



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 253 125**

② Número de solicitud: 200502274

⑤ Int. Cl.:
C07D 257/02 (2006.01)
C07D 231/10 (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **08.11.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2006**

Fecha de la concesión: **14.06.2007**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2007**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

⑥ Número de la solicitud inicial: **200402679**

⑦ Titular/es:
**Universidad Nacional de Educación a Distancia
c/ Bravo Murillo, 38 – 4 A
28015 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Ballesteros García, Paloma y
Pérez Mayoral, Elena**

⑦ Agente: **No consta**

④ Título: **Ácidos 1-pirazoliletíl-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacéticos. Aplicación de sus complejos de gadolinio (III) en el diagnóstico clínico.**

⑤ Resumen:

Ácidos 1-pirazoliletíl-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacéticos. Aplicación de sus complejos de gadolinio (III) en el diagnóstico clínico.

Compuestos macrocíclicos de lantánidos se emplean como agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética.

Compuestos de Fórmula General A en donde R7 y/o R2 son hidrógenos, grupos metilo, grupos nitro y grupos amino. Un procedimiento para la obtención de estos compuestos partiendo de los correspondientes bromoetilpirazoles, que implica las siguientes etapas:

1) monoalquilación del cicleno; 2) alquilación del resto de grupos amino con bromoacetato de metilo en medio básico y finalmente, 3) la hidrólisis básica de los ésteres metílicos para la obtención de la sal trisódica correspondiente. Los complejos de Gd(III) y de otros lantánidos obtenidos a partir de los compuestos de Formula General A, el procedimiento de obtención de los complejos, y su utilización experimental y clínica en la fabricación de agentes de contraste para el diagnóstico clínico por Imagen de Resonancia Magnética.

ES 2 253 125 B1

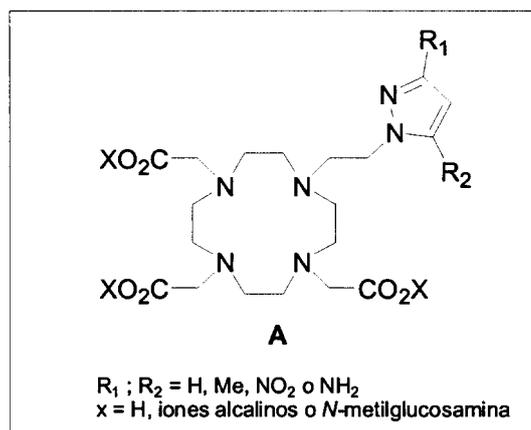
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Ácidos 1-pirazoliletil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacéticos. Aplicación de sus complejos de gadolinio (III) en el diagnóstico clínico.

5 **Campo técnico de la invención**

Se presenta la síntesis y caracterización de una serie de ligandos orgánicos con grupos pirazoliletilo de Fórmula General A, que se indica a continuación:



30 **Fórmula General**

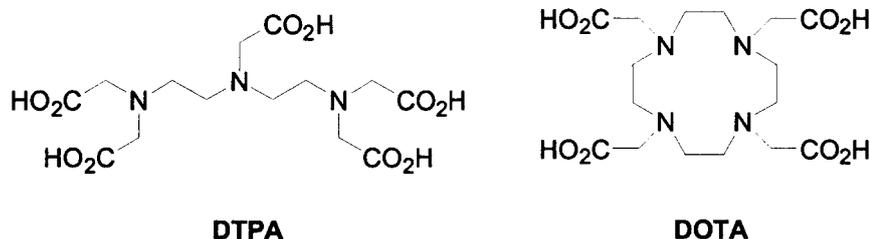
Se obtiene una nueva serie de complejos macrocíclicos de Gd(III) y otros lantánidos, que se utilizan como agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética (IRM).

35 **Estado de la técnica anterior**

La Imagen por Resonancia Magnética (IRM) es la modalidad escogida para la evaluación de la mayoría de las patologías intracraneales y espinales. El uso, cada vez más frecuente, de esta técnica (IRM) como herramienta en la investigación biomédica y en el diagnóstico clínico no-invasivo, ha promovido el desarrollo y la búsqueda de una nueva clase de fármacos llamados agentes de contraste (AC). Los AC son sustancias diseñadas para reducir considerablemente los tiempos de relajación longitudinal y transversal (T_1 y T_2) de los protones del agua en los tejidos en los que se distribuyen.

45 Los principales determinantes del contraste en una imagen de RM son los tiempos de relajación de los protones del agua, T_1 y T_2 . Así, cuando la diferencia de contraste entre regiones sanas y patológicas de un tejido es muy pequeña, debido a pequeñas variaciones en los tiempos de relajación, el uso de AC es altamente beneficioso. Así, la efectividad un AC se valora, en primer lugar, por la determinación de su relajatividad, que se define como la velocidad de relajación longitudinal o transversal de los protones del agua a concentración 1 mM de complejo paramagnético.

50 Los AC más utilizados e investigados son los complejos de lantánidos, principalmente de gadolinio, derivados de ácidos poliaminopolicarboxílicos. Hoy en día siguen siendo objeto de estudio de la mayoría de los grupos de investigación que, en el ámbito mundial, se dedican al diseño y desarrollo de nuevos AC. Los compuestos que generalmente se emplean como AC en clínica son los complejos de Gd(III) derivados de los ácidos dietilentriaminopentaacético [DTPA-Gd(III)] y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético [DOTA-Gd(III)], que contienen unidades de ácido aminoacético y ligandos macrocíclicos en su estructura, respectivamente.

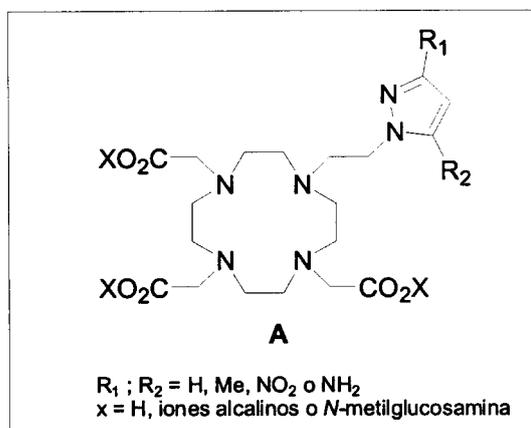


En este sentido, se describieron ejemplos de ligandos mixtos que incluyen grupos de ácido iminodiacético y anillos azólicos, capaces de formar complejos tetradentados con Gd(III) (Ballesteros García, Paloma *et al.*, Complexons with the structure of N-[2-[azol-1(2)-yl]ethyl]iminodiacetic acids, synthesis, analytical study, and biological applications. PCT Int. Appl. (1996), 43, W09641797; P. López *et al.*, N-2-(Azol-1(2)-yl)ethyliminodiacetic acids: a novel series of Gd(III) chelators as T2 relaxation agents for magnetic resonance imaging. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 517). Estos compuestos presentan mayor relajatividad que los complejos comerciales que actualmente se emplean como AC en imagen diagnóstica. Sin embargo, la capacidad complejante de estos complejos no es lo suficientemente alta como para permitir su utilización en clínica.

Más recientemente, en el año 2003, se ha descrito una nueva serie de complexonas bi y bisazólicas con propiedades tanto magnéticas como de afinidad con el centro metálico mejoradas, con respecto a los complejos de Gd(III) anteriormente comentados, pero no suficiente como para que estos complejos puedan ser AC viables en el diagnóstico clínico (P. Ballesteros and S. Cerdán, Nuevos Ligandos de Gd(III) con estructuras bi- y bis-azólicas. PCT Int. Appl., WO 0259097, 2002; E. Pérez Mayoral *et al.* A novel series of complexones with bis- or biazole structure as mixed ligands of paramagnetic contrast agents for MRI. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 5555). Estos resultados también se hacen extensivos a una nueva familia de complejos de Gd(III) derivados de bispirazoles, descrita muy recientemente, en la que los centros heterocíclicos están conectados mediante unidades de etilenglicol y tioetilenglicol (Pérez-Mayoral, E. *et al.* Synthesis of a new family of ligands with bispyrazole structure. reactivity of bispyrazolymethyl ethers. *Heterocycles*, **2005**, 65, 1691). Las propiedades magnéticas de estos complejos suponen un gran avance, con respecto a los complejos comerciales, en términos de eficacia como agentes de contraste. Sin embargo presentan una baja constante de afinidad con el Gd(III), lo que hace que no puedan emplearse con fines diagnósticos debido a su toxicidad. En principio, esta mejora de las propiedades de relajación podría deberse, además de a un número de hidratación alto, a la incorporación de azotes en la estructura de estos ligandos. Por esta razón, en esta invención se presenta una serie de nuevos ligandos orgánicos y sus complejos de Gd(III) que tienen una mayor constante de estabilidad con el ión metálico y por lo tanto una menor toxicidad.

Descripción detallada de la invención

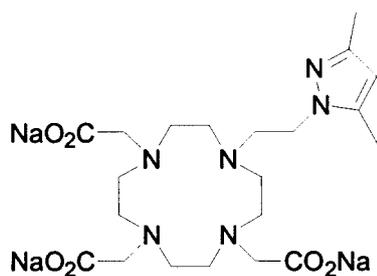
Esta invención presenta una nueva familia de ligandos macrocíclicos con estructura de ácidos 1-pirazoliletil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacéticos (A) y su síntesis, con la Fórmula General que se indica a continuación:



Fórmula General

Se presenta un estudio de Resonancia Magnética (RM) detallado que permite establecer la participación del azol en la complejación con el centro metálico.

En esta Memoria se describe, como ejemplo, la síntesis del ligando 1 (figura 1) y el estudio de las propiedades magnéticas del correspondiente complejo de Gd(III).

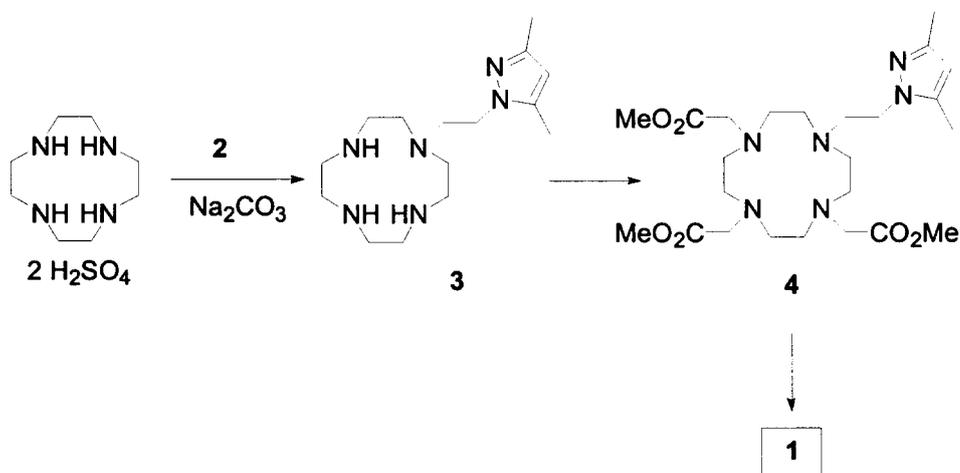


1

Figura 1

El compuesto 1 obtenido en forma de su sal sódica se ha sintetizado mediante el siguiente esquema de reacciones (esquema 1).

Esquema 1



La primera etapa de síntesis consiste en la alquilación del cicleno:2 H₂SO₄ con el 2-bromoetil-3,5-dimetilpirazol (2) conduciendo al compuesto 3, que seguido de alquilación con bromoacetato de metilo da lugar a 4. Por último, la hidrólisis básica de 4 conduce al compuesto 1.

El complejo de gadolinio se sintetiza por reacción entre cantidades equimoleculares de GdCl₃·6H₂O y el ligando orgánico 1 en disolución acuosa a temperatura ambiente.

Síntesis del compuesto 1

Sal trisódica del ácido {7-[2-(3,5-dimetilpirazol-1-il)etil]-4,10-bis-metoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il} acético (1)

Una mezcla de cicleno:2 H₂SO₄ (460 mg; 2.67 mmol), 2 (542 mg; 2.67 mmol) y Na₂CO₃ (1.42 g; 13.35 mmol) en CHCl₃ (50 mL) se calienta a reflujo durante 16 h. Se deja enfriar, se filtra el sólido blanco formado y se evapora el disolvente a presión reducida. Seguidamente, el residuo 3 obtenido junto con bromoacetato de metilo (1.37 g; 8.98 mmol) y Na₂CO₃ (952 mg; 8.98 mmol) en acetonitrilo (20 mL) se calienta a reflujo durante 15 h. Se deja enfriar, se filtra el sólido blanco formado y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ / EtOH, 95:5) obteniéndose 4 como un aceite amarillo (752 mg, 55%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ5.79 (1 H, s, H₄), 4.03 (2 H, t aparente, *J* = 7.0, 6.5 Hz, CH₂-N(azol)), 3.66 (9 H, s, OCH₃), 3.30 (8 H, s, N-CH₂CO₂Me), 2.75 (2 H, s ancho, CH₂-N), 2.74-2.18 (16 H, m, N-CH₂-CH₂-N), 2.21 (3 H, s, CH₃), 2.10 (3 H, s, CH₃) ppm. Finalmente, se lleva a cabo la hidrólisis básica de 4 por reacción con tres equivalentes de NaOH en agua (MQ; 0.6%) para obtener el compuesto 1; IR (ATR): ν 1578, 1435, 1285 cm⁻¹; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ5.88 (1 H, s, H₄), 4.05 (2 H, t aparente, *J* = 7.6, 7.2 Hz, CH₂-N(azol)), 3.11-2.97 (6 H, m, N-CH₂), 2.80 (2 H, t aparente, *J* = 7.6, 7.2 Hz, CH₂-N), 2.65-2.34 (10 H, m, CH₂-N), 2.22 (3 H, s, CH₃), 2.12 (3 H, s, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ181.5, 166.5, 149.9, 142.8, 106.8, 60.4, 54.2, 53.0-21.2, 45.9, 13.8, 11.8 ppm.

Complejo de Gd(III) del ligando 1: Una disolución de 1 equivalente de 1 y un equivalente de GdCl₃·6H₂O en 5 mL de agua (MQ) a pH ~ 5-7 se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, la

ES 2 253 125 B1

disolución final se lleva hasta pH = 8 y se filtra el hidróxido de gadolinio formado. El disolvente se elimina a presión reducida.

Estudio de Resonancia Magnética: relajatividad

Los estudios de Resonancia Magnética que se presentan en esta invención se han realizado en un espectrómetro de 60 MHz (1.5 T). Los tiempos de relajación longitudinal y transversal se han medido a una concentración de 1 mM del ligando orgánico o del correspondiente complejo de Gd(III), 150 mM de NaCl (fuerza iónica) y 100 mM de TRIS/HCl utilizando agua (MQ) como disolvente, a distintas temperaturas y pH.

La relajatividad se ha calculado según la ecuación que se representa a continuación:

$$r_{1(2)} = \Delta[1/T_{1(2)}]/[LGd]$$

en donde, $r_{1(2)}$ es la relajatividad longitudinal (transversal), $\Delta [1/T_{1(2)}]$ es la diferencia entre el inverso de los tiempos de relajación longitudinal (transversal) del correspondiente complejo de Gd(III) y del ligando y, $[LGd]$ es la concentración del complejo de Gd(III) empleada (igual a la concentración del ligando).

En la Tabla 1 se recogen los valores de $T_{1(2)}$ y $r_{1(2)}$ del complejo sintetizado 1-Gd(III) a T 25°C y pH ~7.

Complejo	T_1 (s)	T_2 (s)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
1-Gd(III)	0.46	0.39	1.90 ± 0.01	2.00 ± 0.01
DOTA-Gd	0.43	0.35	2.00 ± 0.01	2.31 ± 0.03

T_1 : secuencia de inversión-recuperación. T_2 secuencia de Carr-Purcell-Maiboom-Gill, ambos en un Espectrómetro de 60 MHz (1.5 Tesla).

Como puede observarse en la tabla 1, 1-Gd(III) presenta unos valores de relajatividad del mismo orden de magnitud que los obtenidos en el caso de DOTA-Gd, tomado como complejo de referencia.

En la presente invención se incluyen las gráficas que representan la dependencia de $r_{1(2)}$ con la temperatura y el pH.

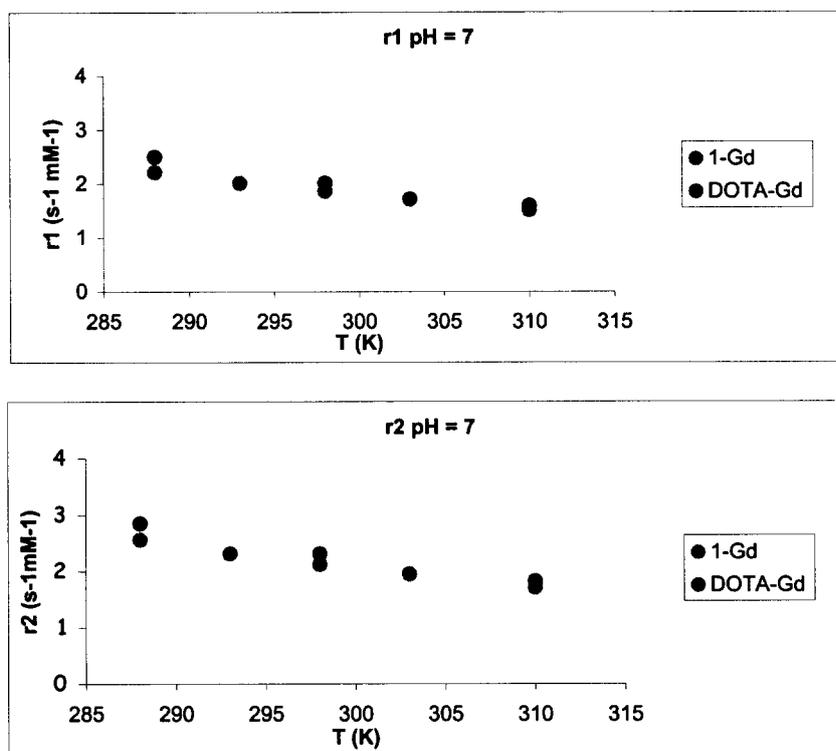


Figura 2. Variación de la relajatividad con la temperatura. Disoluciones 1 mM del ligando (complejo), 150 mM NaCl y 100 mM de TRIS /HCl.

ES 2 253 125 B1

En la figura 2 se representa la variación tanto de r_1 como r_2 con la temperatura medida a un pH de aproximadamente 7. Se observa que la relajatividad aumenta a medida que baja la temperatura, siendo este comportamiento típico de complejos derivados de ácidos poliaminopolicarboxílicos con una molécula de agua en su primera esfera de coordinación. Según la Teoría de la relajatividad y según las ecuaciones de Solomon-Bloembergen y Morgan puede ocurrir que: a) el tiempo de relajación de los protones del agua de la primera esfera de coordinación ($T_{1(2)M}$) sea menor que el tiempo de residencia de 5 la molécula del agua (τ_M) con lo que la relajatividad disminuye al bajar la temperatura, o por el contrario, b) que $T_{1(2)M}$ sea mayor que τ_M aumentando la relajatividad al disminuir la temperatura. Este último caso es el que justifica el aumento de $r_1(2)$ a bajas temperaturas en los complejos que se presentan en esta invención.

Ecuaciones de Solomon-Bloembergen y Morgan :

$$r_1(2) = q/55.5(T_{1(2)M} + \tau_M)$$

$$1/T_{1(2)M} = k/r^6 f(\tau_c)$$

en donde, q es el número de hidratación del complejo, $T_{1(2)M}$ es el tiempo de relajación longitudinal (transversal) de la molécula de agua directamente unida al metal, τ_M es el tiempo de residencia del agua en la primera esfera de coordinación con el metal, K es una constante, r es la distancia entre los protones del agua y el metal y por último, τ_c es el tiempo de correlación efectivo.

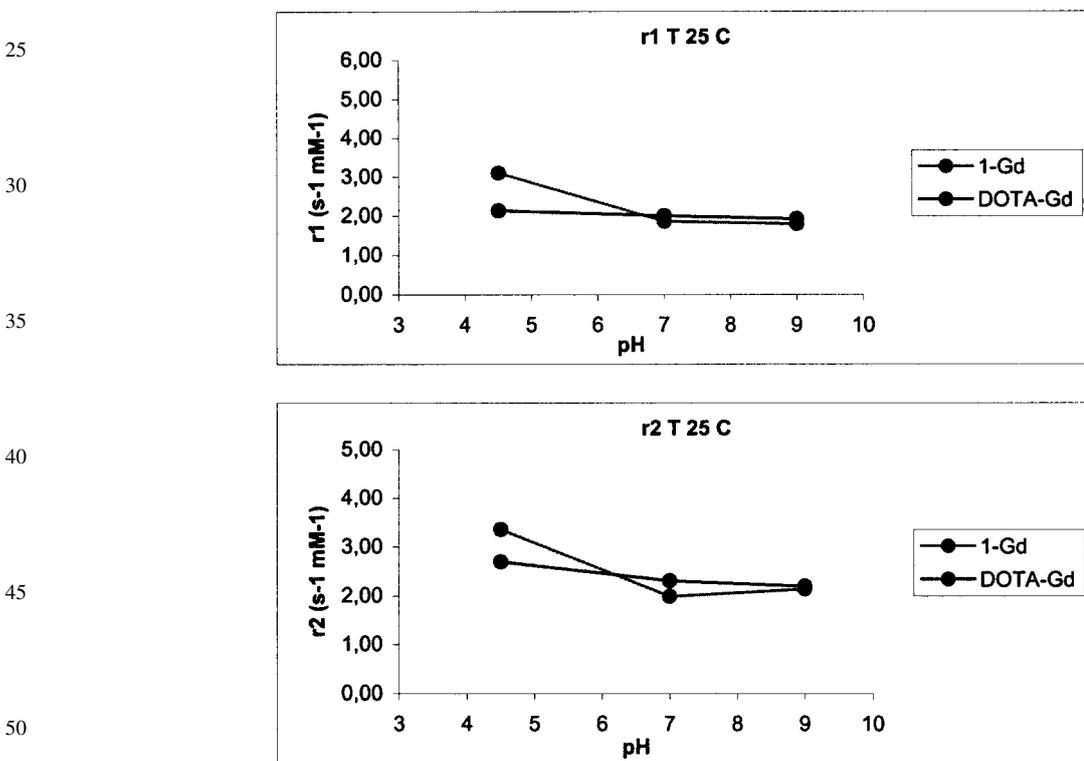


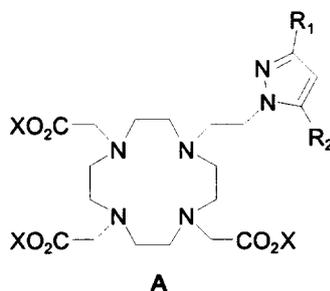
Figura 3. Variación de la relajatividad con el pH. Disoluciones 1 mM del ligando (complejo), 150 mM NaCl y 100 mM de TRIS /HCl.

La figura 3 muestra la variación de $r_1(2)$ con el pH y se observa que, mientras que la relajatividad DOTA-Gd(III) se mantiene constante en un rango de pH de 9 a aproximadamente 4.5, la relajatividad del complejo que se presenta como ejemplo en esta invención es dependiente del pH. En el caso de $1-Gd(III)$, $r_1(2)$ aumenta a pHs ácidos mientras que se mantiene constante a pHs básicos.

Teniendo en cuenta el estudio de resonancia magnética anteriormente detallado, el complejo $1-Gd(III)$ de la invención cumple los requisitos para que se utilice como agente de contraste en imagen diagnóstica. $1-Gd(III)$ presenta una eficacia igual que $DOTA-Gd(III)$ a pH 7 (complejo comercial actualmente utilizado en el diagnóstico clínico). Sin embargo, $1-Gd(III)$ presenta mayor relajatividad (r_1 y r_2) a medida que el pH disminuye (figura 3), lo que se traduce en una mayor eficacia de $1-Gd(III)$, a pHs ácidos, con respecto al $DOTA-Gd(III)$. Este incremento de la relajatividad en el complejo, es debido a la aceleración, catalizada a pH ácido, de la molécula de agua situada en la primera esfera de coordinación con el ión Gd(III).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula General A,



Donde los radicales R_1 y R_2 son hidrógenos, grupos metilo, grupos nitro y grupos amino y, X es hidrógeno, iones alcalinos o N-metilglucosamina, y cuyos complejos de Gd(III) y otros lantánidos se emplean como agentes de contraste para Imagen por Resonancia Magnética (IRM).

2. El compuesto de la reivindicación 1 en donde los radicales R_1 y R_2 son grupos metilo.

3. Un procedimiento para la obtención de los compuestos de Fórmula General A de la reivindicación 1, en el que se parte de los correspondientes bromoetilpirazoles, sintetizados previamente, y que implica las etapas que se indican a continuación: 1) monoalquilación del cicleno; 2) alquilación del resto de grupos amino con bromoacetato de metilo en medio básico y finalmente, 4) la hidrólisis básica de los ésteres metílicos para la obtención de la sal trisódica correspondiente.

4. Los complejos de Gd(III) de los compuestos de la reivindicación 1 en donde los radicales R_1 y R_2 son hidrógenos, grupos metilo, grupos nitro y grupos amino.

5. El complejo de Gd(III) del compuesto de la reivindicación 2 en donde los radicales R_1 y R_2 son grupos metilo.

6. La síntesis de los complejos paramagnéticos de Gd(III), y otros lantánidos, de los ligandos de la reivindicación 1 y 2 mediante una única etapa sintética, que consiste en hacer reaccionar cantidades equimoleculares del ligando orgánico y el cloruro del lantánido correspondiente en agua desionizada (MQ) a temperatura ambiente.

7. El uso de los compuestos de las reivindicaciones 1 y 2 en la fabricación de agentes de contraste para Resonancia Magnética en el diagnóstico clínico.

8. El uso de los complejos de las reivindicaciones 4 y 5 en la fabricación de agentes de contraste para Resonancia Magnética en el diagnóstico clínico.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 253 125

② Nº de solicitud: 200502274

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2094101 A1 (UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A DISTANCIA) 01.01.1997, todo el documento.	1-8
A	PEREZ MAYORAL, E. A novel series of complexones with bis or biazole structure as mixed ligands of paramagnetic contrast for MRI. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 1 Diciembre 2003, Vol. 11, Nº 24, páginas 5555-5567. Todo el documento.	1-8
A	WO 8602352 A1 (UNIVERSITY OF TEXAS) 24.04.1986, reivindicación 3.	1-8
A	EP 481420 A1 (NIHON MEDI-PHYSICS CO.) 22.04.1992, reivindicaciones.	1-8

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 nº:

Fecha de realización del informe

02.02.2006

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 257/02 (2006.01)

C07D 231/10 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)