



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 144 367**

② Número de solicitud: 009800801

⑤ Int. Cl.⁷: C07D 233/54

G01R 33/48

⑫

ADICION A LA PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **16.04.1998**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2000**

Fecha de concesión: **20.11.2000**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2001**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.01.2001

⑥ Número de solicitud de la patente principal:
009700496

⑦ Titular/es:
**Universidad Nacional de Educación a Distancia
Bravo Murillo, 38 - 4ª Pta.
28015 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
The University of Arizona y
The Johns Hopkins School of Medicine**

⑦ Inventor/es: **Ballesteros García, Paloma;
Gil González, Mª Soledad;
Zaderenko Partida, Paula;
Cerdán García-Esteller, Sebastián;
Alvarez Pérez, José;
Gillies, Robert J.;
Natarajan, Raghumand;
Van Sluis, Robert y
Bhujwala, Zaver**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Productos de naturaleza de imidazol y derivados.**

⑤ Resumen:
Productos de naturaleza de imidazol y derivados.
Caracterización adicional a la patente n° 9700496,
productos de naturaleza de imidazol, imidazoles sus-
tituidos, derivados de ésteres imidazol-1-yl- y deriva-
dos de ácidos imidazol-1-alcanoicos. Los imidazoles
y derivados se utilizan como indicadores extrínsecos
en la obtención de imágenes y espectros de RMN.

ES 2 144 367 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Productos de naturaleza de imidazol y derivados.

5 **Sector de la técnica**

- Medicina Física.
- Sector Farmacéutico.
- 10 · Investigación Biomédica.
- Diagnóstico por imagen.

Estado de la técnica

15 Los métodos disponibles actualmente para la determinación del pH en muestras biológicas incluyen métodos potenciométricos (electrodos de pH), técnicas radiométricas, métodos ópticos y abordajes de Resonancia Magnética (ver ref. 1 para una revisión). La utilización de una sonda molecular impermeable a la membrana, ya sea radioactiva, cromófora, fluorescente, fosforescente ó activa en MR permite a
20 cualquiera de estos métodos medir exclusivamente el pH extracelular. Sin embargo, entre la variedad de los métodos disponibles, tan sólo la MR permite la obtención de imágenes no invasivas de la totalidad del volumen tridimensional de muestras ópticamente opacas. Estas características hacen de la MR el método de elección para la determinación no invasiva del pH extracelular en especímenes biológicos. En esta patente describimos una nueva serie de moléculas indicadoras que permiten la determinación del pH
25 intracelular y el pH extracelular por métodos de MRS y MRI.

Algunos artículos sobre estos métodos son:

1. Henderson, R.M. y Graf, J. (1988) In pH Homeostasis: Mechanisms and Control (Häussinger, D. Ed.) Academic Press, pg 5-26.
- 30 2. Gil, M.S., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2,1117-1722.
3. Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P (1994) *Bioorg. Med. Chem.* 2,305-14.
- 35 4. Zaderenko, P, Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdán, S. (1994) *J. Org. Chem.* 59,6268-73.
5. Zaderenko, P., López, P., Ballesteros, P., Takumi, H. y Toda, F. (1995) *Tetrahedron: Asymmetry* 6, 381-384.
- 40 6. López, P., Zaderenko, P., Balcazar, J. L., Fonseca, I., Hernández Cano, F., Ballesteros, P. (1996) *J. Mol. Struct.* 377, 105-112.

Breve descripción de la invención

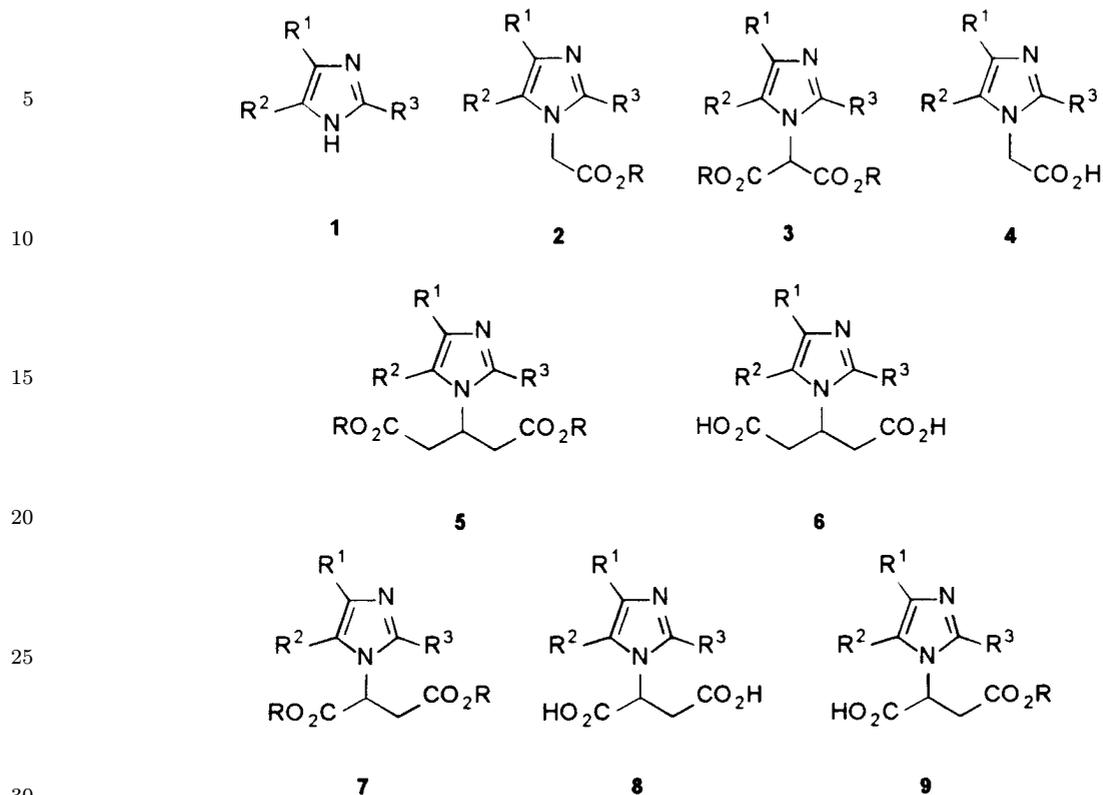
45 En esta extensión de patente se describen los imidazoles y derivados que se utilizarán como indicadores extrínsecos en la obtención de imágenes y espectros de RMN cuyo procedimiento es objeto de la patente n° P9700496.

Descripción detallada de la invención

50 El esquema 1 muestra las estructuras que se utilizarán como indicadores extrínsecos de pH.

55

60

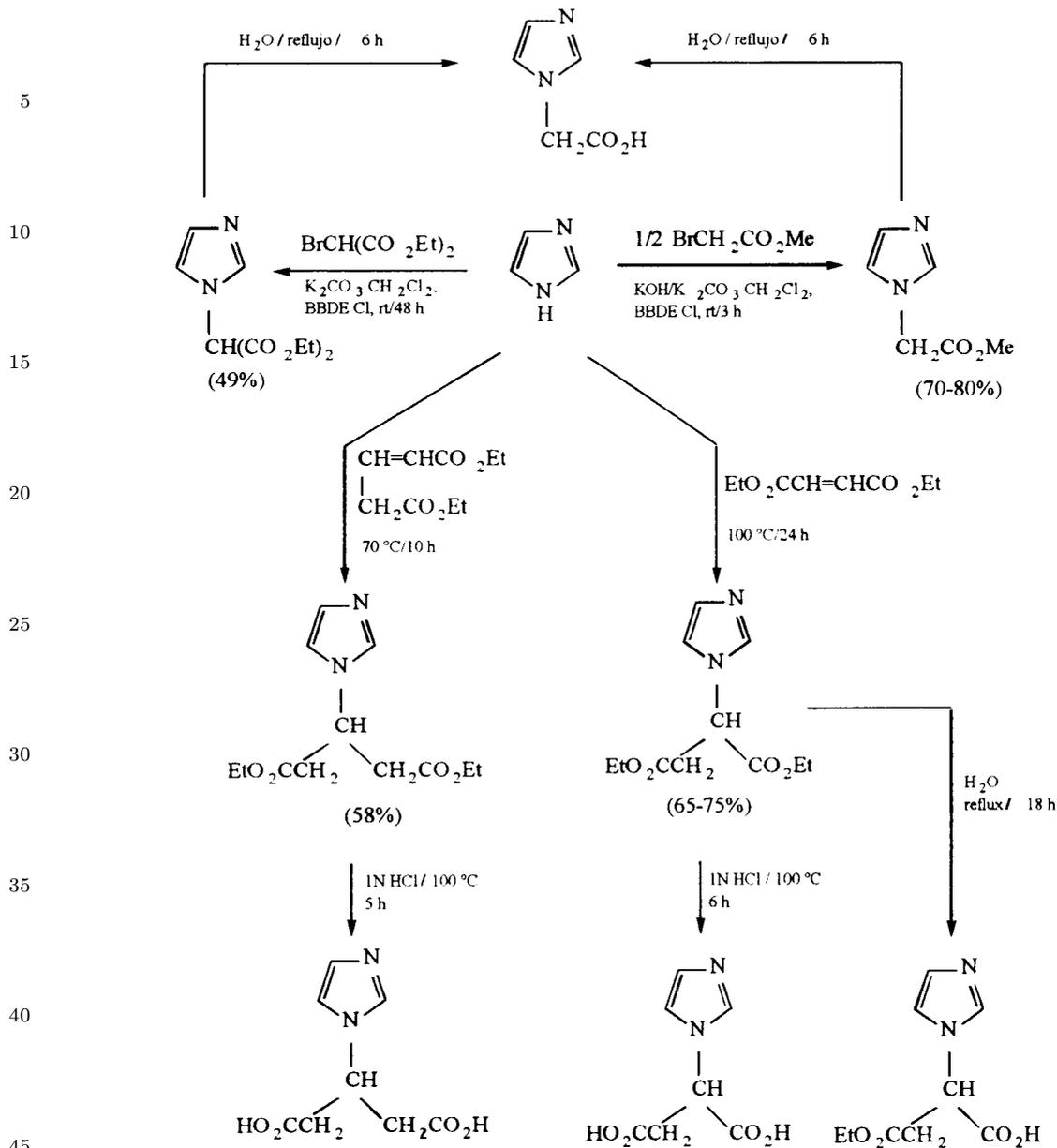


Esquema 1.

R^1 , R^2 y R^3 se refieren a hidrógeno, ^{19}F o a cualquier sustituyente alquilo libre o funcionalizado, conteniendo o no ^{19}F . R se refiere a cualquier sustituyente alquilo.

La preparación y propiedades RMN de algunas de estas moléculas se han descrito en detalle previamente (2-6). El esquema 2 presenta la síntesis de algunos imidazol-1-ilacetatos, malonatos, succinatos y glutaratos y sus correspondientes ácidos.

(Ver Esquema 2 en página siguiente)



Esquema 2.

Métodos de síntesis de ésteres y ácidos imidazol-y-lalcanoicos.

Los compuestos objeto de esta patente que no se han descrito hasta ahora, se obtienen mediante las síntesis presentadas en el esquema 2, utilizando los correspondientes imidazoles, preparados por procedimientos conocidos o puestos a punto por nosotros.

Como ejemplo ilustrativo se presentan las características de los derivados del esquema 2.

Imidazol-1-ilacetato de metilo (2, R¹=R²=R³=H; R=Me)

A una suspensión de hidróxido potásico en polvo (0,411 g, 7,35 mmol) y carbonato potásico (1 g, 7,35 mmol) en cloruro de metileno (20 mL) se adicionan, con agitación constante, imidazol (0,5 g, 7,35 mmol) y cloruro de 1,5-bis-(N-bencil-N,N-dietilamonio)diéter (BBDE Cl) (0,084 g, 0,18 mmol). A la mezcla, vigorosamente agitada, se añade bromoacetato de metilo (0,56 g, 3,67 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Se filtra y se lava el residuo con cloruro de metileno (2x200 mL) y se seca la

ES 2 144 367 B1

fase orgánica con sulfato sódico anhidro. Se elimina el cloruro de metileno en rotavapor (12 mmHg) y se purifica el residuo en columna de gel de sílice usando CH_2Cl_2 :etanol,9:1, como eluyente cromatográfico. Se obtienen 0,414 g (81 %) de producto, que se almacena en desecador sobre P_2O_5 .

5 Pf 54-55°C (recristalizado en hexano)

I.P. (KBr) $n_{\text{cm}^{-1}}$ 3100, 2980, 2950, 1720, 1600, 1210.

Análisis calculado para $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ C 51,42%; H 5,75%; N 19,99%.

10 Análisis encontrado C 51,59%; H 5,66%; N 20,19%.

^1H RMN (CDCl_3) δ 3,79 (s, 3H, CH_3), 4,75 (s, 2H, CH_2), 6,97 (sa, 1 H, H-5), 7,11 (sa, 1 H, H-4), 7,65 (sa, 1 H, H-2).

15 ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 47,3 (CH_2), 52,2 (CH), 119,6 (C-5), 128,9 (C-4), 137,5 (C-2), 167,7 (CO).

Acido imidazol-1-ilacético (4, $R^1=R^2=R^3=H$)

Imidazol-1-ilacetato de metilo (0,5 g, 3,57 mmol) o imidazol-1-ilmalonato de dietilo (0,5 g, 2,21 mmol) se disuelven en 20 mL de agua destilada y se calientan a reflujo durante 6 h. El agua se elimina en rotavapor (12 mmHg), obteniéndose un residuo higroscópico de pf 257-258°C, que se recristaliza en etanol. El rendimiento de la reacción de hidrólisis es del 100%.

Pf 267-269 (recristalizado en etanol) (descomp.).

25 ^1H RMN (D_2O) δ 4,83 (s, 2H, CH_2), 7,41 (sa, 2H, H-4, H-5), 8,55 (sa, 1 H, H-2).

^{13}C RMN ($\text{DMSO-d}_6/\text{H}_2\text{O}$) δ 52,5 (CH_2), 120,7 (C-5), 124,1 (C-4), 136,6 (C-2), 171,4 (COOH).

Imidazol-1-ilmalonato de dietilo (3, $R^1=R^2=R^3=H$; $R=Et$)

30 Método a

A una solución de carbonato potásico en polvo en cloruro de metileno (40 mL) se le añaden imidazol (1 g, 14,7 mmol), BBDE Cl (0,342 g, 0,73 mmol) y bromomalonato de dietilo (3,51 g, 14,7 mmol). Se agita vigorosamente la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se filtra. Se lavan las sales con CH_2Cl_2 (2 x 30 mL) y se seca la fase orgánica con sulfato sódico. Se elimina el disolvente a presión reducida y se purifica el residuo en columna de gel de sílice usando CH_2Cl_2 :etanol, 9:1, como eluyente cromatográfico obteniéndose 1,64 g (49%) de producto que se destila en horno de bolas.

40 Método b

A una disolución de imidazol (0,5 g, 7,37 mmol) y trietilamina seca (0,74 g, 7,37 mmol) en acetonitrilo seco (20 mL), se adiciona bromomalonato de dietilo (1,76 g, 7,35 mmol). Se agita la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se lava en agua y se extrae varias veces con cloruro de metileno. Se secan los extractos orgánicos con sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido se purifica según el método descrito en 9.10.1 obteniéndose 0,881 g (53%) de producto.

50 $\text{Pe}_{0,1}$ 165-200°C (horno de bolas).

Pf (picrato) (recristalizado en etanol) 118-119°C.

I.R. $n_{\text{cm}^{-1}}$ 3100, 1960, 1730, 1280, 1230, 1180, 1010.

55 Análisis calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{11}$ (picrato) C 42,21%; H 3,76%; N 15,38%.

Análisis encontrado C 42,3%, H 3,74%, N 15,37%.

^1H RMN (CDCl_3) δ 1,31 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, CH_3), 4,25-4,36 (m, 4H, OCH_2), 5,53 (s, 1H, CH), 7,11 (sa, 1H, H-5), 7,16 (sa, 1H, H-4), 7,72 (sa, 1H, H-2).

60 ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 13,4 (CH_3), 61,7 (CH), 62,2 (CH_2), 119,1 (C-5), 128,8 (C-4), 137,2 (C-2), 164,2 (CO).

ES 2 144 367 B1

3-Imidazol-1-ilglutarato de dietilo (5, R¹=R²=R³=H) R=Et)

Una mezcla de imidazol (0,5 mg, 7,35 mmol) y glutacolato de dietilo (1,37 g, 7,35 mmol) se calienta a 70°C durante 10 h. La mezcla de reacción se purifica en columna de gel de sílice (CH₂:Cl₂:etanol, 97:3) obteniéndose 1,1 g de producto (59 %) como un aceite amarillo, que se destila en el horno de bolas, Pe_{0,1} 150-200°C, obteniéndose el producto puro como un sólido blanco.

Pf 41-43°C.

Pf (picrato) 111°C (recristalizado en etanol).

I.R. n cm⁻¹ 3100, 1980, 1720, 1715, 1370, 1255, 1215, 1180, 1150.

Análisis calculado para C₁₈H₂₁N₅O₁₁ (picrato) C 44,73%; H 4,38%; N 14,49%.

Análisis encontrado C 44,57%; H 4,03%; N 14,42%.

¹H RMN (CDCl₃) d 1,19 (t, 6H, J = 7,1 Hz, 2 x CH₃), 2,75-2,96 (m, 4H, 2 x CH₂), 4,09 (q, 4H, J = 7,1 Hz, 2 x OCH₂), 5,01-5,12 (m, 1H, CH), 6,96 (sa, 1H, H-5), 7,04 (sa, 1H, H-4), 7,56 (sa, 1H, H-2).

¹³C RMN (CDCl₃) d 13,6 (CH₃), 39,8 (CH₂), 50,5 (CH), 60,7 (OCH₂), 116,3 (C-5), 129,2 (C-4), 136,3 (C-2), 169,1 (CO).

Acido 3-imidazol-1-ilglutárico (6, R¹=R²=R³=H)

3-Imidazol-1-ilglutarato de dietilo (0,5 g, 1,96 mmol) se disuelve en HCl 1N (20 mL) y se calienta a 100°C durante 5 h. Se elimina el agua en rotavapor, obteniéndose el hidrocloreto como un residuo muy higroscópico.

¹H RMN (D₂O) d 2,83 (d, 4H, J = 7,1 Hz, 2 x CH₂), 5,10 (q, 1 H, J = 7,1, CH), 7,46 (sa, 1H, H-4), 7,60 (sa, 1H, H-5), 8,78 (sa, 1H, H-2).

¹³C RMN (DMSO-d₆/H₂O) d 38,8 (CH₂), 54,2 (CH₂), 120,7 (C-5), 121,0 (C-4), 136,4 (C-2), 172,0 (COOH).

El hidrocloreto obtenido se pasa a través de una columna de intercambio catiónico utilizando como eluyente NH₄OH 2N, obteniéndose el ácido puro, que se recristaliza en etanol al 90 % y se seca sobre P₂O₅ a 80°C/0,1 mmHg.

Pf 181-183°C.

Análisis calculado para C₈H₁₂N₂O₄ x 1/2H₂O C 46,37%; H 5,35%; N 13,52%.

Análisis encontrado C 46,82%; H 4,85%; N 13,31 %.

¹H RMN (D₂O) d 2,91-2,99 (m, 4H, 2xCH₂), 5,15-5,23 (m, 1H, CH), 7,49 (sa, 1H, H-4), 7,66 (sa, 1H, H-5), 8,87 (sa, 1H, H-2).

¹³C RMN (D₂O) d 41,1 (CH₂), 56,1 (CH), 120,4 (C-5), 120,8 (C-4), 135,5 (C-2), 175,9 (COOH).

(±)-2-Imidazol-1-ilsuccinato de dietilo (7, R¹=R²=R³=H; R=Et)

Método a

Una mezcla de imidazol (5 g, 73,53 mmol) y fumarato de dietilo (12,65 g, 73,53 mmol) se calienta a 100°C, durante 24 h. El residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (98:2, Cl₂CH₂:etanol) obteniéndose 13,30 g (75 %) de producto. El producto se almacena en desecador sobre P₂O₅.

También se puede preparar de forma similar partiendo de maleato de dietilo (en lugar del fumarato), siendo el rendimiento en este caso del 65 %.

Método b

Imidazol (0,5 g, 7,40 mmol) y fumarato de dietilo (1,3 g, 7,40 mmol) se introducen en una bomba Parr de 23 mL con portamuestras de teflón. La mezcla de reacción se calienta en el horno microondas a

ES 2 144 367 B1

200 ó 400 W durante 3 ó 2 minutos respectivamente. Tras enfriar a temperatura ambiente, se introduce la bomba en un baño de hielo y se abre con precaución. Los crudos de reacción se analizan por ^1H RMN. Los productos se aíslan por el procedimiento descrito en el método a.

5 Pf (picrato) 95°C (recristalizado en etanol).

I.R. cm^{-1} 3100, 2960, 1720, 1370, 1260, 1220, 1170, 1075, 1020.

Análisis calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_{11}$ (picrato) C 43,50%; H 4,08%; N 14,92%.

10 Análisis encontrado C 43,47%; H 3,94%; N 14,89%.

^1H RMN (CDCl_3) δ 1,22 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH_3), 1,25 (t, 3H, J = 7,1, CH_3), 3,10 (parte AB, 2H, $J_{\text{AB}} = 16,3$, $J_{\text{AX}} = 7,7$, $J_{\text{BX}} = 6,7$ Hz, CH_2), 4,14 (q, 2H, J = 7,1 Hz, OCH_2), 4,22 (q, 2H, J = 7,2 Hz, OCH_2), 5,22 (parte X, t aparente, 1H, CH), 7,07 (sa, 1H, H-5), 7,23 (sa, 1H, H-4), 7,57 (sa, 1H, H-2).

15

^{13}C RMN (CDCl_3) δ 13,6 (CH_3), 13,7 (CH_3), 37,3 (CH_2), 55,6 (CH), 61,1 (OCH_2), 62,1 (OCH_2), 117,7 (C-5), 129,4 (C-4), 136,8 (C-2), 168,2 (CHCO), 168,9 (CH_2CO).

20 *Acido (\pm)-2-Imidazol-1-ilsuccínico (8, $R^1=R^2=R^3=H$)*

Método a

Se obtiene como producto minoritario en la reacción de hidrólisis neutra de los 2-imidazol-1-il-succinatos.

25

^{13}C RMN (D_2O) δ 36,6 (CH_2), 59,6 (CH), 118,4 (C-5), 121,6 (C-4), 134,3 (C-2), 171,8 (CHCOOH), 173,2 (CH_2COOH).

Método b (hidrocloruro)

30

Se obtiene por hidrólisis ácida del 2-imidazol-1-ilsuccinato de dietilo (0,5 g, 2,08 mmol) con HCl acuoso 1 N (20 mL) calentando a 100°C durante 6 h. El disolvente se elimina en rotavapor (12 mmHg) obteniéndose un residuo higroscópico que se trata con etanol dando un sólido blanco.

35

Pf 249-250°C (descompone).

^1H RMN (D_2O) δ 3,21 (m, 2H, CH_2), 5,35 (dd, 1 H, J = 7,2, 5,2 Hz, CH), 7,47 (sa, 1H, H-4), 7,57 (sa, 1H, H-5), 8,84 (sa, 1H, H-2).

40 *Acido (\pm)-3-(etoxicarbonil)-2-imidazol-1-ilpropiónico (9, $R^1=R^2=R^3=H$, $R=Et$)*

Método a

Se deposita 2-imidazol-1-ilsuccinato de dietilo en un recipiente abierto, situado dentro de un frasco cerrado que contiene agua en el fondo. Tras varios días (más de un mes) se trata el residuo sólido con dietil éter seco para solubilizar el diéster no hidrolizado y separarlo del monoéster que se aísla por filtración a vacío.

45

Método b

50 Una disolución 156 mM de 2-imidazol-1-ilsuccinato de dietilo en agua destilada se calienta a 100°C durante 18 h. El progreso de la hidrólisis se sigue por ^1H RMN en D_2O , cuando finaliza la reacción se elimina el agua en rotavapor y se seca a vacío el residuo higroscópico obtenido. Se purifica por recristalización en etanol para separar monoéster (83%) del diácido (11%) insoluble.

55

Pf 136-138°C (recristalizado en etanol).

^1H RMN (D_2O) δ 1,12 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH_3), 3,23 (parte AB, 2H, $J_{\text{AB}} = 17,4$, $J_{\text{AX}} = 8,7$, $J_{\text{BX}} = 5,3$ Hz, CH_2), 4,07 (q, 2H, J = 7,2 Hz, OCH_2), 5,32 (parte X, dd, 1H, J = 8,7, 5,3 Hz, CH), 7,41 (sa, 1H, H-4), 7,51 (sa, 1H, H-5), 8,79 (sa, 1H, H-2).

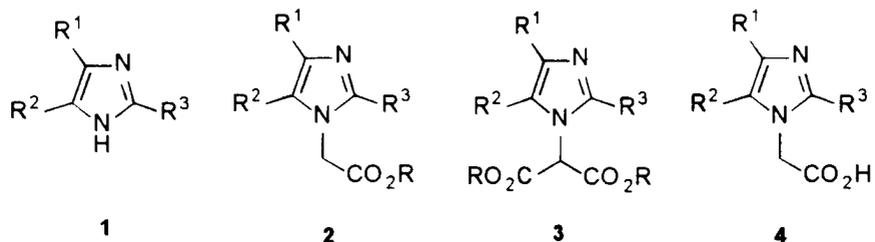
60

^{13}C RMN (D_2O) δ 12,3 (CH_3), 36,4 (CH_2), 59,5 (CH), 61,3 (OCH_2), 118,6 (C-5), 120,6 (C-4), 134,3 (C-2), 171,0 (COO), 171,4 (COOH).

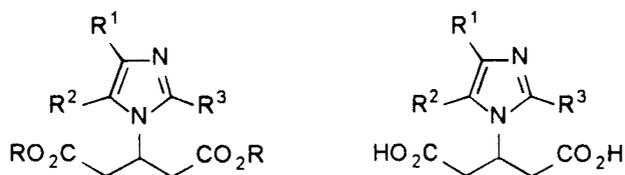
REIVINDICACIONES

1. Productos de naturaleza de imidazol y derivados con la siguiente estructura:

5

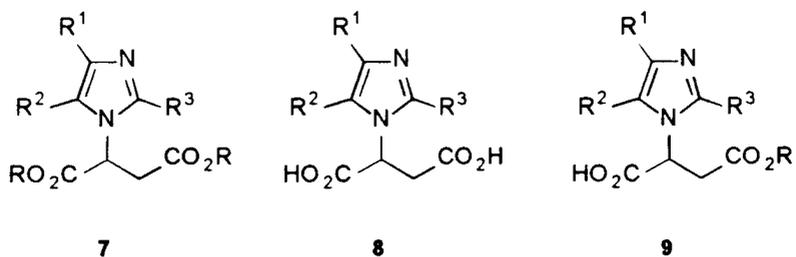


15



20

25



30

35

Donde R^1 , R^2 y R^3 se refieren a hidrógeno, ^{19}F o a cualquier sustituyente alquilo libre o funcionalizado, conteniendo o no ^{19}F .

40

R se refiere a cualquier sustituyente alquilo.

2. Aplicación de los compuestos de estructura según reivindicación 1 como indicadores extrínsecos en la obtención de imágenes y espectros de RMN.

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07D 233/54, G01R 33/48

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GIL, S. y col. IMIDAZOL-1-YLALKANOATE ESTERS AND THEIR CORRESPONDING ACIDS. A NOVEL SERIES OF EXTRINSIC 1H NMR PROBES FOR INTRACELLULAR PH. Bioorganic of Medicinal Chemistry letters, 1992, Vol. 2, N° 12, páginas 1717-1722. Todo el documento.	1-5
X	GIL, S. y col. Imidazol-1-ylalkanoic Acids as Extrinsic 1H NMR Probes for the Determination of Intracellular pH, Extracellular pH and Cell Volume. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1994, Vol. 2, N° 5, páginas 305-314. Páginas 305-306, esquemas 1,2.	1-5
X	ZADERENKO, P. y col. Synthesis and Regioselective Hydrolysis of 2-Imidazol-1-ylsuccinic Esters. J. Org. Chem., 1994, Vol. 59, N° 21, páginas 6268-6273.	1,2,5
X	LOPEZ, P. y col. The zwitterion structure of imidazol-1-ylacetic acids in the solid state and in solution. Journal of Molecular Structure, 1996, Vol. 377, páginas 105-112.	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

04.10.1999

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1