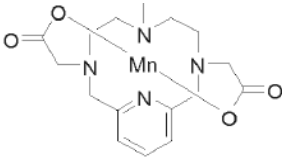
Ejemplo 3

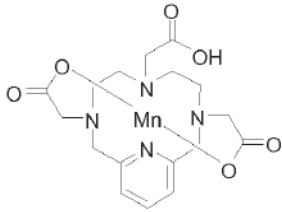
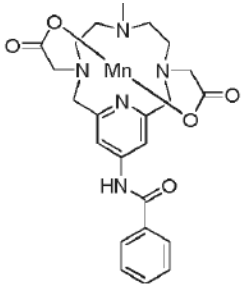
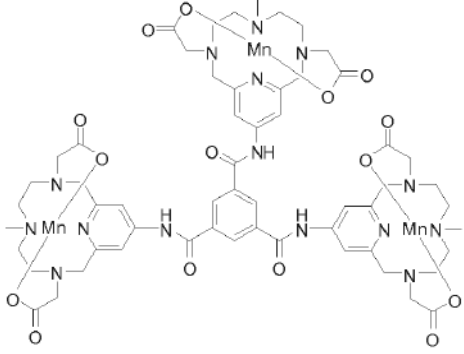
15 Análisis de la relajabilidad

Las medidas de relajabilidad se llevaron a cabo con un rango de disoluciones de complejo de 0,05 a 1 mM en un Bruker Minispec PC 120b – NA 770, a 20 MHz o en un Bruker Minispec Mq 60m a 60 MHz y 37°C. Las disoluciones se obtuvieron disolviendo la cantidad apropiada de quelato en agua Millipore desgasificada o en suero humano.

Medidas de intercambio en agua

Las medidas de intercambio en agua se llevaron a cabo con disoluciones de complejo de 6 a 15 mM. Las disoluciones fueron obtenidas disolviendo la cantidad apropiada de complejo en 0,6 mL de disolución tampón (TRIS, 0,05 M, pH 7,4 en agua Millipore desgasificada con un enriquecimiento de ^{17}O de aproximadamente el 3%). Se registraron espectros de RMN de ^{17}O de transformada de Fourier de temperatura variable a una frecuencia de 40,7 MHz en un espectrómetro Varian Unity 300 MHz. Las temperaturas se midieron usando patrones de metanol y etilen glicol. Si midió la dependencia de la temperatura del ensanchamiento de la línea de ^{17}O de cada sistema en un rango de temperaturas de 273,7 a 356,1 K. Cada temperatura se calibro usando un patrón de metanol o de etilen glicol.

Compuesto	Relajabilidad Agua a 20MHz, 37°C ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Relajabilidad Suero humano a 60MHz, 37°C ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Tiempo de residencia en agua (ns)
 Compuesto del Ejemplo 1	2,4	4,6	16

 Compuesto descrito en US5334371	1,3	NA	NA
 Compuesto del Ejemplo 6	NA	8,8	NA
 Compuesto del Ejemplo 2	3,8	10,5	14

Ejemplo 4

Análisis de estabilidad

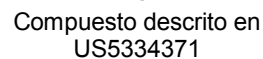
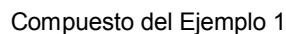
5 La estabilidad cinética de los quelatos de manganeso se caracterizó a través de las velocidades de la reacción de intercambio con Zn^{2+} , en tampón de acetato (10 mM) fijado a varios pH. El aumento de iones de manganeso libres se monitorizó usando un Bruker Minispec PC 120b – NA 770, a 20 MHz y 25°C. La fuerza iónica total se ajustó a 0,5M con KCl. La concentración de quelato fue de aproximadamente 0,5 mM para todas las medidas.

10 El cambio en la concentración de manganeso en forma de quelato, tras exposición a iones de zinc, se monitorizó espectroscópicamente. Cuando el zinc desplaza al ion manganoso se observó un incremento neto de la relajabilidad ya que el ion manganoso tiene una relajabilidad de $\sim 10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que los quelatos de manganeso estudiados presentan una relajabilidad menor.

A partir de los datos de relajabilidad se calcularon las pseudo-constantes cinéticas de primer orden (k_{obs}) aplicando la siguiente ecuación:

$$A_t = (A_0 + A_e) e^{(k_{\text{obs}} t)} + A_e$$

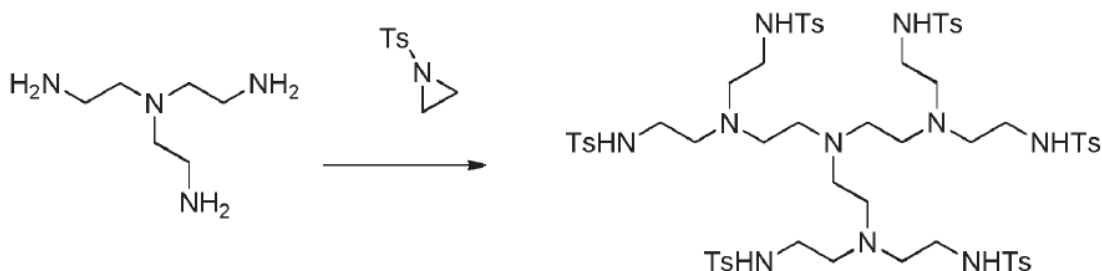
15 En la que A_t , A_0 y A_e son los valores de relajabilidad a tiempo t, al inicio de la reacción y en el equilibrio, respectivamente. La vida media de disociación se derivó a partir de la k_{obs} .



pH	[Zn] (mM)	Vida media de disociación	Vida media de disociación
		$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ (min)
5,6	10	72	22
5,4	10	44	15
5,2	10	30	9
5,0	10	21	6
4,6	10	10	3
5,6	20	77	23
5,2	20	37	10

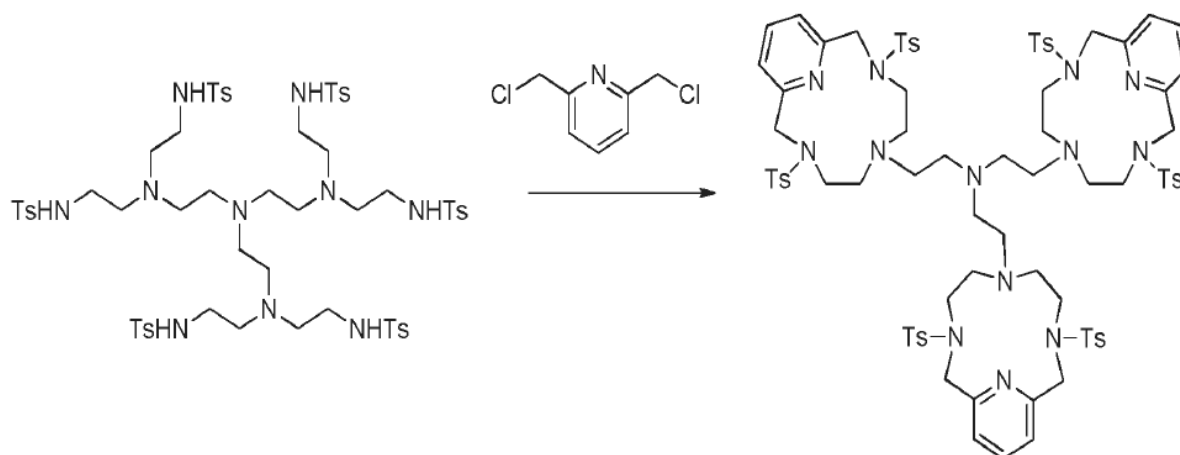
Ejemplo 5

a) Síntesis de N,N',N'',N''',N''',N''''-(((nitrilotris(etano-2,1-diil))tris(azanotriil))hexakis(etano-2,1-diil))hexakis(4-metilbencenosulfonamida)

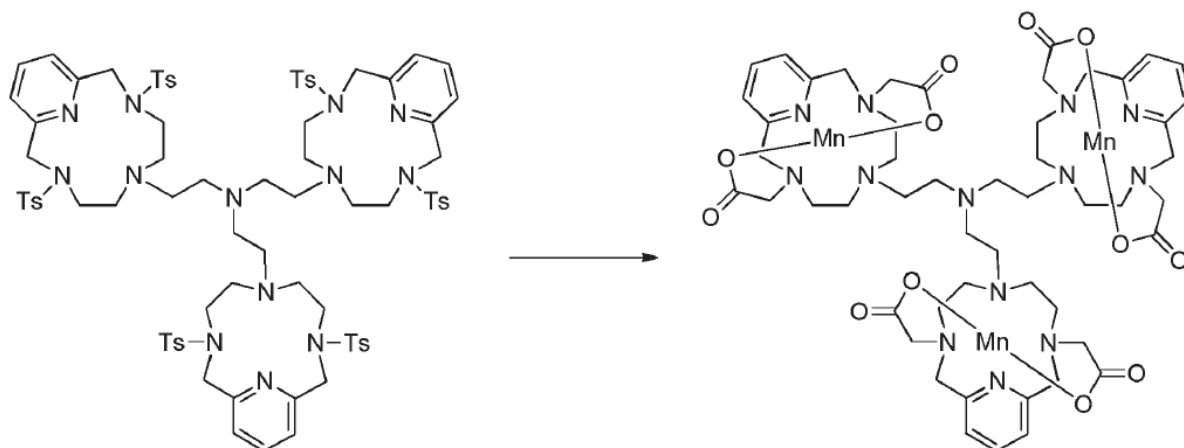


Se disuelve tris-(2-aminoetil)-amina (10 g, 68,5 mmol) en acetonitrilo (500 mL) y después se añade lentamente tosilaziridina (97,2g, 0,49mol). La disolución se agita durante 24h a temperatura ambiente y después se añade NaOH (2,7g, 68,5 mmol) y se mantiene la agitación durante otras 24h. A continuación la mezcla de reacción se vierte bruscamente en agua (2L) y el precipitado resultante se retira mediante filtración para dar lugar al producto puro.

b) Síntesis de 6,6',6''-tris-etil-[3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(4-metilbencenosulfonamida)-biciclo[9.3.1]pentadecatrien]-amina



El compuesto obtenido en el ejemplo 5a (10g, 7,5 mmol) se disuelve en DMF (200 mL) y a continuación se añade 2,6-bis(clorometil)piridina (8,1g, 46 mmol) y carbonato potásico (12,7 g, 92 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 24h y a continuación se vierte bruscamente en agua (1L). El precipitado se retira mediante filtración para dar lugar al producto puro.



5

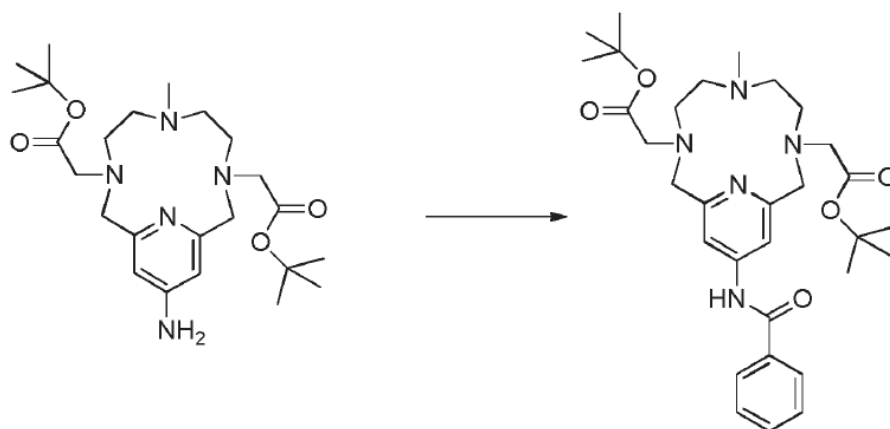
c) Síntesis de complejo de manganeso de 6,6',6''-tris-etil-[3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carbonilmetil)-biciclo[9.3.1]pentadecatrien]-amina

Al compuesto obtenido en el ejemplo 6b (10 g, 6,1 mmol) se añade ácido sulfúrico concentrado (50 mL) y la suspensión resultante se calienta a 100°C durante 12h y después se vierte bruscamente en agua enfriada en hielo (1 L). A continuación se añade una disolución acuosa de NaOH (25%, 300 mL) para producir una suspensión blanca. A la suspensión se añade acetonitrilo (400 mL), K₂CO₃ (5,1 g, 37 mmol) y terc-butilbromoacetato (22,2 mL, 0,15 mol). La suspensión bifásica se agita vigorosamente durante 15h y después se separa la fase orgánica y se añade a un tampón de fosfato (1L, 0,1M, pH 7). La disolución acuosa es extraída a continuación repetidamente con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se concentran para producir un sólido amorfo. El sólido se disuelve en ácido fórmico (50 mL) y se lleva a reflujo durante 5h. La mezcla de reacción es concentrada y el sólido amorfo resultante se disuelve en agua (100 mL), se neutraliza y a continuación se añade MnCl₂ (3,5 g, 27,5 mmol). Entonces se ajusta el pH a 7,6 y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1h. A continuación se filtra la reacción y se concentra. El sólido amorfo es cristalizado a partir de un reflujo en etanol para producir el complejo de manganeso de 6,6',6'', tris-etil-[3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carbonilmetil)-biciclo[9.3.1]pentadecatrien]-amina.

20

Ejemplo 6.

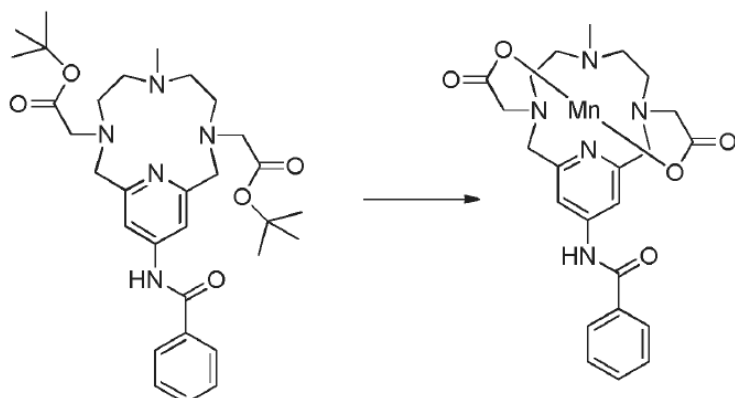
a) Síntesis de N, 13-benzamida-3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(terc-butilcarbonilmetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-trieno



El compuesto obtenido en el ejemplo 2e (160 mg, 0,35 mmol) se disuelve en acetonitrilo (10 mL) y se enfría a 0°C. A continuación se añade cloruro de benzoilo (93 µL, 0,80 mmol) y carbonato potásico (48 mg, 0,35 mmol) y se deja que la reacción alcance temperatura ambiente. Después de 24 h la mezcla de reacción se concentra para dar lugar al producto sin purificar. Que se usa en la siguiente etapa sin purificar.

25

b) Síntesis de N, 13-benzamida-3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carboximetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]-pentadeca-1(14),11(15),12-trieno

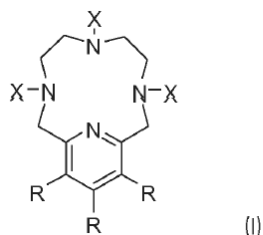


5 El compuesto sin purificar obtenido en el ejemplo 6a se disolvió en ácido fórmico y la mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 1,5h y después se evaporó el disolvente. El sólido sin purificar se disolvió en agua (10 mL) y se ajustó el pH a 7,1 usando NaOH (1 M). Después, se añadió MnCl_2 (69mg, 0,35 mmol) y el pH se ajustó a 7 usando NaOH (1M). Después de 2h la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el complejo de manganeso N, 13-benzamida-3,6,9,15-tetraaza-3,9-bis-(carboximetil)-6-metil-biciclo[9.3.1]-pentadeca-1(14),11(15),12-trieno (60 mg, 33%).

10

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

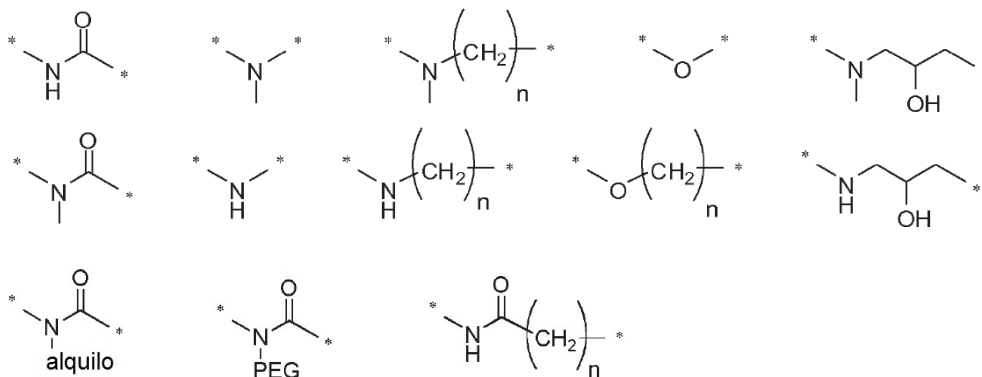


en donde

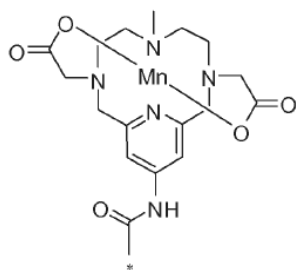
- 5 X es alquilo, $C(Y)_2COOZ$ o un ligando;
 Y es alquilo, -PEG, -COOH, -PO(OH)₂, -H o un ligando;
 R es alquilo, -PEG, -N(alquilo)₂, -N(PEG)₂, -O(alquilo), -O(PEG), -NMe₂, -NH₂, -OMe, -OH, -H o un ligando;
 Z es Mn (II) o -H;

con la condición de que dos de los tres grupos X presentes sean $C(Y)_2COOZ$,

- 10 con una condición adicional de que si Z es Mn (II), dos grupos X que contienen Z comparten un Mn (II);
 en donde el compuesto está unido a otra molécula a través de un ligando, si hay presente un ligando;
 en donde el resto ligando se selecciona del grupo que consiste en



- 15 en donde n es un número entero de 1 a 7 y * denota la posición a través de la cual el ligando, si está presente, se une al compuesto de fórmula (I) y a la dicha otra molécula.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en donde Y es metilo, -COOH, -PO(OH)₂, -H o un ligando.
3. Compuesto según la reivindicación 2, en donde Y es -H o un ligando.
4. Compuesto según la reivindicación 1, en donde Z es Mn (II).
- 20 5. Compuesto según la reivindicación 1, en donde R es H, metilo, -NMe₂, -NH₂, -OMe, -OH o un ligando.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el X restante que no es $C(Y)_2COOZ$ es alquilo C₁-C₆.
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la fórmula (II)



(III)

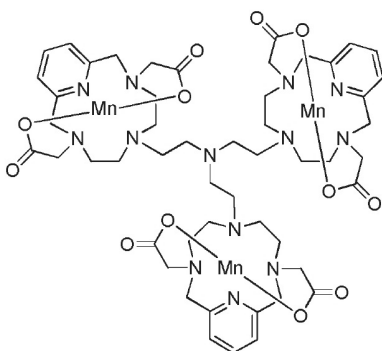
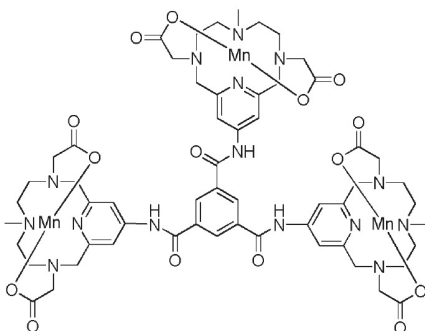
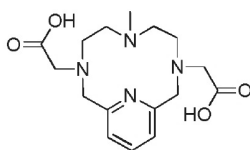
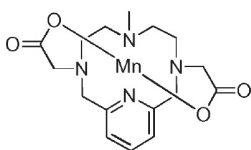
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto está unido a otra molécula a través de dicho ligando.

9. Compuesto según la reivindicación 8, en donde dicha otra molécula es un anillo aromático, inositol o carbohidrato, o cualquier derivado de los mismos.

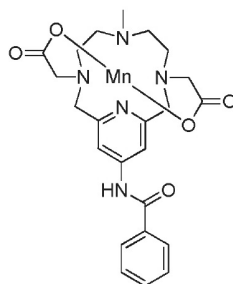
10. Compuesto según la reivindicación 8, en donde dicha otra molécula es un péptido sintético o natural, un aminoácido o derivados del mismo, poliaminas y derivados de las mismas, un peptidomimético, un polipéptido, una proteína, un anticuerpo, un polímero natural o sintético, un dendrímero, una nanopartícula o un compuesto lipofílico.

11. Compuesto según la reivindicación 10, en donde dicha otra molécula es un dendrímero.

12. Un compuesto seleccionado de las siguientes estructuras:



y



13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como agente de contraste de RM.
14. Composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y al menos un vehículo fisiológicamente tolerable.
- 5 15. Método de estudio de imágenes por RM en donde un sujeto previamente administrado con una composición según la reivindicación 14 es sometido a un examen mediante RM, en donde las señales de RM son detectadas a partir del sujeto o de partes del sujeto en las que se distribuye la composición, y opcionalmente se generan imágenes de RM y/o espectros de RM a partir de las señales detectadas.