

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 251**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/10** (2006.01)

**A61K 49/08** (2006.01)

**A61K 47/54** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/US2016/028946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16721317 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3180036**

54 Título: **Complejos metálicos con bifosfonato útiles como agentes de formación de imágenes**

30 Prioridad:

**24.04.2015 US 201562152417 P**

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

**20.05.2019**

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)  
2812 Erwin Road, Suite 306 P.O. Box 90083  
Durham, North Carolina 27705, US**

72 Inventor/es:

**LASCOLA, CHRISTOPHER DAVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 713 251 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

Complejos metálicos con bifosfonato útiles como agentes de formación de imágenes

## 5 Antecedentes

10 Las modalidades de diagnóstico por imagen más avanzadas, la tomografía computarizada (TC) y la generación de imágenes por resonancia magnética (IRM), producen representaciones exquisitas de anatomía humana y patología con una alta resolución espacial. Estas modalidades de generación de imágenes “transversales” representan el estándar de referencia para la evaluación diagnóstica, la caracterización y la monitorización de la respuesta al tratamiento para procesos complejos de enfermedades, y se utilizan para cada región y sistema orgánico en el cuerpo humano.

15 Para aumentar la sensibilidad y especificidad diagnóstica para los estudios de TC y IRM en cáncer, infección, enfermedades neurológicas y cardíacas, a menudo se administra material de contraste por vía intravenosa antes y/o durante la imagen para mejorar la detección y caracterización de estos procesos patológicos. Para la TC, los medios de contraste más comunes se basan en el yodo, que tiene un “borde K” que es ideal para la absorción clínica de rayos X.

20 Para la IRM, el material de contraste más común se basa en complejos moleculares que contienen el metal paramagnético gadolinio (Gd). En los EE. UU., Los nueve agentes de contraste para IRM aprobados por la FDA están basados en Gd. El Gd posee un fuerte “paramagnetismo” que resulta en una señal de IRM localmente aumentada en las imágenes ponderadas en T<sub>1</sub>. Sin embargo, los agentes de contraste basados en Gd pueden provocar una condición rara pero severamente debilitante llamada fibrosis sistémica nefrogénica (NSF), un síndrome que involucra una fibrosis generalizada de la piel, articulaciones, ojos y órganos internos. La OMS y la FDA han emitido restricciones sobre el uso de estos agentes en pacientes con falla/insuficiencia renal, y la FDA exige una advertencia de “recuadro negro” en todos los medios comerciales que contienen gadolinio. Como consecuencia, millones de pacientes en los EE. UU., Y muchos más en todo el mundo, ya no pueden recibir material de contraste para la IRM, lo que limita gravemente la detección y la caracterización de varias enfermedades.

30 Otros complejos paramagnéticos, utilizados más raramente como de investigación o como “fuera de indicación”, se basan generalmente en grandes nanopartículas basadas en óxido de hierro desarrolladas y comercializadas como terapia de reemplazo de hierro por vía intravenosa (por ejemplo, inyección de FERAHEME® (ferumoxytol)). El uso de estos complejos para la IRM es limitado, sin embargo, por sus pobres propiedades de relajación T<sub>1</sub>, fuertes propiedades de relajación T<sub>2</sub><sup>\*</sup>, lo que resulta en una disminución de la señal de IRM (“contraste negativo”) y un gran tamaño molecular, que limita estos agentes a la reserva de sangre hasta que finalmente son eliminados por el sistema reticuloendotelial (es decir, macrófagos, hígado, bazo).

40 Por lo tanto, se necesitan agentes de contraste alternativos útiles para IRM y tecnologías de escaneo similares.

Chris Lascola et al. (Derivable High Spin Fe(III) and Mn(II) Phosphonate Scaffolds for Molecular IRM, Conference abstract No. 2846, INTERNATIONAL SOCIETY FOR MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, ISMRM, 28 de abril de 2014) investigó una nueva clase de bajo peso molecular, complejos de quelatos de Fe (III) y Mn (II) de alto efecto de espín basados en ligandos de pirofosfonato y bisfosfonato, que muestran un potencial de derivación y marcaje paramagnético.

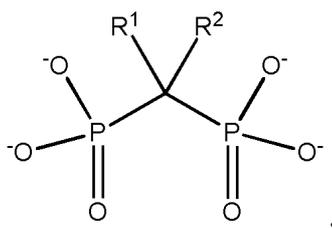
50 Bruno Demoro et al. (Bisphosphonate metal complexes as selective inhibitors of Trypanosoma cruzi farnesyl diphosphate synthase, DALTON TRANSACTIONS: The International Journal for Inorganic, Organometallic and Bioorganic Chemistry, Vol. 41, No. 21, 17 de febrero de 2012, página 6468) investigó ocho complejos metálicos con dos bifosfonatos activos en su búsqueda de compuestos útiles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, una enfermedad tropical.

## Resumen

55 En el presente documento se proporciona un agente de contraste de imágenes de resonancia magnética (IRM) que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por:

Y-X-Z

60 en el que, X es Mn(II) e Y y Z son cada uno independientemente un bisfosfonato de fórmula:



en el que: R<sub>1</sub> es -OH, y R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en: H, alquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo,

5 en el que dicho compuesto tiene una estequiometría de Mn(II): bisfosfonato de 1:2, en el que dicho compuesto es una sal que comprende al menos un metal alcalino (por ejemplo, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) y al menos un metal alcalinotérreo, y en la que dicho compuesto tiene al menos un agua coordinada con dicho Mn(II).

10 En algunas realizaciones, el agente de contraste de IRM tiene un peso molecular inferior a 2.000 daltons o menos de 800 daltons.

15 En algunas realizaciones, el compuesto es octaédrico. En algunas realizaciones, el compuesto es un monohidrato o un dihidrato. En algunas realizaciones, el compuesto es una sal que comprende de 1 a 3 cationes.

X es Mn(II) e Y y Z son cada uno bifosfonato (por ejemplo, 1-hidroxibisfosfonato).

20 En algunas realizaciones, el compuesto está acoplado a uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, un agente quimioterapéutico). En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos están acoplados covalentemente a Y y/o Z.

25 También se proporciona una composición que comprende un agente de contraste de IRM como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua estéril o un tampón estéril tal como solución salina tamponada con fosfato). En algunas realizaciones, la composición se formula para administración intravenosa o intraarterial (por ejemplo, isotónica con sangre). En algunas realizaciones, la composición tiene un pH de 7.0 a 7.4.

30 Se puede usar un agente de contraste como se define en las reivindicaciones en un método para realizar una exploración de IRM en un sujeto que comprende administrar dicho agente de contraste a dicho sujeto antes y/o durante dicha exploración de IRM.

También se proporciona el uso de un agente de contraste de IRM como se enseña en este documento para realizar una exploración de IRM o administrar un agente terapéutico a un sujeto que lo necesite.

35 Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Modo positivo ESI MS del complejo de Na: Mn (Etidronato)<sub>2</sub> paramagnético con Na o meglumina adicional como aductos de sal. Cada uno representa el pico de graves del complejo designado después de la pérdida del fragmento de PO<sub>3</sub> durante la ionización. 1Na: C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O (m/z = 424). 2Na: C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O (m/z = 446) 3Na: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O (m/z = 468) 1Na: C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O: C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (m/z = 619.1) 2Na: C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O: C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (m/z = 641.1) 3Na: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>11</sub>P<sub>3</sub>: Mn: H<sub>2</sub>O: C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (m/z = 663.0)

45 Figura 2. Relajaciones de T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (r<sub>1</sub>, izquierda y r<sub>2</sub>, derecha) de complejos de bifosfonatos de Mn con bifosfonatos disponibles comercialmente, en comparación con el Mn(II) libre.

50 Figura 3. A, Un complejo 2:1 de bisfosfonato de 1-OH y Mn<sup>2+</sup> está favorecido termodinámicamente. Al variar la estequiometría durante la síntesis, no se observa una complejación adicional de Mn<sup>2+</sup> cuando la relación de bisfosfonato a Mn<sup>2+</sup> se eleva por encima de 2:1. El Mn<sup>2+</sup> libre se determina midiendo el solvente T<sub>2</sub> en función del tiempo, ya que r<sub>2</sub> de Mn<sup>2+</sup> es 30 veces mayor que el de Mn<sup>2+</sup> monohidratado completamente quelado (Caravan et al., Mol. Imaging 2009, 4:89). B, los cationes de metales alcalinos aumentan la estabilidad del complejo bifosfonato: Mn<sup>2+</sup> 2:1. Los complejos heteronucleares que contienen al menos un catión Na<sup>+</sup> y al menos un catión Ca<sup>2+</sup> forman los complejos 2:1 más estables, dando como resultado la quelación completa de Mn<sup>2+</sup> monohidratado sin exceso de ligando. La línea punteada horizontal indica el punto en el que r<sub>2</sub> se vuelve 30 veces menor que el valor de MnCl<sub>2</sub> en la solución. C, ESI MS de un complejo heteronuclear de etidronato: Mn 2:1 dos meses después de la síntesis, lo que confirma su estabilidad y estequiometría. C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>: Mn<sup>2+</sup>: Ca<sup>2+</sup>: Na<sup>+</sup> (m/z = 522.8).

55 Figura 4. A, IRM in vivo en ratón de control después administración i.v. de MnNTA. B, resonancia magnética después de administración i.v. de Mn: ETID (50 µl de solución 40 mM).

Figura 5. Mejora dinámica del contraste del tumor 4T<sub>1</sub> después de administración i.v. de complejo 1-hidroxibisfosfonato: Mn unido a inhibidor de HSP90 como en el Esquema 1C, 25 mg/kg. El gráfico de la izquierda muestra el cambio relativo en el aumento de T<sub>1</sub> en tumores después del fármaco marcado (n=5) y después del complejo Mn: ETID solo (n=6).

Figura 6. PK y biodistribución de 2:1 de etidronato: Mn<sup>2+</sup> complejo sintetizado con Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>: Mn<sup>2+</sup>: xCa<sup>2+</sup>: xNa<sup>+</sup>). A, análisis de contraste dinámico (DCE) del agente de contraste durante 60 minutos después de la administración intravenosa. El aumento de picos en los órganos y el sistema musculoesquelético rastrea a la par que los cambios en la aorta, lo que indica que el agente de contraste permanece intacto y extracelular. B, el análisis DCE de los sistemas excretores muestra una eliminación intacta a través de los riñones y el hígado/vesícula biliar. C, las imágenes ponderadas T<sub>1</sub> de laúd de color normalizado mostraron cambios relativos en los sistemas de órganos durante los primeros 60 minutos, luego a las 24 y 48 horas. A las 24 horas, no se observan cambios de contraste residual en todo el sujeto, excepto en los riñones. Los últimos cambios están casi resueltos en 48 horas. Los cambios en la intensidad de la señal en el estómago a las 24 y 48 horas (cuadrante superior izquierdo) son secundarios al paramagnetismo incidental en la alimentación.

Figura 7. Complejo paramagnético de Fe (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub> y derivado de pirofosfato de hierro tiamina. A, diagrama molecular de Fe(P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub> que ilustra dos aguas de coordinación de la esfera interna. B, ESI MS del complejo. Que este complejo permanezca intacto en condiciones ESI es una prueba más de su estabilidad. C, complejo de hierro del complejo paramagnético formado a partir de pirofosfato de tiamina. D, modo positivo ESI MS del complejo de tiamina pirofosfato de hierro paramagnético. \* C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Fe (m/z = 902); \*\* C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Fe + C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> [meglumina] (m/z = 1097); C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Fe - N<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>[fragmento de aminodimetilpiridina] (m/z = 781); C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>P<sub>4</sub>S<sub>2</sub>Fe - (2)N<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub> (m/z = 660).

#### Descripción detallada

Como se usa en el presente documento en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el presente documento se proporcionan compuestos útiles como agentes de contraste. “Compuesto” como se usa en este documento se refiere a una molécula que tiene átomos unidos por enlaces covalentes, de coordenadas y/o iónicos.

El “agente de contraste”, como se usa en el presente documento, es una sustancia que se usa para mejorar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo en formación de imágenes médicas. Los ejemplos de agentes de contraste conocidos incluyen, entre otros, agentes de radiocontraste y agentes de contraste de IRM.

Un “agente de radiocontraste” es una sustancia que puede mejorar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo durante una exploración basada en rayos X. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, yodo y bario.

Un “agente de contraste de IRM” es una sustancia (por ejemplo, compuesto y/o complejo) que puede mejorar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo durante una exploración de IRM. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, agentes de contraste paramagnéticos tales como agentes que contienen gadolinio(III) o quelatos de manganeso, y agentes superparamagnéticos tales como partículas de hierro platino. Véase también las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nos. 2014/0350193 de Axelsson et al.; 2014/0234210 a Lin et al.

En algunas realizaciones, el uso de un agente de contraste de la presente invención puede mejorar el contraste (también conocido como “atenuación” en CT, “señal” en IRM) de tejidos tales como arterias y venas de un sujeto, mejorando en gran medida la delimitación de la anatomía vascular y patología. Los ejemplos de enfermedades vasculares que pueden detectarse con contraste incluyen placa aterosclerótica, trombosis, malformaciones vasculares, aneurismas y disecciones arteriales.

En algunas realizaciones, el uso de un agente de contraste de la presente invención puede mejorar la “atenuación” o “señal” en tejidos enfermos de un sujeto donde el material de contraste se acumula transitoriamente en el compartimento extracelular (intersticio) de las regiones enfermas después del “primer paso” a través de los vasos sanguíneos. De acuerdo con lo anterior, el aumento de tejido a menudo se observa en tumores, infección, inflamación, desmielinización y tejido con infarto agudo.

En algunas realizaciones, los agentes de contraste como se enseñan en este documento tienen un peso molecular de menos de 2,000 daltons, 1,500 daltons, 1,000 daltons, 800 daltons, o 500 daltons. Dichos agentes de bajo peso molecular pueden mejorar la imagen de los tejidos, por ejemplo, permitiendo la difusión desde la sangre a través de vasos sanguíneos enfermos “con fugas”.

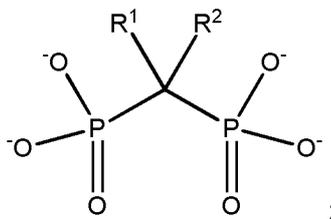
En algunas realizaciones, los agentes de contraste comprenden manganeso (Mn(II)) de alto efecto de espín, cada uno con 5 electrones no apareados, complejados con bisfosfonato.

Los ejemplos específicos de bifosfonatos que se pueden usar para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alendronato, risedronato, clodronato, tiludronato, ibandronato, incadronato, zolendronato, pamidronato, medronato, minodronato, neridronato, olpadronato, tiludronato, etidronato (1-hidroxi-etilenobisfosfonato) y sus sales y/o sus ésteres.

5

En algunas realizaciones, el bisfosfonato es un 1-hidroxi-bisfosfonato.

En algunas realizaciones, el bisfosfato tiene una fórmula:



10

en la que: R<sub>1</sub> es -OH; y R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en: H, alquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo.

15 "Alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada, o cíclico que contiene de 1 a 10 átomos de carbono (es decir, C<sub>1-10</sub>). Ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, tert-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. "Alquilo inferior", como se usa en este documento, es un subconjunto de alquilo y se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de alquilo inferior incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, tert-butilo, ciclopropilo, ciclobutilo y similares. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados, tales como halo, hidroxilo, carboxilo, amina, etc.

25 "Ariilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillo carbocíclico monocíclico o un sistema de anillo carbocíclico bicíclico fusionado o directamente contiguo que tiene uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, fenilo, indanilo, indenilo, tetrahidronaftilo, y similares. Como se señaló, en algunas realizaciones, el ariilo tiene dos anillos aromáticos, cuyos anillos están fusionados o directamente unidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bifenilo, naftilo, azuleno, etc. El ariilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes adecuados, tales como alquilo, halo, hidroxilo, carboxilo, amina, etc.

35 "Heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo aromático monovalente que tiene un solo anillo o dos anillos fusionados o directamente adyacentes y que contiene en al menos uno de los anillos al menos un heteroátomo (típicamente 1 a 3) seleccionado independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, pirrol, imidazol, tiazol, oxazol, furano, tiofeno, triazol, pirazol, isoxazol, isotiazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, triazina y similares. Como se señaló, en algunas realizaciones, el heteroarilo tiene dos anillos aromáticos, cuyos anillos están fusionados o directamente unidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, benzotiofeno, benzofurano, indol, benzoimidazol, benzotiazol, quinolina, isoquinolina, quinazolina, quinoxalina, fenilpirrol, feniltiofeno, etc. El heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes adecuados, tales como alquilo, halo, hidroxilo, carboxilo, amina, etc.

45 A menos que se indique lo contrario, la nomenclatura utilizada para describir grupos químicos o fracciones como se usa en el presente documento sigue la convención donde, leyendo el nombre de izquierda a derecha, el punto de unión al resto de la molécula está en el lado derecho del nombre. Por ejemplo, el grupo "alquil C<sub>1-6</sub> ariilo" está unido al resto de la molécula en el extremo alquilo C<sub>1-6</sub>.

A menos que se indique lo contrario, cuando un grupo químico se describe por su fórmula química, que incluye una fracción de enlace terminal indicado por "-", se entenderá que la unión se lee de izquierda a derecha.

50 El Mn(II) de alto espín es un excelente metal paramagnético candidato que posee 5 electrones no apareados, relajación electrónica favorable y tiempos de residencia en el agua (T<sub>m</sub> << T<sub>1</sub>) para la mejora de la IRM. Como metal libre, el Mn también es menos tóxico que el Gd, con un grupo natural y varios mecanismos homeostáticos para el procesamiento.

55 En el pasado, el desarrollo de complejos paramagnéticos de Mn para IRM ha sido desafiado por la inherente capacidad de coordinación de Mn(II) (por ejemplo, la serie de Irving Williams), lo que resulta en la propensión de que Mn(II) sea trans-metalado por otros metales endógenos como el zinc in vivo. Sin embargo, el complejo de bisfosfonato de Mn(II) divulgado en el presente documento tiene una estabilidad in vivo notable, permaneciendo intacto cuando se usa solo como material de contraste de tejido o acoplado a otros fármacos de molécula pequeña. Cuando se usa solo,

finalmente se elimina a través de los riñones y el hígado/vesícula biliar/intestino en un curso de tiempo similar al de los materiales comerciales de contraste basados en Gd.

5 El compuesto de bisfosfato de Mn tiene una estequiometría de: 1 Mn: 2 bisfosfonato (por ejemplo, etidronato); tiene al menos un H<sub>2</sub>O coordinado (por ejemplo, monohidrato o dihidrato); tiene al menos un metal alcalino (por ejemplo, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) o un metal alcalinotérreo (por ejemplo, Ca<sup>++</sup> o Mg<sup>++</sup>); y/o tiene al menos un catión adicional (por ejemplo, Na<sup>+</sup>, meglumina, etc.).

10 En algunas realizaciones, el agente de contraste tiene una capacidad de relajación  $r_2$  de 5, 8 o 10 a 15, 18, 20, 25, 30, 35 o 40 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> medida a 7 Tesla (por ejemplo, a 22 grados Celsius, Tris 2 mM). ddH<sub>2</sub>O tamponado, y/o pH 7.0). Sin querer limitarse a ninguna teoría, el Mn libre en solución (por ejemplo, sal de MnCl<sub>2</sub>) tiene una relajación de T<sub>2</sub> baja/una capacidad de relajación de  $r_2$  alta (mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) debido al aumento de la susceptibilidad de T<sub>2</sub>\* así como los efectos espín-espín (T<sub>2</sub>'). T<sub>2</sub> (y, por lo tanto,  $r_2$ ) son una función de T<sub>2</sub>\* y T<sub>2</sub>'. Los iones libres hidratados se agrupan junto con varias aguas de la esfera interna que coordinan, lo que aumenta la falta de homogeneidad del campo magnético local y las interacciones espín-espín entre las moléculas de agua unidas y solventes. Cuando los iones Mn individuales se coordinan con un ligando, se reducen los agrupamientos y, por lo tanto, se reducen los efectos T<sub>2</sub>\* (y la relajación de  $r_2$ ). Los complejos de Mn fuertes con solo una esfera de agua coordinada interior también tienen interacciones de espín-espín disminuidas y, por lo tanto, los efectos de T<sub>2</sub> en virtud de un menor intercambio entre las moléculas de agua unidas y solventes. Cuando los iones Mn individuales se complejan completamente con un ligando quelato en solución, se determinó previamente que el  $r_2$  medido del metal quelato es 30 veces menor que el metal libre en solución. Véase Caravan et al., Mol. Imaging 2009, 4:89. Así,  $r_2$  puede ser un marcador del grado de complejación. Véase también la FIG. 3.

25 La complejación del metal puede conducir a una toxicidad reducida y/o a una estabilidad incrementada del agente de contraste. El metal libre como el Mn administrado por vía intravenosa puede tener efectos de toxicidad deletéreos inmediatos. Para la Mn libre, en particular, la toxicidad cardio puede ser una preocupación debido a los efectos cronotrópicos/ionotrópicos negativos. Se observan diferencias de PK/biodistribución, por ejemplo, con 1:1 Mn:bisfosfonato en comparación con el complejo 1:2, así como con síntesis con cationes como meglumina y colina en lugar de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> (datos no mostrados). La toxicidad también se puede detectar durante las inyecciones, con cardio rápido y supresión respiratoria a dosis equivalentes que no se ven con los complejos Mn:bisfosfonato de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> 1:2 (datos no mostrados).

35 En algunas realizaciones, un complejo como se enseña en el presente documento puede comprender uno o más agentes terapéuticos. En estas realizaciones, la monitorización en tiempo real de la administración del (de los) agente(s) terapéutico(s) puede realizarse mediante la detección del complejo. El agente terapéutico puede complejarse con el agente de contraste o unirse covalentemente a un ligando en él, directamente o a través de un enlazador.

40 En algunas realizaciones, el bisfosfonato se puede acoplar directamente a un agente terapéutico antes de la complejación del metal. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se acopla directamente al carbono puente entre los fosfonatos del bisfosfonato. En algunas realizaciones, el bifosfonato se acopla al agente terapéutico a través del éster de fosfato. En algunas realizaciones, el bifosfonato se acopla a un agente terapéutico a través de un enlazador (por ejemplo, un alquileo, alquilencarbonilo, carbonilalquileo, un grupo carbonilo, maleimida, PEG, etc.), antes de la complejación del metal. Véase también la patente de EE.UU. No. 8,247,572 de Kraus et al.

45 La presente divulgación se refiere principalmente al uso del agente de contraste para la exploración y/o el tratamiento de sujetos humanos, pero dicha exploración y/o tratamiento también se puede llevar a cabo en sujetos animales, particularmente en sujetos mamíferos tales como ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos con fines veterinarios, y con fines de detección y desarrollo de fármacos.

50 El término "tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de tratamiento que imparte un beneficio a un paciente afectado por una enfermedad, incluida la mejora en la afección del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc.

55 El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa que el compuesto o composición es adecuado para la administración a un sujeto para lograr los tratamientos descritos en este documento, sin efectos secundarios excesivamente perjudiciales a la luz de la gravedad de la enfermedad y la necesidad del tratamiento.

La presente invención se explica con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Complejo de bisfosfonato de manganeso de bajo peso molecular para formación de imágenes moleculares y terapia multiplexada

65 Ejemplo de síntesis del complejo Mn(II) de alto espín

- 5 A un volumen final deseado de agua destilada doble y bajo agitación constante, agregue 2 equivalentes de ácido etidróico y 4 equivalentes de bicarbonato de sodio. El pH de la solución será ~3.8-4.0 después de 10 minutos. Luego, el pH puede ajustarse más por NaOH diluido a ~5.5-7.0. A continuación, se añade 1 equivalente de MnCl<sub>2</sub>. Después de la adición de MnCl<sub>2</sub>, la solución, como se esperaba, se volverá más ácida (pH~3-4), pero el pH debe elevarse con una base moderadamente diluida, como el NaOH, hasta 7.0-7.5. Los resultados más consistentes y efectivos se lograron cuando el pH está entre 5-7 antes de la adición de Mn(II), y un catión de metal alcalino (por ejemplo, Na) está presente por adelantado para coordinar al menos con los dos oxígenos de fosfato en etidronato que tienen pKa de 0.70 y 1.46.
- 10 Se puede emplear un tampón de amina ligeramente básico, como Tris, inicialmente o después de la adición de reactivos primarios con un buen resultado para asegurar un pH de neutralidad o mayor, aunque al menos dos equivalentes de Na<sup>+</sup> por molécula de ácido etidróico antes de la adición de Mn parece particularmente beneficioso. El calor para esta reacción no es necesario.
- 15 Como con el complejo de pirofosfato de hierro descrito en el Ejemplo 3 a continuación, el producto puede precipitarse y aislarse con un exceso de disolvente orgánico polar (por ejemplo, acetona, MeOH, ETOH), sin embargo, este complejo en particular es más soluble (menos hidrófilo) en estos Los solventes y la precipitación y el aislamiento requieren más tiempo y desafío. El aislamiento alternativo del producto sólido final también se puede lograr mediante secado por congelación directa.
- 20 Se evaluó el comportamiento in vivo de dos ligandos relativamente fuertes (log K<sub>1</sub> >7) para la quelación de Mn(II), ácido nitrilotriacético (NTA), estrechamente relacionado con el EDTA, y ácido 3,4-dihidrobenczoico (3,4-DBA). Ambos forman fácilmente complejos de coordinación Mn(II) y muestran perfiles de relajación similares a los quelatos de Gd comerciales. La generación de imágenes por RM in vivo de estos agentes después de la administración i.v., sin embargo, reveló biodistribuciones idénticas tanto para NTA como para 3,4-DBA, consistentes con la liberación de Mn libre y la captación hepatocelular, es decir, un fuerte aumento del parénquima, la ausencia de un mejoramiento de la vesícula biliar y no hay evidencia de eliminación renal (Figura 4A).
- 25 Este comportamiento in vivo también fue lo que se observa para el agente aprobado por la FDA Teslascan. En el pasado, el desarrollo de complejos paramagnéticos de Mn para IRM ha sido desafiado por la inherente capacidad de coordinación de Mn(II) (por ejemplo, la serie de Irving Williams), lo que resulta en la propensión de Mn(II) a ser transalcalificado por otros metales endógenos. como el zinc in vivo. El único complejo Mn(II) PM aprobado por la FDA aprobado para la IRM fue Teslascan, que ahora ha sido discontinuado. Teslascan se distribuyó inmediatamente al hígado, liberando Mn libre que luego fue captado por los hepatocitos. Por lo tanto, la mejora del contraste se basó en Mn libre y se limitó al hígado. Además, también se observó un aumento cardíaco tanto para NTA como para 3,4-DBA, lo que indica Mn libre liberado en el trombo antes de ingresar al hígado.
- 30 En comparación con NTA y 3,4-DBA, administración i.v. de 30 mg/kg de Mn(II) de etidronato revela inicialmente una sorprendente fase de acumulación de sangre arterial, seguida de un rápido aumento del sistema colector renal y de la vejiga urinaria, así como de la vesícula biliar (Figura 4B). Se observa un aumento del parénquima hepático, aunque es sustancialmente menos intenso que NTA y 3,4-DBA, alcanzando un máximo de 10-15 minutos después de la administración y regresando a los valores normales de T<sub>1</sub> en 4 horas. También se observa un aumento del intestino, pero es más variable, se cree que representa la eliminación del complejo de coordinación desde la vesícula hasta el intestino delgado. Además, se observan cambios sutiles pero transitorios de T<sub>1</sub> en los músculos esqueléticos y huesos largos que vuelven a la normalidad después de 30 min, en paralelo a los leves cambios residuales de T<sub>1</sub> en los vasos principales, compatibles con un trombo en lugar del efecto de captación del parénquima local. No se observan cambios en T<sub>1</sub> en el cerebro o la columna vertebral (n=20).
- 35 Ejemplo 2: Diferencias en la complejación de Mn en agentes de contraste.
- 50 Se encontró que un complejo 2:1 de bisfosfonato de 1-OH y Mn<sup>2+</sup> está favorecido termodinámicamente. Al variar la estequiometría durante la síntesis, no se observa una complejación adicional de Mn<sup>2+</sup> cuando la relación de bisfosfonato a Mn<sup>2+</sup> se eleva por encima de 2:1. (FIG. 3)
- 55 El Mn<sup>2+</sup> libre se determina midiendo el solvente T<sub>2</sub> en función del tiempo, ya que r<sub>2</sub> de Mn<sup>2+</sup> es 30 veces mayor que el de Mn<sup>2+</sup> monohidratado completamente quelado (Caravan et al., Mol. Imaging 2009, 4:89). Las mediciones de la relajación de los complejos 1-OH bifosfonato: Mn<sup>2+</sup> y MnCl<sub>2</sub> se realizaron a 7T a 22°C en ddH<sub>2</sub>O tamponado con Tris 2 mM. Las soluciones que contenían sodio se valoraron con NaOH a pH 7.0. Las soluciones sin sodio se valoraron a pH neutro con la base de catión correspondiente (colina o meglumina). Se prepararon soluciones madre para cada muestra con 20 mM Mn<sup>2+</sup>. r<sub>1</sub> y r<sub>2</sub> se calcularon a partir de los métodos de mapeo basados en el eco de espín rápido RM convencional para concentraciones de muestra a 200 micromolar.
- 60 Se encontró que los cationes de metales alcalinos aumentan la estabilidad del complejo 2:1 bisfosfonato: Mn<sup>2+</sup>. Los complejos heteronucleares que contienen al menos un catión Na<sup>+</sup> y al menos un catión Ca<sup>2+</sup> forman los complejos 2:1 más estables, dando como resultado la quelación completa de Mn<sup>2+</sup> monohidratado sin exceso de ligando.
- 65

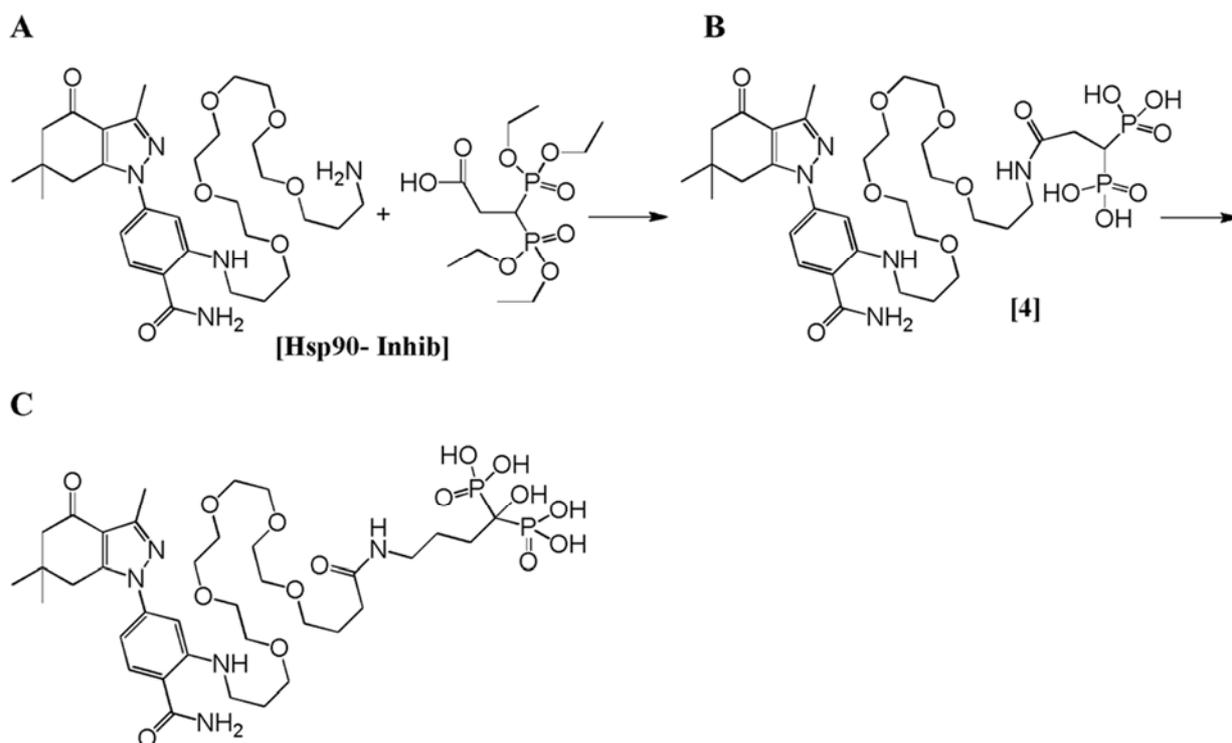
Ejemplo 3: Fármacos de pequeña molécula derivados del ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico complejados con metal para la biodistribución modificada, la formación de imágenes de diagnóstico y la actividad terapéutica mejorada.

5 Los complejos de bisfosfonato de Mn ofrecen nuevas oportunidades para crear una serie de nuevas sondas de generación de imágenes moleculares para la terapia guiada por imágenes y la generación de imágenes por RM. Los 1-hidroxi-etilendifosfonatos son fáciles de acoplar, ya sea a través de su grupo R<sub>2</sub> del carbono central o vis. esterificación de fosfato y, por lo tanto, se puede derivar con muchos fármacos de moléculas pequeñas existentes que poseen dianas y/o actividades terapéuticas conocidas.

10 Además del tratamiento de afecciones relacionadas con los huesos, los bifosfonatos han mostrado recientemente una promesa significativa como adyuvantes quimioterapéuticos para varias neoplasias malignas. Se considera que el mecanismo de acción es a través de la inhibición de la farnesilfosfato de fosfato sintasa (FDPS) y/u otras enzimas intracelulares que normalmente utilizan pirofosfato, el análogo estructural del bisfosfonato. Con el co-transporte intracelular de bifosfonatos complejados con moléculas pequeñas ávidas por el tumor y Mn, los bifosfonatos permiten la formación de imágenes moleculares y una segunda actividad terapéutica además de la de la molécula original.

20 Finalmente, vale la pena señalar que se cree que el Mn libre es tóxico neurológicamente si se permite que se acumule a altas concentraciones en ciertas poblaciones neuronales. Cuando las concentraciones de Mn exceden el grupo de unión intracelular, Mn, al igual que con el Fe y otros metales de transición, estimula la producción de radicales libres mediada por Fenton, particularmente en la co-presencia de especies redox-activas elevadas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ascorbato y quinonas. Sin embargo, dado que la acumulación de Mn en los tejidos se visualiza fácilmente con IRM, sin embargo, la administración selectiva de los agentes que contienen Mn se controla fácilmente. (De hecho, en experimentos de IRM en animales enteros con mapeo cuantitativo de T<sub>1</sub> de alta resolución, no se observó ninguna acumulación de Mn en el SNC después de la administración de bisfosfonato de Mn incluso a una dosis >10x). En las invenciones divulgadas, se confirmó la acumulación selectiva de Mn en células cancerosas, por IRM, por lo tanto, permite otra oportunidad terapéutica a través de la citotoxicidad mediada por redox controlada, activada por la administración adyuvante de controladores redox selectivos de tumores tales como ascorbato parenteral de dosis alta y/o inhibidores de la quinona reductasa II.

30 Se usaron varias estrategias sintéticas para marcar fármacos de molécula pequeña ya sea directamente o a través de enlazadores de polietilenglicol (PEG). Dos complejos de plomo, el primero con un análogo de medronato (Esquema 1B) a través del enlazador PEG terminado en amina, y el segundo un análogo de etidronato acoplado a través del enlazador PEG terminado en COOH (Esquema 1C), ahora se han sintetizado, caracterizado y estudiado preliminarmente in vivo. Los datos piloto para ambos complejos muestran una acumulación progresiva de mejora en los tumores 4T<sub>1</sub> que es mayor que lo que se ve para el complejo de coordinación paramagnética solo (Figura 5). Los datos preliminares sobre la administración del compuesto HSP90i sin atadura 30 min antes de la administración paramagnética también sugieren alguna inhibición competitiva del complejo PM del fármaco original.

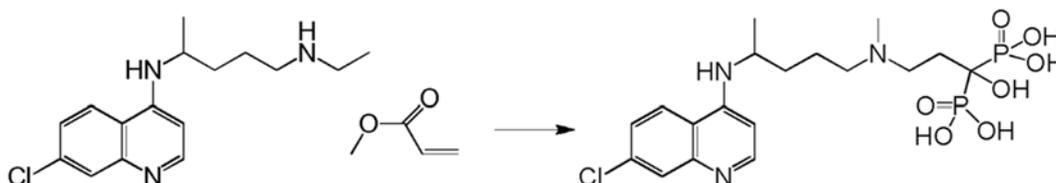


40

Esquema 1. Inhibidores HSP90 funcionalizados con bifosfonato. A, Inhibidor HSP90 de “alta acumulación”, selectivo de células de cáncer se deriva con n enlazador PEG corto, y se enlazan a un grupo amina que no interfiere con la selectividad HSP90 de la molécula. B, el análogo de medronato se liga entonces al PEG. C, análogo 1-hidroxibisfosfonato se liga al PEG.

5 También se sintetizó un derivado de 1-hidroxibisfosfonato de la cloroquina, un inhibidor de la 4-aminoquinolina quinona reductasa 2, otro fármaco de molécula pequeña bien caracterizada con alta selectividad acumulativa en muchos cánceres. Además de la acumulación selectiva, la cloroquina ha mostrado una promesa reciente como un complemento eficaz en los ensayos de quimioterapia.

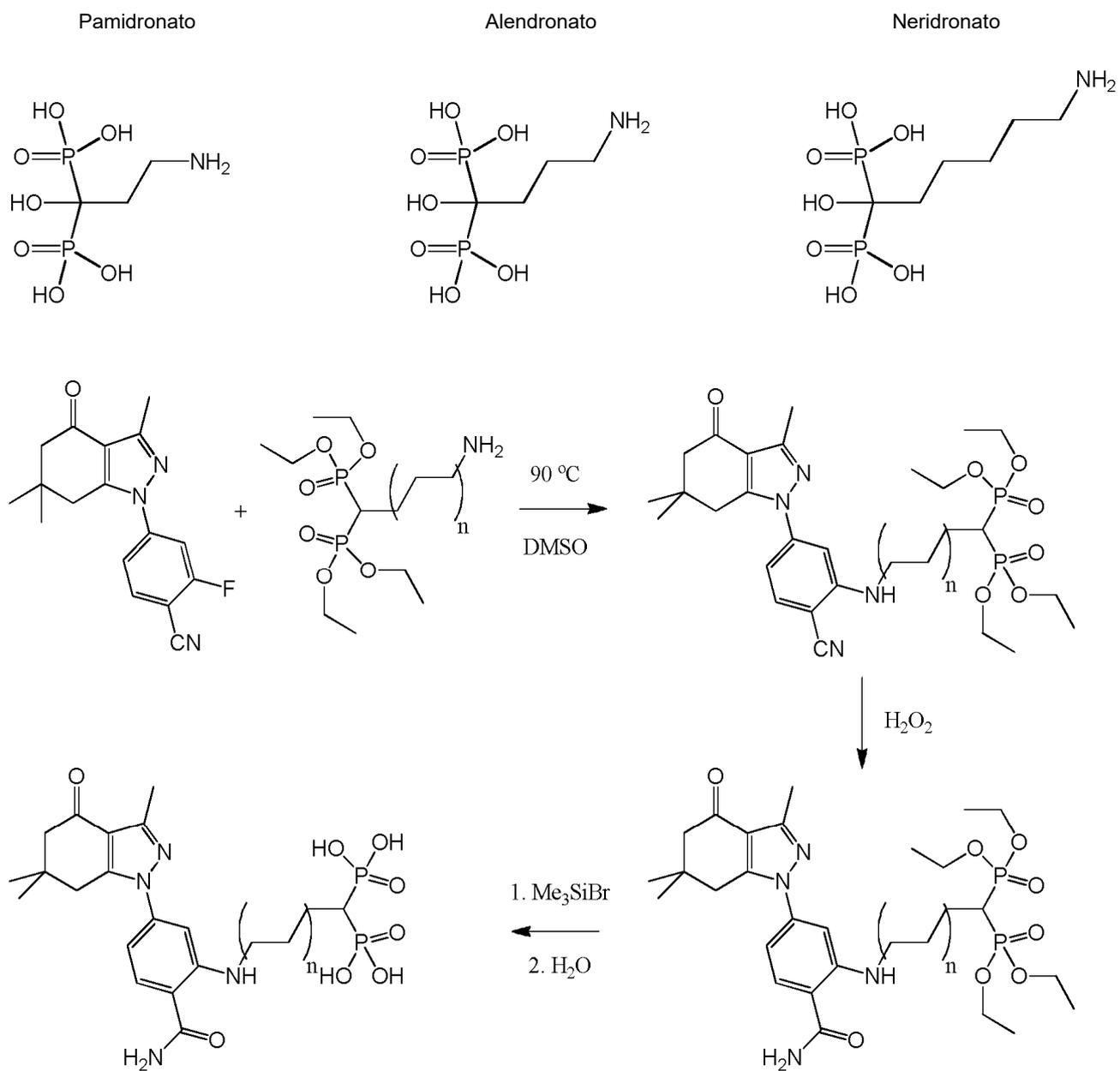
10



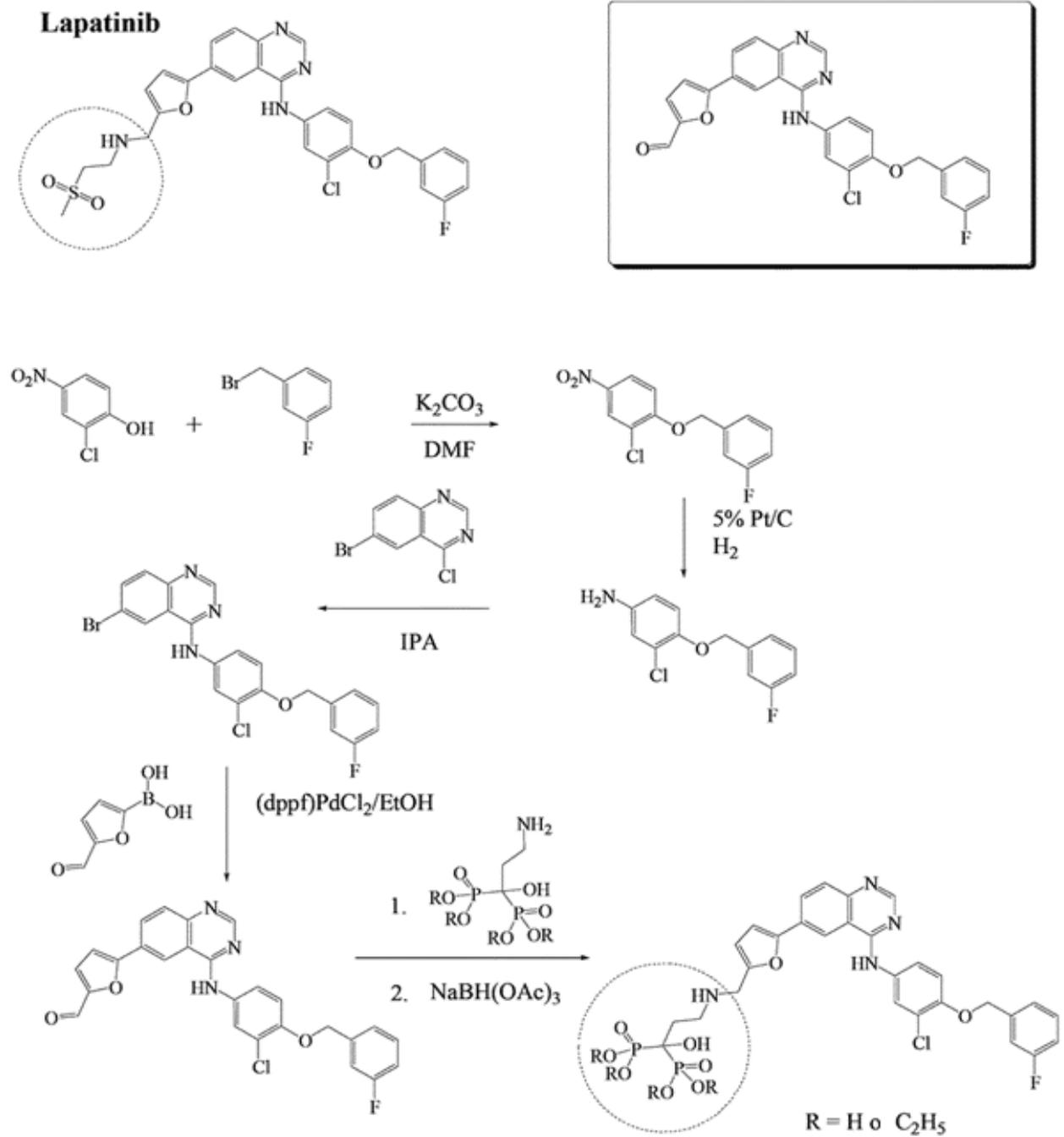
Esquema 2. Derivado de 1-hidroxibisfosfonato de cloroquino 4-aminoquinolina

15 La funcionalización con 1-hidroxibisfosfonato de fármacos de moléculas pequeñas se puede realizar mediante la conjugación directa de estas moléculas o mediante puentes moleculares (por ejemplo, PEG) ligados a estas moléculas pequeñas y análogos de 1-hidroxibisfosfonato. Se pueden usar para formar una posterior complejación de metal útil para aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas. El Esquema 3 y el Esquema 4 presentan métodos de ejemplo para enlaces directos a un inhibidor de la HSP90 ya un medicamento aprobado por la FDA, lapatinib, un inhibidor de la

20 tirosina quinasa de alta acumulación que se usa para el tratamiento de algunos cánceres de mama.



5 Esquema 3. 1-hidroxibisfosfonatos disponibles comercialmente con grupos R2 de terminal amina (arriba) y síntesis propuesta para acoplamiento directo de bisfosfonato para el inhibidor HSP90.



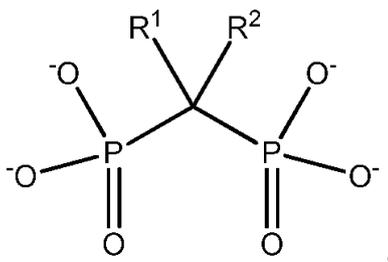
Esquema 4. Síntesis propuesta para acoplamiento 1-hidroxibisfosfonato directo de lapatinib.

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente de contraste de imágenes de resonancia magnética (IRM) que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por:

5 Y-X-Z

en el que, X es Mn(II) e Y y Z son cada uno un bifosfonato de fórmula:



10 en el que: R<sup>1</sup> es -OH, y R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en: H, alquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo,

15 en el que dicho compuesto tiene una estequiometría Mn (II): bisfosfonato de 1:2,

en el que dicho compuesto es una sal que comprende al menos un metal alcalino (por ejemplo, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) y al menos un metal alcalinotérreo, y

20 en el que dicho compuesto tiene al menos un agua coordinada con dicho Mn(II).

2. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que el agente de contraste tiene un peso molecular de menos de 2,000 daltons, tal como menos de 800 daltons.

25 3. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que el compuesto es octaédrico.

4. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que el compuesto es un monohidrato o un dihidrato.

30 5. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que dicho bifosfonato es etidronato.

6. El agente de contraste para IRM de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho agente de contraste para IRM tiene una capacidad de relajación r<sub>2</sub> de 5 a 18 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> medida a 7 Tesla, 22 grados Celsius, en ddH<sub>2</sub>O tamponado con Tris 2 mM, pH 7.0.

35 7. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un metal alcalinotérreo es calcio.

8. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un metal alcalinotérreo es magnesio.

40 9. El agente de contraste para IRM de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que dicho al menos un metal alcalino es sodio.

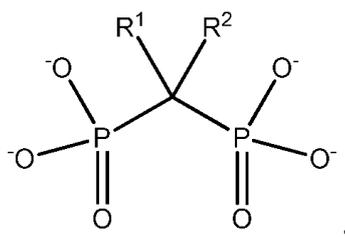
10. Un agente de contraste de imágenes de resonancia magnética (IRM) que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por:

45 Y-X-Z

en el que,

X es Mn(II) e Y y Z son cada uno un bifosfonato de fórmula:

50



en el que: R<sup>1</sup> es -OH, y R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en: H, alquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo,

5

en el que dicho compuesto tiene una estequiometría Mn(II): bisfosfonato de 1:2, y

en el que dicho compuesto es una sal que comprende al menos un metal alcalino (por ejemplo, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) o un hidrato de la sal farmacéuticamente aceptable,

10

en el que uno o más agentes terapéuticos están acoplados covalentemente a Y y/o Z.

11. Una composición que comprende el agente de contraste de IRM de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua o solución salina tamponada con fosfato, y en donde dicha composición se formula opcionalmente para administración intravenosa o intraarterial.

15

12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicha composición tiene un pH de 6.0 a 8.0, tal como 7.0 a 7.4.

13. Un método para realizar una exploración de imágenes de resonancia magnética (IRM) en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto antes y/o durante dicha exploración de IRM una composición que comprende un agente de contraste de imágenes de resonancia magnética (IRM) que comprende:

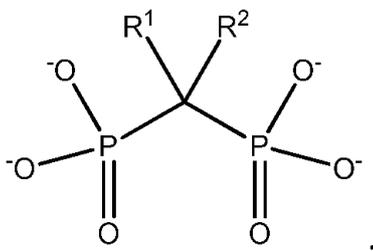
20

un compuesto que tiene una estructura representado por:

Y-X-Z

25

en el que, X es Mn(II) e Y y Z son cada uno un bisfosfonato de fórmula:



30

en el que: R<sup>1</sup> es -OH, y R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en: H, alquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, arilalquilo y heteroarilalquilo,

en el que dicho compuesto tiene una estequiometría Mn(II): bisfosfonato de 1:2, y

35

en el que dicho compuesto es una sal que comprende al menos un metal alcalino (por ejemplo, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) o un hidrato de la sal farmacéuticamente aceptable, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, como agua o solución salina tamponada con fosfato, y

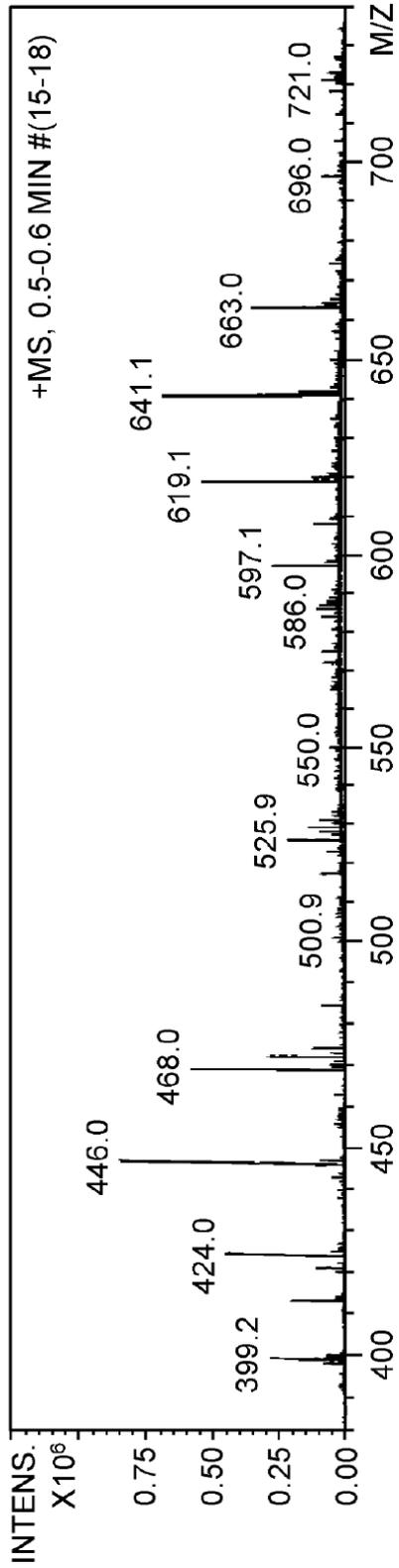
en el que dicha composición está formulada opcionalmente para administración intravenosa o intraarterial.

40

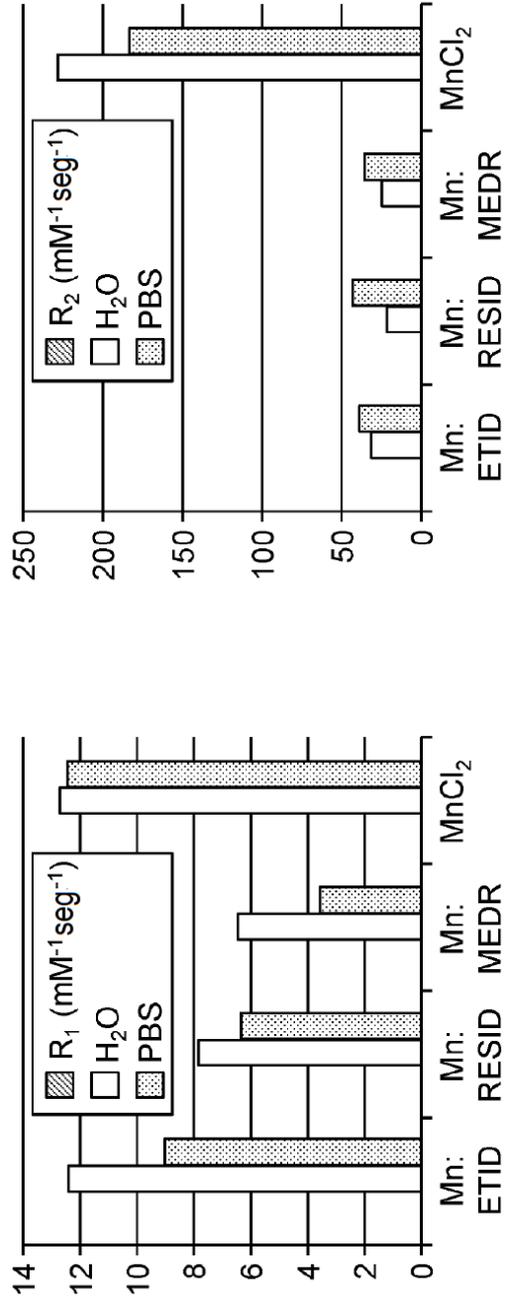
14. Un agente de contraste para IRM para uso en un método para administrar un agente terapéutico a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar el agente de contraste para IRM de la reivindicación 10 a dicho sujeto en una cantidad eficaz para el tratamiento.

45

15. El agente de contraste de IRM para usar en un método para administrar un agente terapéutico a un sujeto que lo necesite de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el método comprende además detectar el agente de contraste de IRM con IRM en dicho sujeto.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

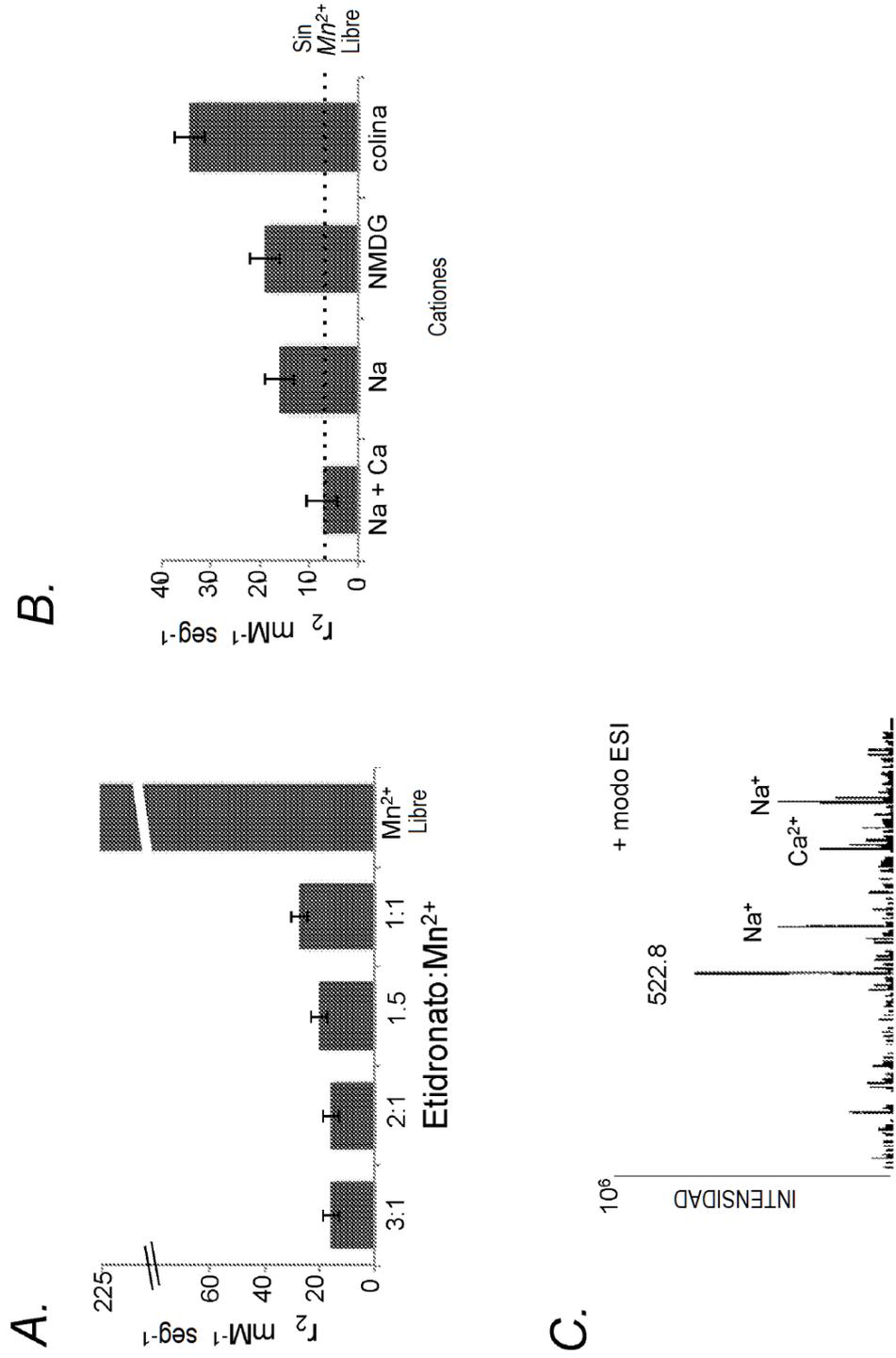


FIG. 3

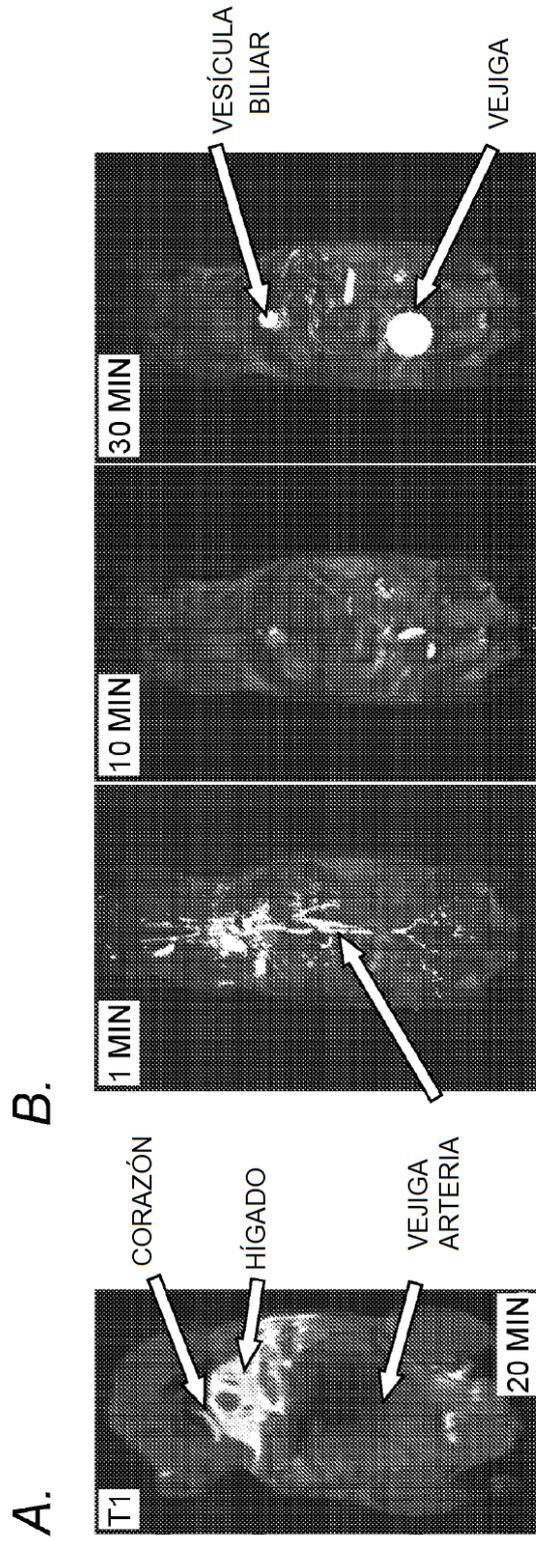


FIG. 4

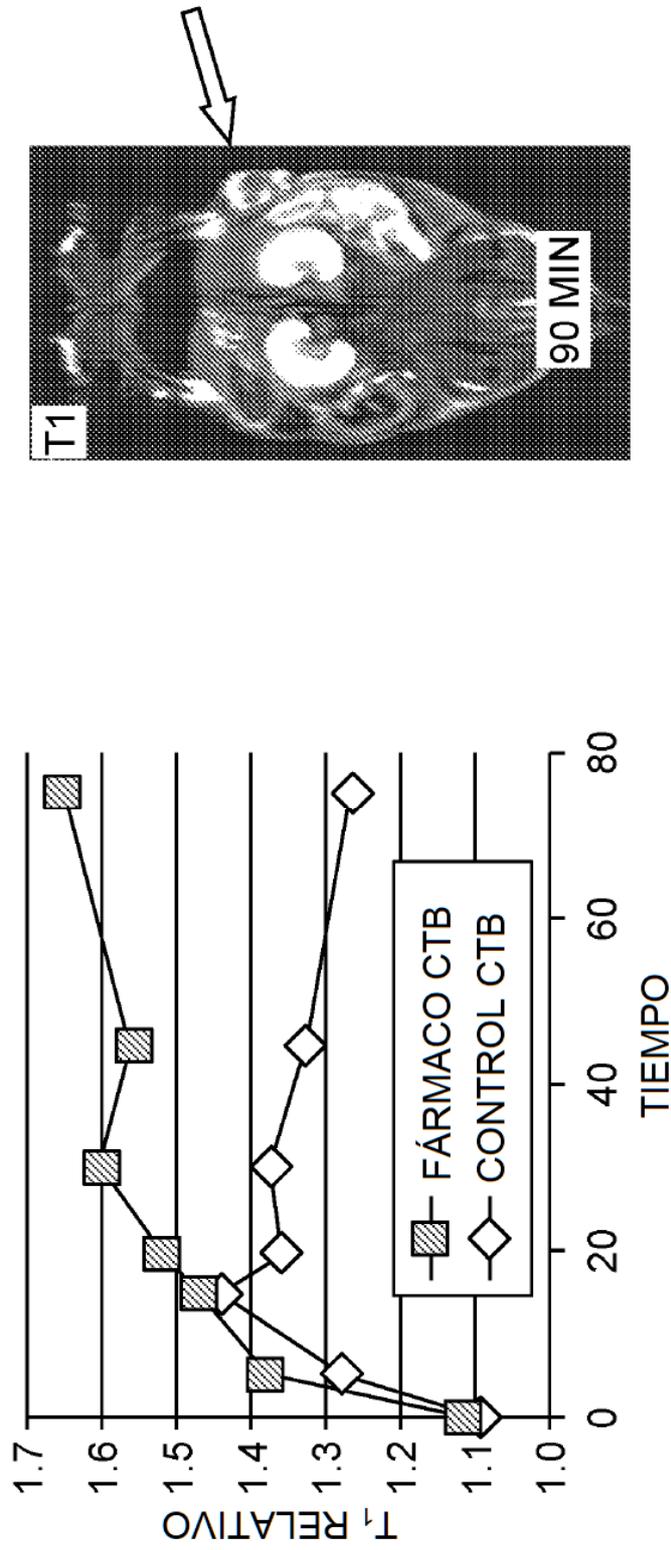


FIG. 5

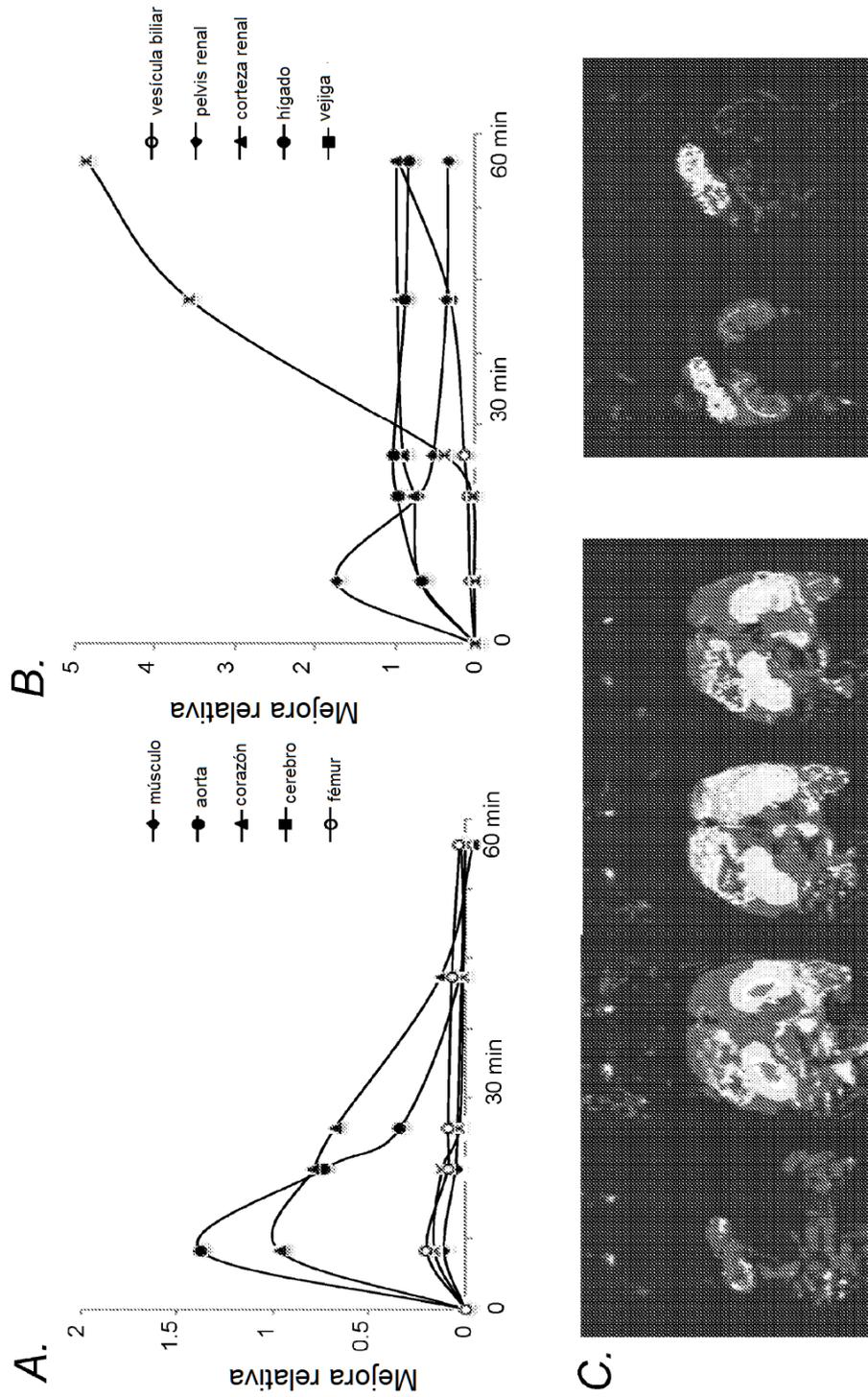


FIG. 6

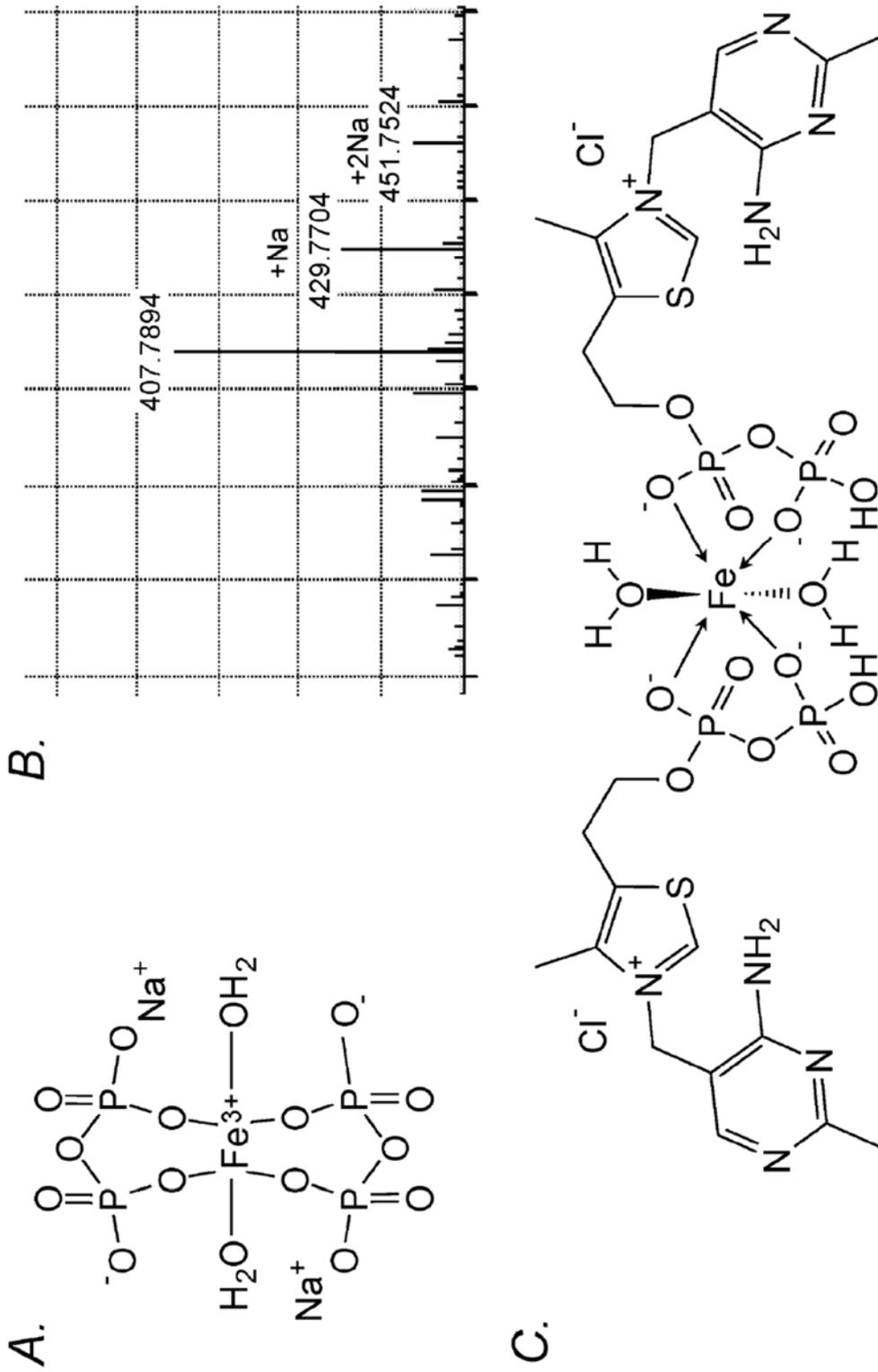


FIG. 7

D.

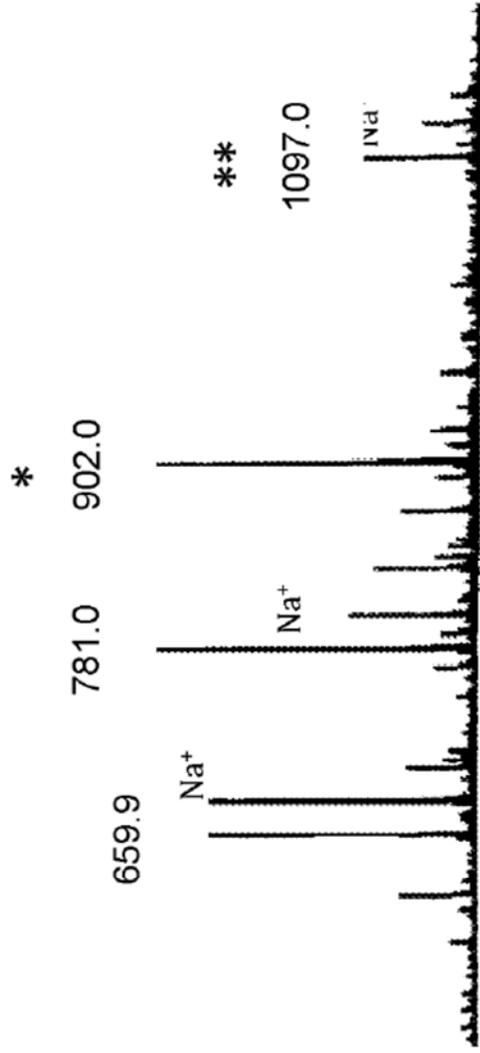


FIG. 7