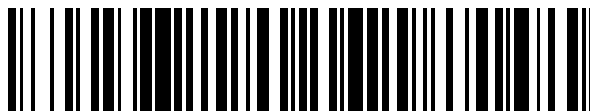


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 316**

21 Número de solicitud: 201831074

51 Int. Cl.:

C07F 15/04 (2006.01)

C07D 487/08 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.11.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.05.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA (100.0%)
OTRI-Edificio de Servizos Centrais de
Investigación Campus de Elviña
15071 A CORUÑA ES**

72 Inventor/es:

**PLATAS IGLESIAS, Carlos ;
ESTEBAN GÓMEZ, David y
PUJALES PARADELA, Rosa**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

54 Título: **LIGANDOS TETRAAZAMACROCÍCLICOS Y LOS CORRESPONDIENTES COMPLEJOS DE NÍQUEL ÚTILES COMO AGENTES DE CONTRASTE**

57 Resumen:

Ligandos tetraazamacrocíclicos y los correspondientes complejos de níquel útiles como agentes de contraste. Ligandos azamacrocíclicos que tienen nitrógenos no adyacentes conectados con cadenas etilénicas y que están reforzados con un puente de etileno/propileno que cruza la estructura y que contienen grupos amida con anillos aromáticos sustituidos con grupos CF₃ o F colgando del macrociclo, los correspondientes complejos de níquel de dichos ligandos, y composiciones que los comprenden. Los complejos presentan las propiedades adecuadas para generar contraste mediante el mecanismo CEST y del núcleo ¹⁹F por lo que son especialmente útiles como agentes de contraste en IRM para propósitos de diagnóstico.

ES 2 759 316 A1

DESCRIPCIÓN

5 Ligandos tetraazamacrocíclicos y los correspondientes complejos de níquel útiles como agentes de contraste

10 La presente invención está relacionada con complejos de un metal de transición (Ni) y un ligando tetraazamacrocíclico, composiciones que los contienen, sus procedimientos de preparación, así como la utilización de los mismos como agentes de contraste para diagnóstico por imagen.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La imagen por resonancia magnética (IRM) es una técnica no invasiva para la adquisición de imágenes que utiliza el fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN). Es usada principalmente en medicina clínica para examinar casi todo tipo de órganos y tejidos, y se considera una de las técnicas de imagen más valiosas para propósitos de diagnóstico. El contraste de la imagen obtenida en la IRM es una proyección de intensidad en tres dimensiones de la señal de RMN de ciertos núcleos atómicos, en particular, los protones de las moléculas de agua presentes en un volumen determinado de tejido. Depende esencialmente de las diferencias de intensidad de las señales de protón del agua en los diferentes tejidos y de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) o transversal (T_2) de dichos protones. Cuanto mayores sean las diferencias de densidad de protones y del tiempo de relajación de los núcleos que están presentes en los tejidos examinados, mayor será el contraste en la imagen que se obtiene.

30 La función de los agentes de contraste es acentuar las intensidades obtenidas y mejorar su especificidad. Generalmente, los agentes de contraste que se utilizan en IRM son pequeños complejos metálicos, pudiendo tratarse de una entidad macrocíclica que alberga en el interior de su cavidad el metal, o bien quelatos lineales. Los metales empleados para esta aplicación deben presentar carácter paramagnético, superparamagnético o ferromagnético.

La mayoría de los agentes de contraste utilizados en clínica son complejos del ion metálico paramagnético Gd^{3+} capaces de reducir el tiempo de relajación longitudinal (T_1). El primer agente de contraste aprobado para su uso *in vivo* fue el complejo de Gd^{3+} gadopentetato de meglumina $(NMG)_2[Gd(dtpa)(H_2O)]$ (Magnevist $\text{\textcircled{R}}$).
5 Posteriormente fueron aprobados otros complejos como el gadoterato de meglumina $(NMG)[Gd(dota)(H_2O)]$ (Dotarem $\text{\textcircled{R}}$) y otros derivados de los ligandos $dtpa^{5-}$ y $dota^{4-}$. Sin embargo, los agentes de contraste basados en gadolinio presentan algunas limitaciones dado que se ha establecido una conexión entre el uso de agentes de contraste de gadolinio en pacientes con daño renal y la fibrosis sistémica nefrogénica
10 (FSN).

Se han explorado diferentes alternativas al Gd^{3+} con objeto de obtener agentes de contraste menos tóxicos. A diferencia del ion Gd^{3+} , metales de transición tales como el manganeso, el hierro y el cobalto pueden existir de forma estable en estados de oxidación diferentes. Así, es conocido el empleo de agentes de contraste que utilizan
15 la pareja de estados de oxidación Mn^{2+}/Mn^{3+} para originar un cambio en la capacidad de relajación en función del potencial redox. A modo de ejemplo, Silvio Aime et al describieron agentes de contraste basados en la pareja redox manganeso (II/III) (cf. S. Aime et al., *p(O₂)-Responsive MRI Contrast Agent Based on the Redox Switch of Manganese (II/III)-Porphyrin Complexes*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, vol. 39, pp.747-
20 750).

También son conocidos complejos paramagnéticos de los iones divalentes de Co^{2+} y Ni^{2+} con sistemas tetraazamacrocíclicos provistos de grupos acetamida colgando de su estructura. Estos complejos presentan interés por su aplicación como agentes de
25 contraste tipo CEST 1H (Transferencia de Saturación por intercambio químico, en inglés: "Chemical Exchange Saturation Transfer") debido a la presencia de protones susceptibles de sufrir fenómenos de intercambio con las moléculas de agua del disolvente. Estos complejos permiten activar/desactivar el contraste (cf. S. J Dorazio et al., "CoCEST: cobalt(II) amide-appended paraCEST MRI contrast agents" *Chem. Commun.*, 2013, vol. 49, pp. 10025-10027; and A.O. Olatunde et al., " The NiCEST Approach: Nickel (II) Para CEST MRI Contrast Agents", *J. Am.Chem. Soc.* 2012, vol.
30 134, pp.18503-18505).

También se han usado sondas basadas en ^{19}F que representan la mejor alternativa al ^1H dado la alta sensibilidad del núcleo ^{19}F (83% con respecto a ^1H). Estas sondas tienen la ventaja de que la concentración de flúor *in vivo* es despreciable, lo cual elimina cualquier señal de fondo y permite una cuantificación más fácil de la señal de IRM. Sin embargo, el ^{19}F presenta tiempos de relajación bastante largos, por lo que se han utilizado iones de metales paramagnéticos para acelerar los tiempos de relajación.

Recientemente se han reportado algunos ejemplos de complejos duales $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ basados en iones lantánidos Ln^{3+} . La combinación de la respuesta CEST ^1H y ^{19}F en un único agente de contraste permite combinar las ventajas de dos modalidades de agentes de contraste (cf. N. Cakic et al., "Paramagnetic lanthanide chelates for multicontrast MRI", *Chem Comm* 2016, vol. 52, pp. 9224-9227). Sin embargo, las sondas basadas en Ln^{3+} tienen el inconveniente de la potencial toxicidad de las mismas.

15

Por tanto, todavía existe la necesidad de encontrar agentes de contraste para la obtención de imágenes de tejidos y órganos individuales y sus respectivos cambios anatómicamente patológicos y funcionales, que tengan una alta sensibilidad, y que permitan reducir los tiempos de adquisición de las imágenes de resonancia magnética, así como que tengan una alta estabilidad para eliminar la toxicidad asociada a la liberación del ion metálico.

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los presentes inventores han encontrado unos complejos de níquel con ciertos ligandos que presentan una complejación muy estable del ion metálico, lo que significa que exhiben un alto nivel de selectividad para los iones paramagnéticos relevantes en oposición a los iones fisiológicos. Asimismo, estos compuestos presentan las propiedades adecuadas para generar contraste mediante el mecanismo CEST ^1H y del núcleo ^{19}F , lo que permite mejorar la sensibilidad y calidad de la imagen, produciendo imágenes más brillantes y obtener información relevante en un período corto de tiempo. Debido a que se genera contraste mediante el mecanismo CEST es posible activar/desactivar el contraste aplicando un pulso de radiofrecuencia. Además la ausencia de señal endógena de ^{19}F permite además obtener imágenes carentes de

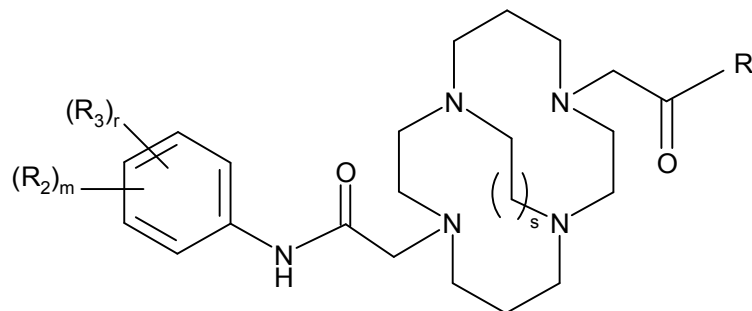
30

ruido de fondo, así como la cuantificación de la concentración del agente. Estas propiedades hacen que los complejos de la presente invención sean especialmente útiles como agentes de contraste en IRM para propósitos de diagnóstico.

- 5 Los ligandos de dichos complejos duales se caracterizan porque son azamacrocíclo que tienen nitrógenos no adyacentes conectados mediante cadenas etilénicas y que están reforzados con un puente de etileno/propileno que cruza la estructura. Además contienen grupos amida con anillos aromáticos sustituidos con grupos CF_3 / F colgando del macrociclo.

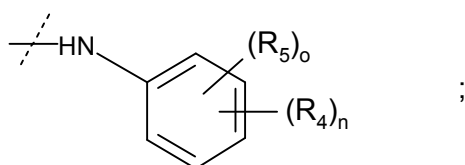
10

Así, un primer aspecto de la presente invención está relacionado con un compuesto/ligando de fórmula (L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



(L)

- 15 donde: R₁ se selecciona del grupo que consiste en: -OH,; -HN-CH₂-COOH, -HN-alquilo (C₁-C₆), -HN-NH-alquilo (C₁-C₆), y



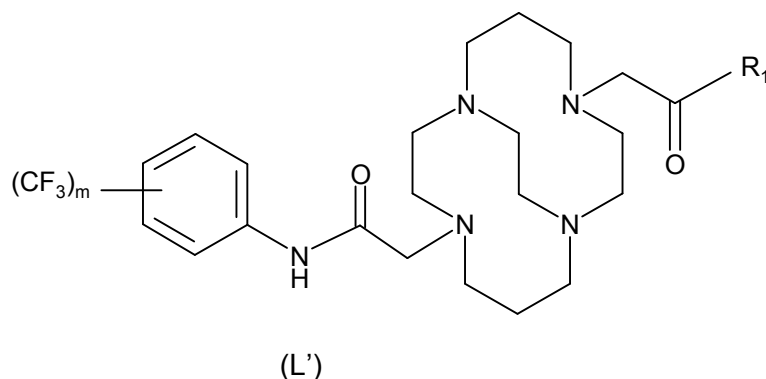
20

- R₂ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en F y CF₃; R₃ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: H, (C₁-C₄)-alquilo; (C₁-C₄)-alcoxilo, y un halógeno seleccionado entre Cl, Br e I; m es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3; r es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4; la suma de m y r es 5; n es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3; o es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4; la suma de n y o es 5; s es un entero seleccionado entre 1 y 2; con la condición de que cuando R₂ es F, m es 2 o 3 y r es 2 o 3, y cuando R₄ es F, n es 2 o 3 y o es 2 o 3.

En una realización particular, R_2 es CF_3 . En otra realización particular, R_2 es CF_3 y m es 2. En otra realización particular, los dos grupos CF_3 están en posición meta en el anillo bencénico. En otra realización particular, R_2 es CF_3 y m es 1. En otra realización particular, el grupo CF_3 está en posición para en el anillo bencénico.

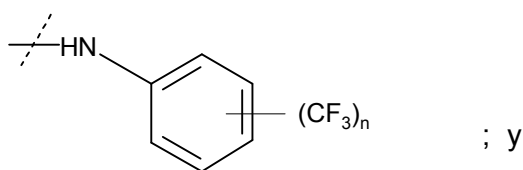
5

En otra realización particular, el compuesto/ligando de fórmula (L) tiene la fórmula (L')



donde: R_1 se selecciona del grupo que consiste en: $-OH$; $-HN-CH_2-COOH$; y

10



15 m y n son un entero independientemente seleccionado entre 1 y 2. El ligando L' es una realización particular del ligando L donde entre otras limitaciones R_2 y R_4 son CF_3 y R_3 y R_5 son H .

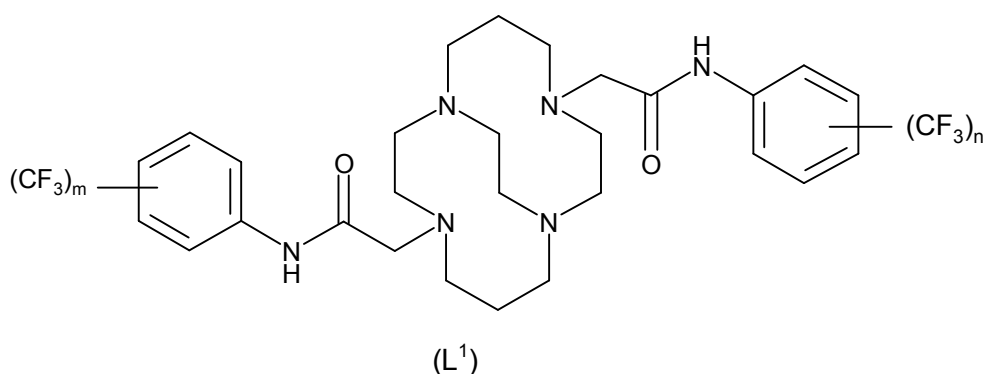
20 Por el término "sales farmacéuticamente aceptables" en los compuestos L y L' de la presente invención se entiende aquellas sales que según criterio médico son adecuadas para poner en contacto con tejidos u órganos del cuerpo humano y animal sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica no deseada y que sea proporcionada a la relación beneficio/riesgo. Las sales pueden ser preparadas in situ o durante el aislamiento y/ o purificación de los compuestos de la presente invención o

25 en una etapa separada.

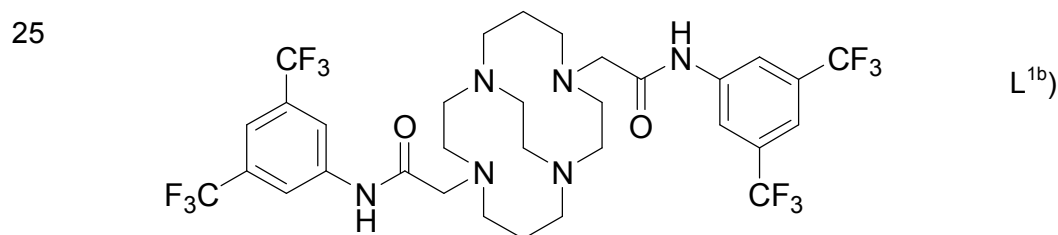
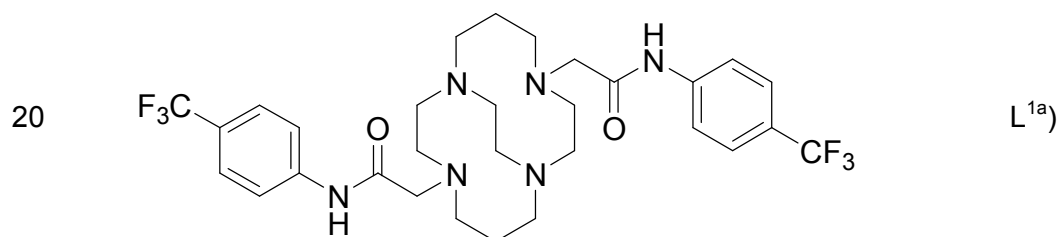
Generalmente, los ligandos de la presente invención forman sales con ácidos dado que el ligando es básico y los protones del ciclo se protonan con mucha facilidad dando lugar a sales de amonio. Ejemplos de ácidos apropiados para la formación de

sales con estos ligandos son el ácido fórmico y el ácido trifluoroacético. Estos ligandos también pueden formar sales con bases apropiadas, en el caso en el que R_1 se selecciona entre OH y $-HN-CH_2-COOH$. Ejemplos de bases apropiadas, son aminas primarias, secundarias, terciarias, aminoácidos básicos, en particular, etanolamina, dietanolamina, morfolina, lisina o arginina, así como hidróxidos, carbonatos, o bicarbonatos de sodio, potasio o magnesio.

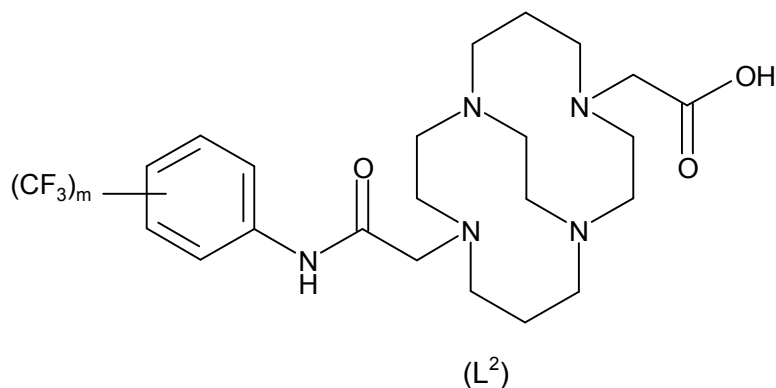
En una realización particular, los compuestos de fórmula (L') tienen la fórmula (L¹) donde m y n son un entero independientemente seleccionado entre 1 y 2:



En otra realización particular, los compuestos de fórmula (L¹) se seleccionan del grupo que consiste en 1,8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo [6.6.2]hexadecano (L^{1a}) y 1,8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1b}).



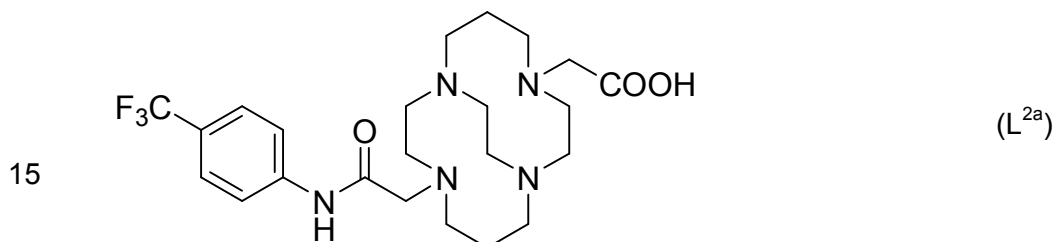
En otra realización particular, los compuestos de fórmula (L') tienen la fórmula (L²) donde m es un entero entre 1 y 2.



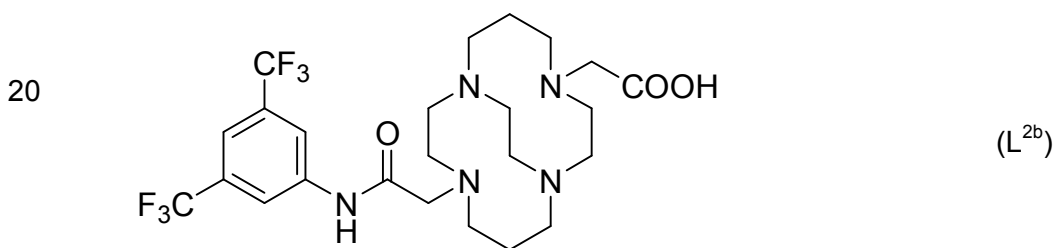
5

En otra realización particular, los compuestos de fórmula (L²) se seleccionan del grupo que consiste en: ácido 2-(11-(2-oxo-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acético (L^{2a}) y ácido 2-(11-(2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)

10 acético (L^{2b}) que tienen las siguientes fórmulas:



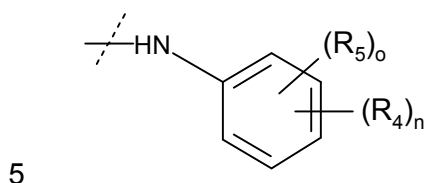
15



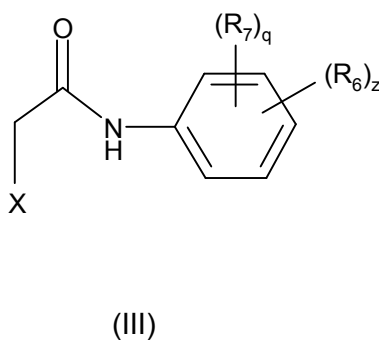
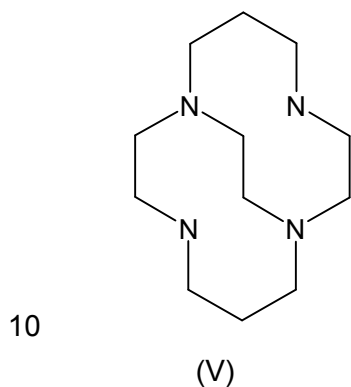
20

25 Los ligandos de fórmula L son solubles en agua, en particular los compuestos de fórmula L² son especialmente ventajosos por su alta solubilidad en agua.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con procedimientos para la preparación de los compuestos de fórmula (L). Un primer procedimiento para preparar compuestos de fórmula L donde R_1 es



donde R_4 , R_5 , n y o son como se han definido anteriormente, comprende someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de alquilación con un compuesto de fórmula (III),



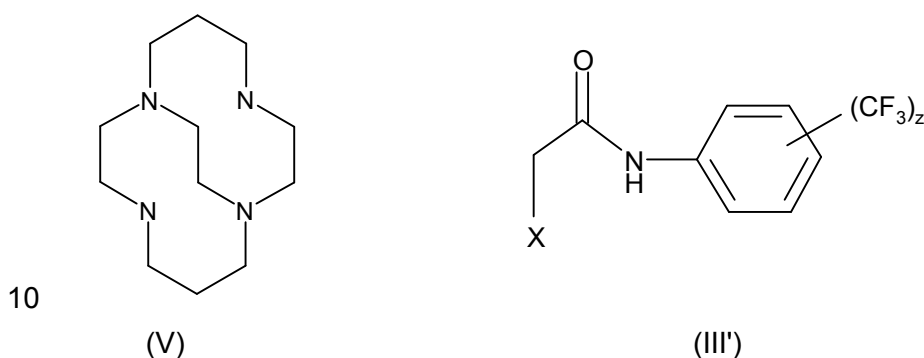
donde: X es un halógeno; R_6 se selecciona del grupo que consiste en F y CF_3 ; R_7 se selecciona del grupo que consiste en: H, (C_1-C_4) -alquilo; (C_1-C_4) -alcoxilo y un halógeno
 15 seleccionado entre Cl, Br e I; z es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3; q es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4; donde la suma de z y q es 5, con la condición de que cuando R_6 es F, z es 2 o 3 y q es 2 o 3.

En una realización particular, X es Br. En otra realización particular la alquilación del
 20 compuesto (V) se lleva a cabo en acetonitrilo en presencia de una base tal como carbonato de un metal alcalino, En otra realización particular la base es carbonato potásico. En otra realización particular, z es 1. En otra realización particular, z es 2.

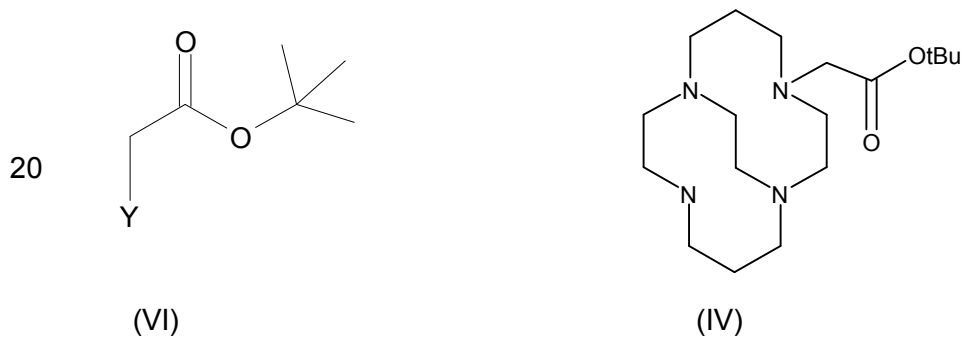
La reacción de alquilación también puede llevarse a cabo con otros solventes tales
 25 como tolueno o dimetilformamida y con otras bases tales como carbonato sódico,

bicarbonatos de metales alcalinos tales como sodio o potasio, o aminas no nucleófilas, tales como diisopropiletilamina o trietilamina.

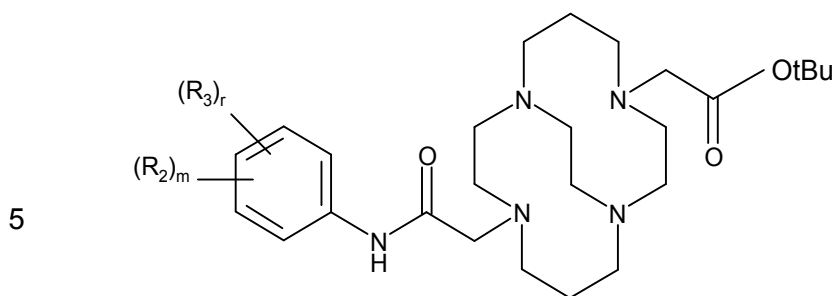
En una realización particular cuando el compuesto de fórmula L es el compuesto de
5 fórmula (L) o (L') que tiene la fórmula (L¹) el procedimiento de preparación comprende una etapa de alquilación del compuesto (V) en un único paso. En particular, el procedimiento comprende someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de alquilación con un compuesto de fórmula (III'), donde: z es un entero seleccionado entre 1 y 2; y X es un halógeno.



Un segundo procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula L donde R₁ es -OH comprende a) someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de
15 alquilación secuencial primero con un compuesto de fórmula (VI) para dar un compuesto de fórmula (IV),



25 y posteriormente con un compuesto de fórmula (III) como se ha definido anteriormente para dar el compuesto de fórmula (II); y b) someter el compuesto (II) obtenido en la etapa a) a una reacción de hidrólisis con un ácido seleccionado entre ácido trifluoroacético, ácido fórmico, y ácido clorhídrico acuoso para dar el compuesto de fórmula L donde R₁ es OH.



(II)

En el compuesto de fórmula (VI), Y es un halógeno; y en el compuesto de fórmula (II)
 10 R_2 se selecciona del grupo que consiste en F y CF_3 ; R_3 se selecciona del grupo que
 consiste en: H, (C_1-C_4) -alquilo; (C_1-C_4) -alcoxilo y un halógeno seleccionado entre Cl, Br
 e I; m es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3; r es un entero seleccionado entre 2, 3,
 y 4; donde la suma de m y r es 5 con la condición de que cuando en el compuesto de
 fórmula (III) R^6 es F, z es 2 o 3 y q es 2 o 3; y R_2 es F, m es 2 o 3 y r es 2 o 3.

15

Cuando R_1 en el ligando de fórmula L es $-HN-CH_2-COOH$, la primera alquilación del
 precursor 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano puede llevarse a cabo por reacción
 con tert-butil(2-cloroacetil)glicinato.

20 Los compuestos de fórmula L donde R_1 es $HN-CH_2-COOH$, $-HN$ -alquilo (C_1-C_6), o -
 $HN-NH$ -alquilo (C_1-C_6), pueden obtenerse sometiendo el compuesto de fórmula L
 donde R_1 es OH obtenido anteriormente a una reacción con la correspondiente amina.

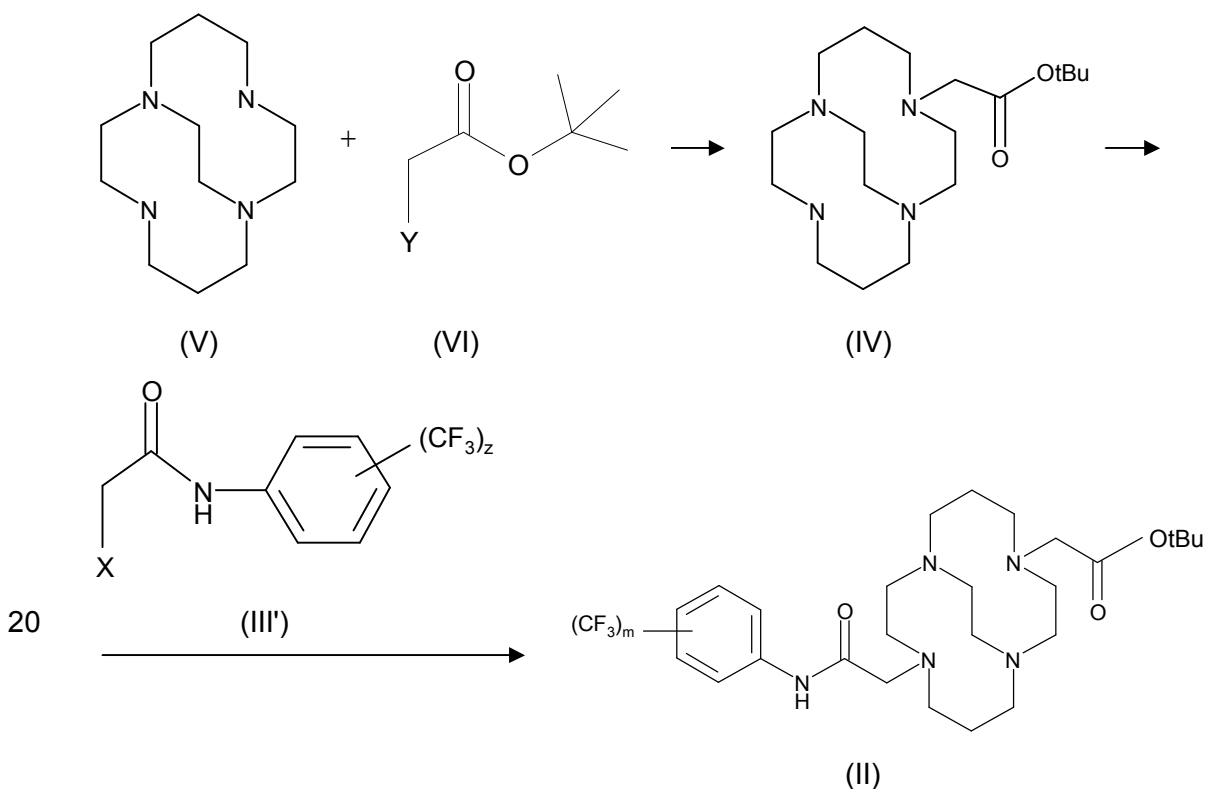
Los compuestos de fórmula (III) y (VI) o bien son conocidos, o bien pueden prepararse
 25 por métodos análogos a los de los compuestos conocidos.

En otra realización particular la alquilación secuencial del compuesto (V) primero por
 reacción con el compuesto (VI) y posteriormente con el compuesto (IV) se lleva a cabo
 en acetonitrilo. En otra realización particular, la segunda alquilación se lleva a cabo en
 30 presencia de una base tal como carbonato de un metal alcalino. En otra realización
 particular la base es carbonato potásico.

La etapa de hidrólisis del compuesto de fórmula (II) para dar lugar al compuesto de
 fórmula (L) se lleva a cabo utilizando ácido trifluoroacético, ácido fórmico o ácido

clorhídrico acuoso. La reacción también puede llevarse a cabo en presencia de disolvente, por ejemplo se puede utilizar ácido trifluoracético / diclorometano o bien utilizando por ejemplo solamente ácido fórmico. Generalmente la reacción se lleva a cabo a temperaturas altas, en particular a la temperatura de reflujo de la mezcla de
5 reacción.

En una realización particular, cuando el compuesto de fórmula (L) o (L') tiene la fórmula L^2 , el procedimiento comprende: a) someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de alquilación secuencial primero con un compuesto de fórmula (VI) a
10 una reacción de alquilación secuencial primero con un compuesto de fórmula (VI) donde Y es halógeno para dar el compuesto de fórmula (IV) y posteriormente con un compuesto de fórmula (III') donde z es un entero seleccionado entre 1 y 2 y X es un halógeno para dar el compuesto de fórmula (II) donde: m es un entero seleccionado entre 1 y 2; y b) someter el compuesto (II) obtenido en la etapa a) a una reacción de hidrólisis con un ácido, tal como ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico
15 acuoso, preferiblemente ácido fórmico. El procedimiento hasta la preparación del compuesto (II) se ilustra en el siguiente esquema de síntesis.



Por el término halógeno en los compuestos de fórmula (VI), (III) y (III') se entiende un átomo que se selecciona entre cloro, bromo y yodo. En una realización particular, Y es Br. En otra realización particular X es Cl.

- 5 Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un complejo de Ni^{2+} con el ligando de fórmula (L) según se ha definido anteriormente que tiene la fórmula $[\text{Ni}(\text{L})](\text{Z})_p$, donde: Z es un anión seleccionado entre cloruro, triflato y nitrato; y p es un entero que se selecciona entre 1 y 2. En una realización particular el complejo $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ es aquel donde el ligando (L) es L' . En otra realización particular el complejo $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ es aquel donde el ligando (L) es L^1 . En una realización particular el complejo $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ es aquel donde el ligando (L) es L^2 .

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un procedimiento para la preparación de los complejos de fórmula $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ que comprende hacer reaccionar el
15 ligando L con una sal de níquel en presencia de un disolvente adecuado. En una realización particular, la temperatura de la reacción está entre 100-160 °C. En otra realización particular, la preparación del complejo se lleva a cabo a una temperatura de entre 150-160 °C. En otra realización particular, la sal de níquel se selecciona entre $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NiCl_2 y $\text{Ni}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$. En otra realización particular, la sal de níquel se
20 selecciona entre $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y NiCl_2 . En otra realización particular, el solvente utilizado para la preparación de la sal es n-butanol.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende uno o más de los complejos metálicos definidos anteriormente, junto con
25 uno o más aditivos fisiológicamente aceptables. Aditivos fisiológicamente aceptables son aquellos que son apropiados para uso en contacto con un tejido u órgano del cuerpo humano o animal sin provocar excesiva toxicidad, irritación o respuesta alérgica u otros problema o complicaciones.

30 En una realización particular, la composición comprende uno o más de los complejos metálicos $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ definidos anteriormente junto con uno o más surfactantes no iónicos y aditivos fisiológicamente aceptables. Ejemplos de surfactantes apropiados son por ejemplo lecitina, etoxilato de sorbitan monolaurato (Tween 20®) o etoxilato de sorbitan monooleato (Tween 80®). Aditivos apropiados son, por ejemplo, tampones

fisiológicamente inocuos (como por ejemplo trometamina), pequeñas adiciones de formadores de complejos (como por ejemplo ácido dietilenotriaminapentaacético) y, opcionalmente, electrólitos (como por ejemplo cloruro de sodio) o antioxidantes tales como por ejemplo ácido ascórbico.

5

En una realización particular, la composición es aquella donde el complejo junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables y, opcionalmente, surfactantes no iónicos, está disuelto o suspendido en agua, solución salina fisiológica y/o solución de proteína, tal como p.ej. seroalbúmina humana.

10

La composición de la invención puede prepararse por métodos conocidos. En particular puede prepararse por incorporación de los complejos de la presente invención, eventualmente con incorporación de aditivos fisiológicamente aceptables usuales en galénica en un medio acuoso donde se disuelven y, a continuación, solución se esteriliza. Las composiciones de la invención deben estar prácticamente exentas de iones metálicos con efecto tóxico no complejados. Esto puede garantizarse por ejemplo con ayuda de indicadores de color tales como anaranjado de xilenol por valoraciones de control durante el procedimiento de producción. La solubilidad en agua de los complejos de la invención es buena, siendo especialmente buena la de los complejos con los ligandos de fórmula L^2 .

20

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con el complejo de fórmula: $[NiL](Z)_p$ tal como se ha definido anteriormente para uso como agente de contraste en la obtención de imágenes de un órgano y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear. También forma parte de la presente invención la composición que comprende uno o más de los complejos metálicos definidos anteriormente junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables tal como se ha definido anteriormente, para uso como agente de contraste en la obtención de imágenes de un órgano y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear. Estos dos últimos aspectos de la invención también se pueden formular como uso de un complejo de fórmula $[NiL](Z)_p$ tal como se definió anteriormente o de una composición que comprende uno o más de estos complejos metálicos junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables, para la preparación de un agente de contraste para la obtención de imágenes de un órgano

30

y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear. Estos aspectos de la invención también se pueden formular como un método de obtención de imágenes de un órgano y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear que comprende la administración en el área de interés del sujeto de un complejo de fórmula $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ tal como se definió anteriormente o de una composición que comprende uno o más de estos complejos metálicos junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables; y la posterior adquisición de una o más imágenes de la región de interés del cuerpo humano o animal.

10

La imagen por resonancia magnética es una herramienta muy útil por ejemplo para detectar, diagnosticar y hacer seguimiento de varias enfermedades como por ejemplo cáncer. En una realización particular, las imágenes obtenidas se utilizan para el diagnóstico de una enfermedad, es decir, los complejos o las composiciones que los comprenden según la invención son para uso en un método de diagnóstico por imagen de una región de interés (tejido y/o órgano) de un cuerpo humano o animal. En una realización particular, las imágenes son del sistema hepatobiliar de un cuerpo humano o animal. En una realización particular, la composición que comprende uno o más de estos complejos metálicos de la presente invención para uso según se ha definido anteriormente es para aplicación enteral o parenteral.

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: Espectros de RMN de ^{19}F (282 MHz, 298 K) para los complejos de níquel de los complejos de Ni^{2+} de los ejemplos 8 ($[\text{NiL}^{2a}](\text{NO}_3)$), 9 ($[\text{NiL}^{2b}]\text{Cl}$), y 11 ($[\text{NiL}^{1b}]\text{Cl}_2$).

5

FIGs. 2a-2d: Experimentos CEST obtenidos para (15 mM) en $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (mezcla 4:1) de los complejos $[\text{NiL}^{2a}](\text{NO}_3)$, $[\text{NiL}^{2b}]\text{Cl}$.

FIG. 3: Imágenes phantom por resonancia magnética de ^{19}F de los complejos $[\text{NiL}^{2a}](\text{NO}_3)$, $[\text{NiL}^{2b}]\text{Cl}$.

10

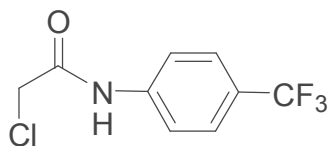
FIG: 4: Estructura del complejo $[\text{NiL}^{2a}](\text{NO}_3)$ determinada por difracción de rayos X.

FIG. 5: Espectro de absorción UV-Vis del complejo $[\text{NiL}^{2a}]$ en HCl 4 M registrados inmediatamente después de disolver la muestra y transcurridas 24 h. El inserto corresponde al espectro de masas de la disolución registrado después de 5 días.

15

EJEMPLOS

20 El precursor 2-cloro-N-(4-(trifluorometil)fenil)acetamida de fórmula (III^a) se preparó según se describe en Q. Ji, D. Yang et al., "Design, synthesis and evaluation of novel quinazoline-2,4-dione derivatives as chitin synthase inhibitors and antifungal agents" *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, vol. 22, pp. 3405-3413.

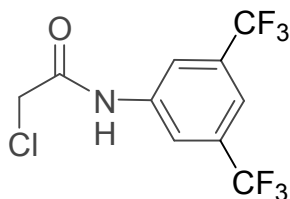


25

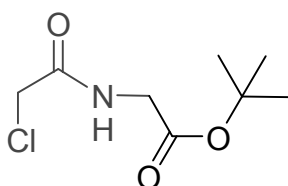
(III^a)

El precursor 2-cloro-N-(3,5-di-trifluorometil-fenil)acetamida de fórmula (III^b) se preparó según se describe en Z. Xiaohu et al., "Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies N-aryl-2-arylthioacetamides as Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors" *Chem. Biol. Drug Des.* 2010, vol. 76, pp. 330-339.

30

(III^b)

- El precursor tert-butil (2-cloroacetil)glicinato de fórmula (III^c) se prepara según se describe en M. M. Ali, et al., "Albumin- binding PARACEST agents" *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, vol. 12, pp. 855-865.

(III^c)

- Precusores con otros halógenos se pueden preparar de manera análoga. De igual manera, otros precusores de fórmula (III) pueden prepararse de manera análoga.

Las fórmulas NiLⁿ(Z)_p o NiLⁿ se han utilizado indistintamente en los ejemplos para hacer referencia a los complejos de la invención.

- 15 Ejemplo 1: Preparación del compuesto intermedio tert-butil 2-(1,4,8,11-tetraazabicyclo [6.6.2]hexadecan-4-il)acetato (IV)

- El precursor 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (0.3408 g, 1.506 mmol) se disolvió en acetonitrilo (15 mL). Sobre esta disolución se añadió gota a gota otra de tert-butil bromoacetato (234 uL, 1.05 eq) en CH₃CN (35 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 12 horas. El disolvente se eliminó en el rotavapor dando lugar a la formación de una espuma blanca higroscópica que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de CHCl₃ y metanol (gradiente de 0 a 10% de metanol). Se obtuvieron 0.2416 g del producto (47%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δH (ppm): 11.29 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, NH), 3.64-2.40 (m, 20H, CH₂), 1.90-1.26 (m, 16H, CH₂ + O^tCCH₃). Espectrometría de masas

(ESI-) m/z (%BPI): 341.29 (100) ($[C_{18}H_{37}N_4O_2]^+$); 285.23 (25) ($[C_{14}H_{29}N_4O_2]^+$).

Ejemplo 2: Preparación de 1-tert-butoxicarboximetil)- 8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (II^a)

5

Se emplearon el intermedio tert-butil 2-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acetato (IV) (0.1406 g, 0.413 mmol), K_2CO_3 (3 equivalentes) y el precursor 2-cloro-N-(4-(trifluorometil)fenil)acetamida de fórmula (III^a) (0.540 mmol, 1.3 equivalentes).

10

El precursor tert-butil 2-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acetato (IV) se disolvió en acetonitrilo (15 mL) y se añadió gota a gota una disolución de 2-cloro-N-(4-(trifluorometil)fenil)acetamida de fórmula (III^a) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 días hasta completar la alquilación. La mezcla se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El sólido amarillo obtenido tras la eliminación

15

del disolvente se purificó mediante cromatografía en columna utilizando alúmina neutra. Como fase móvil se empleó una mezcla $CHCl_3$ /metanol, empleando un gradiente de metanol del 0 al 5%. Se obtuvieron 0.1657 g de 4^a (74%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ H (ppm): 10.93 (s, 1H, NH), 10.72 (s, 1H, NH), 8.07-8.05 (d, 2H, CHar), 7.52-7.50 (d, 2H, CHar), 3.99-3.78 (dd, 2H, CH_2), 3.51-3.44 (dd, 2H, CH_2), 3.30-2.73 (m, 20H, CH_2), 1.45 (s, 9H, CH_2), 1.35-1.18 (m, 4H, CH_2). Espectrometría de masas (ESI-) m/z (%BPI): 542.33 (100) ($[C_{27}H_{43}F_3N_5O_3]^+$).

20

Ejemplo 3: Preparación de 1-tert-butoxicarboximetil)- 8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (II^b)

25

Se utilizó el compuesto tert-butil 2-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acetato (IV) (0.101 g, 0.297 mmol), K_2CO_3 (3 equivalentes) y el precursor 2-cloro-N-(3,5-di-trifluorometil-fenil)acetamida (III^b) (0.297 mmol, 1 eq).

30

El tert-butil 2-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acetato (IV) se disolvió en acetonitrilo (15 mL) y se añadió gota a gota una disolución de 2-cloro-N-(3,5-di-trifluorometil-fenil)acetamida (III^b) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente 3 días hasta completar la alquilación. La mezcla se filtró y se eliminó el disolvente a vacío. El sólido amarillo obtenido tras la eliminación del

35

disolvente se redisolvió en $CHCl_3$ (80 mL) y se lavó con agua (2 x 40 mL). La fase

orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro se filtró y se concentró a presión reducida para dar un aceite amarillo (cuantitativo). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δH (ppm): 11.32 (s, 1H, NH), 10.61 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 2H, CHar), 7.52 (s, 1H, CHar), 3.99-3.81 (m, 4H, CH₂), 3.64-2.74 (m, 20H, CH₂), 1.78 (m, 4H, CH₂), 1.25 (m, 9H, CH₂).

5 Espectrometría de masas (ESI⁻) m/z (%BPI): 609.32 (100) ([C₂₈H₄₂F₆N₅O₃]⁺); 554.25 (8) ([C₂₄H₃₄F₆N₅O₃]⁺).

Ejemplo 4: Preparación del ligando ácido 2-(11-(2-oxo-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acético (L^{2a})

10

El ligando L^{2a} se obtuvo mediante hidrólisis de los grupos éster tertbutílico del compuesto 1-tert-butoxicarboximetil)-8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (II^a) empleando ácido fórmico (5 mL). La mezcla se reflujo durante 48 horas, tras lo cual se eliminó el ácido fórmico en el rotavapor. El residuo se trató con agua (10 mL), que a continuación se evaporó en el rotavapor. Este proceso se repitió 5 veces. Finalmente, el producto se disolvió en agua y se liofilizó, para dar un sólido amarillo (0.1226 g, 75%). ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δH (ppm): 8.00 (s, 2H, CHar), 7.85 (s, 1H, CHar), 4.25-3.92 (dd, 2H, CH₂), 3.66-2.97 (m, 20H, CH₂), 2.85-2.65 (dd, 2H, CH₂), 2.33 (m, 2H, CH₂), 1.74-1.69 (d, 2H, CH₂).

15

20 Espectrometría de masas (ESI⁻) m/z (%BPI): 554.25 (100) ([C₂₄H₃₄F₆N₅O₃]⁺); 576.24 (10) ([C₂₄H₃₃F₆N₅NaO₃]⁺).

Ejemplo 5: Preparación del ligando ácido 2-(11-(2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il) acético (L^{2b})

25

El ligando L^{2b} se obtuvo mediante hidrólisis de los grupos éster tert-butílico del compuesto 1-tert-butoxicarboximetil)- 8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (II^b) empleando ácido fórmico (5 mL). La mezcla se reflujo durante 48 horas, tras lo cual se eliminó el ácido fórmico en el rotavapor. El residuo se trató con agua (10 mL), que a continuación se evaporó en el rotavapor. Este proceso se repitió 5 veces. Finalmente, el producto se disolvió en agua y se liofilizó, para dar un sólido amarillo (0.0735 g, 50%). ¹H RMN (300 MHz, D₂O): δH (ppm): 7.68-7.60 (m, 4H, CHar), 4.25-4.02 (dd, 2H, CH₂), 3.74-3.03 (m, 18H, CH₂), 2.82-2.64 (dd, 2H, CH₂), 2.34 (m, 2H, CH₂), 1.73-1.69 (d, 2H, CH₂). Espectrometría de

30

masas (ESI⁻) m/z (%BPI): 486.26 (100) ([C₂₄H₃₅F₃N₅O₃]⁺).

Ejemplo 6: Preparación de 1, 8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1a})

5

El precursor 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (V) (0.092 g, 0.4064 mmol) se disolvió en acetonitrilo (20 mL), en presencia de diisopropiletilamina DIPEA (290 µL, 4.1 eq) y se le añadió, gota a gota, una disolución del precursor 2-cloro-N-(4-(trifluorometil)fenil)acetamida de fórmula (III^a) (0.198 mg, 0.833 mmol, 2.05 eq) en 20 ml de acetonitrilo. La mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante 13 días hasta que la dialquilación se llevase a cabo en su totalidad. La mezcla de reacción se dejó alcanzar temperatura ambiente, se filtró y se evaporó el disolvente mediante rotavapor para dar lugar a un aceite amarillo intenso. Se obtuvo un aceite amarillo intenso (0.5595 g, rendimiento cuantitativo). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δH (ppm): 10.36 (s, 1H, NH), 9.66 (s, ¹H, NH), 7.94-7.92 (d, 4H, CHar), 7.47-7.45 (d, 4H, CHar), 4.24-2.89 (m, 28H, CH₂). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃) δC (ppm): 170.02 (cuaternario, CO), 141.50 (cuaternario, CHar), 125.88-125.85 (cuaternario, CHar), 122.93 (terciario, CHar), 119.66 (terciario, CHar), 58.37 (secundario, CH₂), 56.23 (secundario, CH₂), 55.80 (secundario, CH₂), 54.79 (secundario, CH₂), 53.63 (secundario, CH₂), 51.00 (secundario, CH₂), 50.03 (secundario, CH₂), 43.06 (secundario, CH₂), 24.69 (secundario, CH₂), 18.12 (secundario, CH₂), 12.42 (secundario, CH₂). ¹⁹F-RMN (376 MHz, CDCl₃) δF (ppm): -61.95 (CF₃). Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI): 629.30 (100) ([C₃₀H₃₉F₆N₆O₂]⁺). HR-MS (ESI⁺) m/z: [M]⁺, teórico: 629.3034, experimental: 629.3033.

25

Ejemplo 7: Preparación de 1, 8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1b})

Una disolución del precursor 2-cloro-N-(3,5-di-trifluorometil-fenil)acetamida de fórmula (III^b) (0.250 g, 0.817 mmol, 2.05 eq.) en 20 mL de acetonitrilo fue goteada mediante goteo lento sobre una disolución del compuesto 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (V) (0.090 g, 0.399 mmol) en presencia de diisopropiletilamina DIPEA (282 µL, 4.1 eq). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 6 días hasta que la dialquilación se llevase a cabo en su totalidad. La

mezcla de reacción se dejó alcanzar temperatura ambiente, se filtró y se evaporó el disolvente mediante rotavapor para dar lugar a un aceite amarillo intenso (0.4094 g, rendimiento cuantitativo). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δH (ppm): 10.25 (s, 1H, NH), 9.92 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 4H, CHar), 7.39 (s, 4H, CHar), 3.92-2.87 (m, 28H, CH_2). ^{13}C -RMN (101 MHz, CDCl_3) δC (ppm): 170.24 (cuaternario, CO), 139.86 (cuaternario, CHar), 132.04-131.05 (cuaternario, CF_3), 127.25 (cuaternario, CHar), 124.54 (cuaternario, CHar), 121.83 (terciario, CHar), 119.47 (terciario, CHar), 116.71 (terciario, CHar), 58.12 (secundario, CH_2), 56.13 (secundario, CH_2), 55.60 (secundario, CH_2), 54.99 (secundario, CH_2), 53.50 (secundario, CH_2), 49.85 (secundario, CH_2), 43.27 (secundario, CH_2), 24.61 (secundario, CH_2), 18.58 (secundario, CH_2), 17.24 (secundario, CH_2), 12.41 (secundario, CH_2). ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3) δF (ppm): -62.90. (CF_3). Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI): 765.28 (100) ($[\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{F}_{12}\text{N}_6\text{O}_2]^+$).

15 Ejemplo 8: Procedimiento general de síntesis de los complejos $[\text{NiL}^2](\text{NO}_3)$ donde $\text{L}^2 =$ ácido 2-(11-(2-oxo-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acético (L^{2a})

El ácido 2-(11-(2-oxo-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il)acético (L^{2a}) se disolvió en n-BuOH (10 mL) en presencia de DIPEA con la asistencia de un baño de ultrasonidos. La sal de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) se añadió a la mezcla de reacción en estado sólido. La reacción se mantuvo durante 6 h a 155 °C. La reacción se paró y se dejó enfriar. Se concentró a vacío y el producto se lavó repetidas veces con diclorometano. Sólido rosa (20 mg, 30%). Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI): 542.19 (100) ($[\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_5\text{NiO}_3]^+$). HR-MS (ESI⁺) m/z: $[\text{M}]^+$, teórico: 542.1883, experimental: 542.1888.

30 Ejemplo 9: Procedimiento general de síntesis de los complejos $[\text{NiL}^2]\text{Cl}$ donde $\text{L}^2 =$ ácido 2-(11-(2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il) acético (L^{2b})

El ácido 2-(11-(2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4-il) acético (L^{2b}) se disolvió en n-BuOH (10 mL) en presencia de DIPEA con la asistencia de un baño de ultrasonidos. se añadió NiCl_2 a la mezcla de

reacción en estado sólido. La reacción se mantuvo durante 6 h a 155 °C. La reacción se paró y se dejó enfriar. Se concentró a vacío y el producto se lavó repetidas veces con diclorometano. Sólido rosa (21.7 mg, 35%). Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI): 610.18 (100) ([C₂₄H₃₂F₆N₅NiO₃]⁺), 632.16 (8) ([C₂₄H₃₃N₅F₆NaNiO₃]⁺). HR-MS (ESI⁺) m/z: [M]⁺, teórico: 610.1757, experimental: 610.1753.

Ejemplo 10: Procedimiento de preparación de los complejos [NiL¹]Cl₂ donde L¹ = 1, 8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1a})

10 1,8-((4-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1a}). fue disuelto en n-butanol preseco (15 mL) con la asistencia de un baño de ultrasonidos y fue purgado con una corriente de argón. La sal de níquel, NiCl₂, fue añadida en estado sólido a la disolución. La reacción se mantuvo a 120 °C durante 7 h. Seguidamente la reacción se paró y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla

15 de reacción se concentró a vacío para obtener un producto rosa. El sólido fue purificado mediante MPLC usando una columna C₁₈ de fase inversa. Una disolución acuosa del compuesto en las condiciones de elución (CH₃CN:H₂O, v:v, conteniendo un 0.1% de trietilamina) se preparó y filtró mediante un filtro de celulosa (0.20 µm de tamaño de poro) antes de la inyección. El método de purificación llevado a cabo se

20 realizó mediante un gradiente del disolvente B (CH₃CN, del 5 a 10%) en el disolvente A (H₂O). Se combinaron las fracciones que contenían el complejo y el disolvente fue eliminado a vacío. El producto final fue redisolto en agua y liofilizado para obtener los complejos finales. Sólido rosa. Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI): 343.12 (100) ([C₃₀H₃₈F₆N₆NiO₂]₂⁺).

25

Ejemplo 11: Procedimiento de preparación de los complejos [NiL¹]Cl₂ donde L¹ = 1, 8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1b})

1,8-((3,5-(trifluorometilfenil)acetamida)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano (L^{1b})

30 fue disuelto en n-butanol preseco (15 mL) con la asistencia de un baño de ultrasonidos y fue purgado con una corriente de argón. La sal de níquel, NiCl₂, fue añadida en estado sólido a la disolución. La reacción se mantuvo a 120 °C durante 7 h. Seguidamente la reacción se paró y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a vacío para obtener un producto rosa. El sólido fue

purificado mediante MPLC usando una columna C₁₈ de fase inversa. Una disolución acuosa del compuesto en las condiciones de elución (CH₃CN:H₂O, v:v, conteniendo un 0.1% de trietilamina) se preparó y filtró mediante un filtro de celulosa (0.20 µm de tamaño de poro) antes de la inyección. El método de purificación llevado a cabo se realizó mediante un gradiente del disolvente B (CH₃CN, del 5 a 10%) en el disolvente A (H₂O). Se combinaron las fracciones que contenían el complejo y el disolvente fue eliminado a vacío. El producto final fue redisolto en agua y liofilizado para obtener los complejos finales. Sólido rosa. Espectrometría de masas (ESI⁺) m/z (%BPI):) 411.11 (100) ([C₃₂H₃₆F₁₂N₆NiO₂]₂⁺).

10

Ejemplo 12: Estudio de los espectros de RMN de ¹⁹F de los complejos de los ejemplos 8, 9 y 11

Los espectros de RMN de ¹⁹F de los complejos de Ni²⁺ de los ejemplos 8, 9 y 11 dan lugar a una única señal (FIG. 1), lo que evidencia la presencia de una única especie en disolución. En el caso del complejo del ejemplo 8 Ni(L^{2a}), en el espectro de ¹⁹F puede observarse otra señal de ¹⁹F debido al contraion triflato (Z). El paramagnetismo del ion metálico produce una alteración en los valores de T₁ y T₂ de ¹⁹F, dando lugar a un acortamiento en los tiempos de relajación (Tabla 1). Esto es importante de cara a la aplicación de estos compuestos como agentes de contraste, pues permite una adquisición más rápida.

20

Tabla 1. Tiempos de relajación longitudinal (T₁) y transversal (T₂) y desplazamientos químicos (282 MHz, 298 K, pH 7.22 (NiL^{2a}), 6.85 (NiL^{2b}) y 6.96 (NiL^{1b}) para los complejos de níquel de L^{2a}, L^{2b}, y L^{1a}.

25

Compuesto	¹⁹ F T1 (ms)	¹⁹ F T2 (ms)	T2/T1	Desplazamiento (ppm)
NiL ^{2a} Ejemplo 8	24	20	0.85	-59.5
NiL ^{2b} (Ejemplo 9)	11	10	0.92	-59.6
NiL ^{1b} (Ejemplo 11)	5.8	5.8	1.0	-60.9

Ejemplo 13: Estudio de los espectros de RMN ^1H CEST (Chemical Exchange Saturation transfer)

- Todos los espectros de RMN han sido adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance
 5 III 300 MHz y procesados usando el software TopSpin 2.1 (Bruker GmbH). Los resultados han sido analizados mediante el software MestRenova (Mestrelab Research, S.L.). Las concentraciones de los complejos han sido determinadas mediante análisis elemental empleando un equipo ThermoQuest Flash EA 1112.
- 10 Los experimentos CEST fueron llevados a cabo para los complejos NiL^n (15 mM) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (4:1). El espectro Z se ha registrado a 25 y 37 °C y a diferentes potencias ($B_1 = 2.5, 5, 10, 15, 20, 25$ y 30 μT), utilizando un tiempo de saturación de 10 s y un tiempo de irradiación de 2 s (cf. FIGs 2a-2d).
- 15 Valores a destacar: a $B_1 = 10 \mu\text{T}$: NiL^{2a} (Ejemplo 8) (25 °C, 56 ppm, 3 %; 37 °C, 54 ppm, 5 %), NiL^{2b} (Ejemplo 9) (25 °C, 56 ppm, 2 %; 37 °C, 53 ppm, 2 %). Puede observarse una señal CEST en torno a 56 ppm que varía en amplitud dependiendo de la potencia del pulso de saturación.
- 20 Mediante estos experimentos se ha determinado la velocidad de intercambio de la molécula de agua para cada uno de los complejos, utilizando el método descrito para el software MATLAB por el Dr. Zaiss (cf. M. Zaiss, et al., "A combined analytical solution for chemical exchange saturation transfer and semi-solid magnetization transfer" *NMR Biomed.* 2015, vol. 28, pp. 217–230). La velocidad de intercambio de
 25 los protones de las amidas que conforman los complejos de NiL^{2a} y NiL^{2b} a 25 y 37 °C varían significativamente dependiendo del número de grupos CF_3 de los que dispongan [k_{ex} (NiL^{2a}) 7.1 kHz (25 °C) y 6.6 kHz (37 °C); k_{ex} (NiL^{2b}) 10.9 kHz (25 °C) y 17.2 kHz (37 °C)]. Los estudios anteriores mostraron que los complejos NiL^{2a} y NiL^{2b} proporcionan un efecto CEST *in vitro* significativo.
 30

Ejemplo 14: Estudio de imagen de ^{19}F phantom de Resonancia Magnética

- Las medidas de las imágenes de resonancia magnética han sido registradas en el
 35 equipo Bruker BioSpec 70/30 USR (versión de software Paravision 5.1), utilizando una bovina de superficie Bruker (RF SUC 300 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ _20mm LIN TR). Las imágenes de ^{19}F

fueron adquiridas usando una secuencia de disparo sencillo de rápido ángulo bajo (Fast Low Angle Single Shot, FLASH).

Las disoluciones phantom consistieron en viales de 400 μ L que contenían las disoluciones de los complejos en una concentración 15 mM, utilizando como referencia una disolución de triflato sódico en la misma concentración.

Los parámetros experimentales para las imágenes de flúor 19 son: FOV = 32 x 32, MTX 32 x 32, grosor de corte de 5 mm. El resto de parámetros se contemplan en la tabla 2. Los valores de SNR (signal-to-noise ratio, relación señal-ruido) para las IRM de flúor se muestran en la tabla 3

Tabla 2. Parámetros de IRM de ^{19}F .

Muestra/parámetro	Ángulo de giro/0	TR / TE / ms	NEX	TA / min
NiL ^{2b} (Ejemplo 9)	42	3.20 / 1.01	35156	60
NiL ^{2a} (Ejemplo 8)	29	3.20 / 1.01	35156	60

15

Tabla 3. Valores de SNR para los complejos NiL^{2b} y NiL^{2a}

Muestra	SNR
NiL ^{2b} /TFA	136.89 / 47.79
NiL ^{2a} (1) /TFA	98.32 / 30.00
NiL ^{2a} (2) /TFA	53.36 / 30.00

La FIG 3 muestra imágenes phantom por resonancia magnética de ^{19}F de NiL^{2a} y NiL^{2b}. En el caso de NiL^{2a} la imagen más brillante corresponde a la resonancia de los grupos CF_3 del ligando, y la menos brillante al contraion triflato.

El estudio de imagen de ^{19}F in vitro confirma la habilidad de estos complejos para proporcionar contraste a la frecuencia de ^{19}F , proporcionando imágenes mucho más brillantes que las del ácido trifluoroacético (TFA).

25

Ejemplo 15: Determinación de la estructura del complejo del ejemplo 8 por difracción de rayos X

Se obtuvieron cristales aptos para su estudio por difracción de rayos X de monocristal por lenta evaporación de una disolución acuosa del complejo. Los datos cristalográficos fueron registrados a 100 K en un difractómetro Bruker D8 Venture acoplado a un detector Photon 100 CMOS detector empleando radiación Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) generada en una fuente microfocal de alto brillo Incoatec equipada con óptica multicapa Incoatec Helios. El software APEX3 fue empleado en la recolección de los datos de las imágenes de difracción, indexado de las reflexiones y determinación de los de los parámetros de celda. Para integrar la intensidad de las reflexiones se empleó el software SAINT, mientras que para el escalado y corrección empírica de la absorción se utilizó SADABS. La estructura se resolvió mediante el método dual-space empleando el programa SHELXT. Todos los átomos (exceptuando los de hidrógeno) fueron refinados con parámetros térmicos anisotrópicos mediante cálculos de mínimos cuadrados de matriz completa en F2 utilizando el programa SHELXL-2014. Los átomos de hidrógeno se incorporaron en posiciones calculadas y se restringieron con parámetros térmicos isotrópicos. Datos del cristal y detalles del refinado de la estructura: Fórmula: C₁₆H₃₆Cl₂N₆NiO₄; P.M.: 506.10; Sistema cristalino: monoclinico; grupo espacial: P2₁/c; a=9.0398(10) Å; b=14.7690(16) Å; c=17.0424(18) Å; β =101.726(4) $^\circ$; V=2227.8(4) Å³; F(000)=1072; Z=4; D_{calc}=1.509 g cm⁻³; μ = 1.146 mm⁻¹; θ rango=2.301–28.331 $^\circ$; R_{int}=0.0387; 42599 reflexiones medidas, de las que 5544 eran independientes y 4695 únicas con I > 2 σ (I). GOF en F²=1.033; R1=0.0277; wR2 (todos los datos)= 0.0682; Mayores diferencias (peak/hole): 0.529 y –0.283 eÅ⁻³.

La estructura del complejo [NiL^{2a}] (como la sal trifluorometanosulfonato) se determinó utilizando medidas de difracción de rayos X (FIG. 4). El difractograma de rayos X muestra que el ion metálico se coordina directamente con los cuatro átomos de N de la unidad macrocíclica, con distancias de Ni N en el rango de 2.07-2.10 Å. Los átomos de oxígeno de los brazos colgantes completan la coordinación octaédrica distorsionada alrededor del ión metálico. La distancia de Ni-O que involucra el átomo de oxígeno carboxilato (2.026 Å) es ligeramente más corta que la del átomo de oxígeno amida (2.075 Å).

Ejemplo 16: Estudio estabilidad de los complejos

La inercia cinética del complejo $[\text{NiL}^{2a}]$ con respecto a su disociación se estudió mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, empleando un espectrofotómetro de
 5 doble haz UVIKON-XS (Bio-Tek instruments). La composición de la disolución se investigó mediante espectrometría de masas empleando la técnica de electrospray en modo positivo. Los espectros se registraron con un espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite. El complejo $[\text{NiL}^{2a}]$ se disolvió en una disolución de ácido clorhídrico 4 M, y se registró el espectro de absorción de manera inmediata (FIG.
 10 5). El espectro registrado después de 24 horas coincide con el espectro registrado inmediatamente después de la disolución de la muestra, lo que sugiere que el complejo no disocia en estas condiciones. La integridad del complejo se confirma mediante espectrometría de masas, ya que el espectro registrado después de 5 días muestra un pico a $m/z = 542.19$ debido a la entidad $[\text{NiL}^{2a}]^+$. Por otro lado, el espectro
 15 no muestra la señal a $m/z = 486.26$ debido al ligando libre protonado HL^{2a+} , lo que confirma la estabilidad del complejo en estas condiciones.

A modo de ejemplo, el complejo $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ disocia en estas condiciones con un tiempo de vida media de 2.4 horas (E. Toth, et al. "Kinetics of Formation and
 20 Disociation of Lanthanide (III)-DOTA Complexes", *Inorg. Chem.* 1994, vol. 33, pp. 4070–4076), lo que refleja la elevadísima inercia de los complejos de Ni^{2+} que se describen aquí.

LISTA DE CITAS

25

Literatura de patentes

- WO2014/107722A1

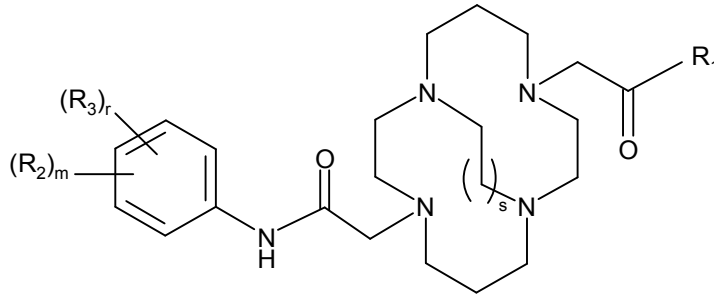
30 Literatura no-patente

- S. Aime et al., "p(O₂)-Responsive MRI Contrast Agent Based on the Redox Switch of Manganese (II/III)-Porphyrin Complexes", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, vol. 39, pp. 747-750

- S. J Dorazio et al., "CoCEST: cobalt(II) amide-appended paraCEST MRI contrast agents. *Chem. Commun.*, 2013, vol. 49, pp. 10025-10027)
- 5 - Q. Ji, D. Yang et al., "Design, synthesis and evaluation of novel quinazoline-2,4-dione derivatives as chitin synthase inhibitors and antifungal agents" *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, vol. 22 , pp. 3405-3413.
- Z. Xiaohe et al., "Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies N-aryl-2-arylthioacetamides as Non-nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors" *Chem. Biol. Drug Des.* 2010, vol. 76, pp. 330-339.
- 10
- M. M. Ali, et al., "Albumin- binding PARACEST agents" *J. Biol. Inorg. Chem.* 20007, vol. 12, pp. 855-865.
- 15
- N. Cakic et al., "Paramagnetic lanthanide chelates for multicontrast MRI", *Chem Comm* 2016, vol. 52, pp. 9224-9227.
- M. Zaiss, et al. "A combined analytical solution for chemical exchange saturation transfer and semi-solid magnetization transfer", *NMR Biomed.* 2015, vol. 28, pp. 217–230.
- 20
- E. Toth, et al., "Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide (III)-DOTA Complexes", *Inorg. Chem.* 1994, vol. 33, pp. 4070–4076.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



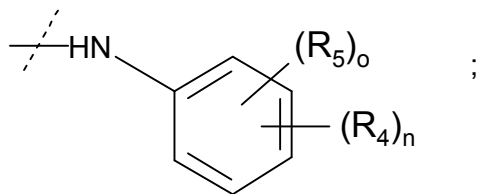
5

(L)

donde:

R_1 se selecciona del grupo que consiste en: -OH,; -HN-CH₂-COOH, -HN-alquilo (C₁-
10 C₆), -HN-NH-alquilo (C₁-C₆), y

15



R_2 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en F and CF₃;

20 R_3 y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: H, (C₁-C₄)-alquilo; (C₁-C₄)-alcoxilo y un halógeno seleccionado entre Cl, Br e I;

m es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3;

25 r es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4;

la suma de m y r es 5;

n es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3;

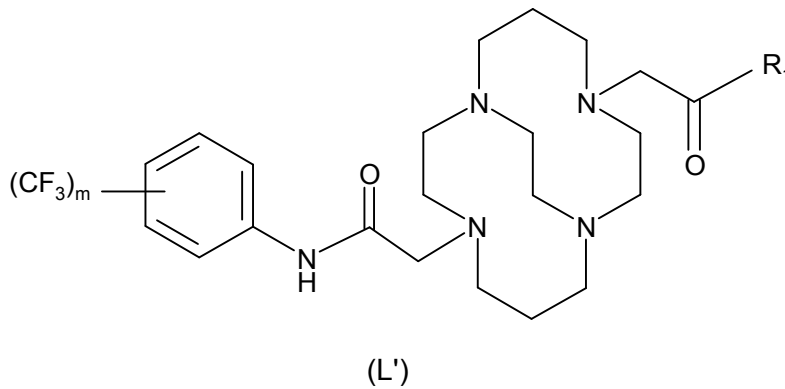
o es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4;

5 la suma de n y o es 5;

s es un entero seleccionado entre 1 y 2;

10 con la condición de que cuando R_2 es F, m es 2 o 3 y r es 2 o 3, y cuando R_4 es F, n es 2 o 3 y o es 2 o 3.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (L) tiene la fórmula (L'):

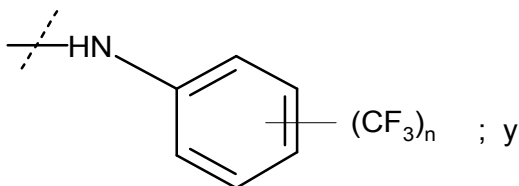


15

donde:

R_1 se selecciona del grupo que consiste en: -OH; -HN-CH₂-COOH; y

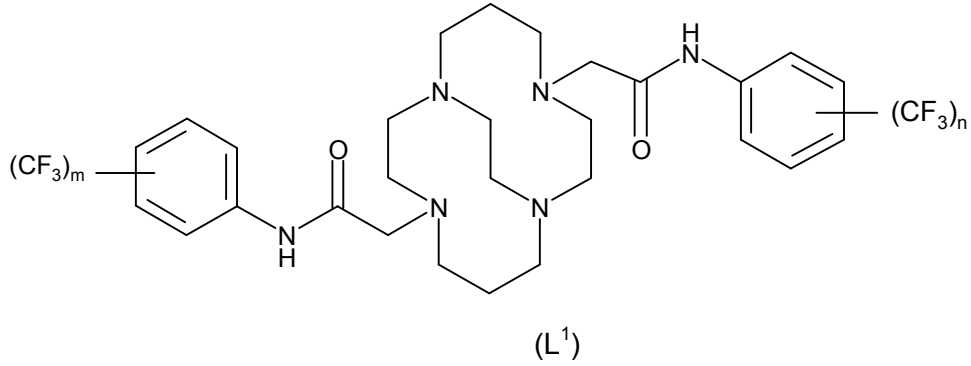
20



25

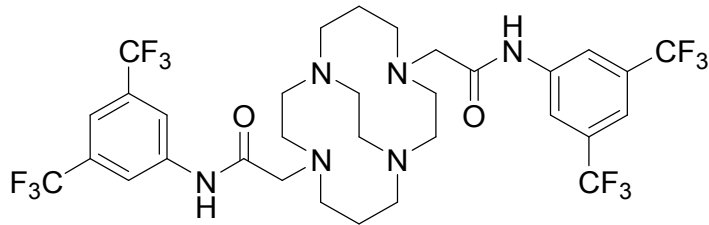
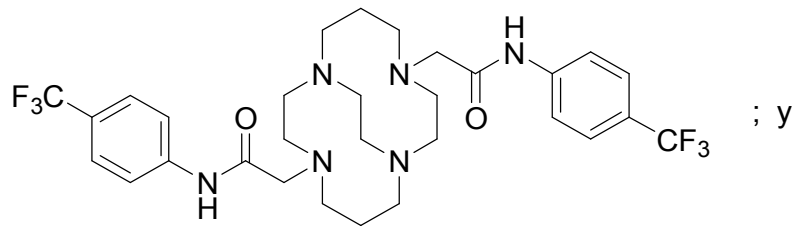
m y n son un entero independientemente seleccionado entre 1 y 2.

3. Compuesto según la reivindicación 2 de fórmula (L¹), donde m y n tienen los valores definidos en la reivindicación 2.



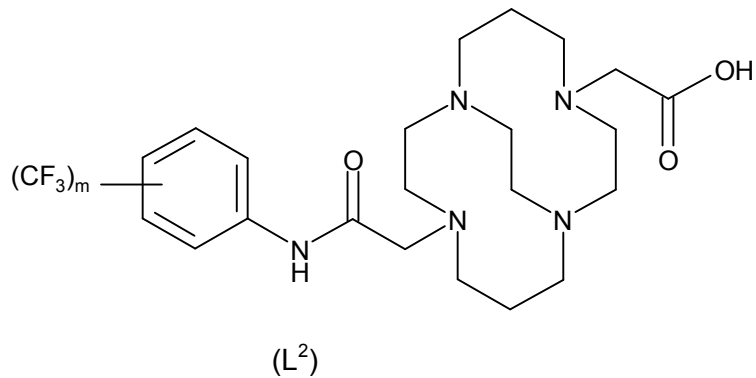
5

4. Compuesto según la reivindicación 3, que se selecciona entre:

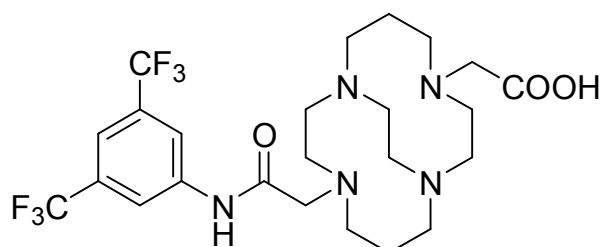
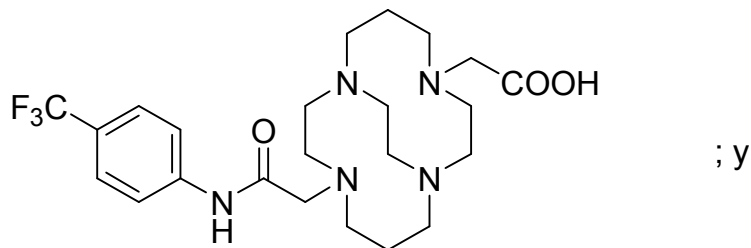


5. Compuesto según la reivindicación 2 de fórmula (L²), donde m tiene el mismo valor que en la reivindicación 2.

10



6. Compuesto según la reivindicación 5, que se selecciona entre:



5 7. Complejo de Ni^{2+} con el ligando de fórmula (L) según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que tiene la fórmula $[\text{NiL}](\text{Z})_p$

donde:

10 Z es un anión seleccionado entre cloruro, triflato y nitrato; y

p es un entero que se selecciona entre 1 y 2.

15 8. Composición que comprende uno o más de los complejos metálicos de la reivindicación 7, junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables.

9. Composición según la reivindicación 8, donde el complejo junto con uno o más aditivos fisiológicamente aceptables están disueltos en agua, solución salina fisiológica y/o solución de proteína.

20

10. Complejo según la reivindicación 7, para uso como agente de contraste en la obtención de imágenes de un órgano y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear.

11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, para uso como agente de contraste en la obtención de imágenes de un órgano y/o tejido de un cuerpo humano o animal mediante resonancia magnética nuclear.

5

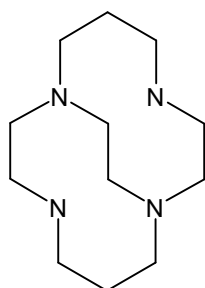
12. Composición para uso según la reivindicación 11, donde la composición es para la aplicación enteral o parenteral.

10 13. Complejo para uso según la reivindicación 10 o composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde la imagen se utiliza para el diagnóstico de una enfermedad.

14. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (L) que comprende:

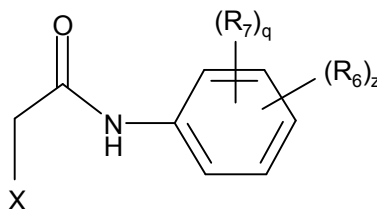
15

o bien, someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de alquilación con un compuesto de fórmula (III),



20

(V)



(III)

donde:

X es un halógeno;

25

R₆ se selecciona del grupo que consiste en F y CF₃:

R₇ se selecciona del grupo que consiste en: H, (C₁-C₄)-alquilo; (C₁-C₄)-alcoxilo y un halógeno seleccionado entre Cl, Br e I;

z es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3;

q es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4;

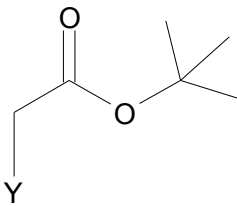
5

la suma de z y q es 5;

con la condición de que cuando R^6 es F, z es 2 o 3 y q es 2 o 3;

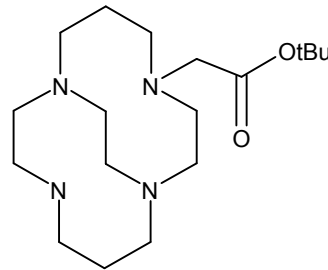
10 o bien, a) someter un compuesto de fórmula (V) a una reacción de alquilación secuencial primero con un compuesto de fórmula (VI) para dar un compuesto de fórmula (IV)

15



20

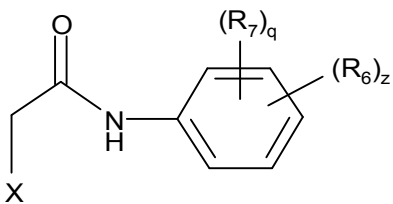
(VI)



(IV)

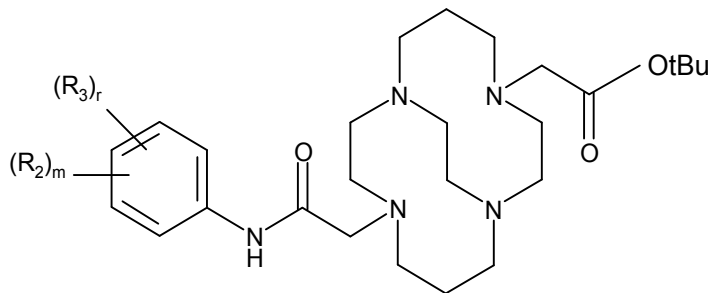
y posteriormente con un compuesto de fórmula (III) para dar el compuesto de fórmula (II):

25



30

(III)



(II)

b) someter el compuesto (II) obtenido en la etapa a) a una reacción de hidrólisis con un ácido seleccionado entre ácido trifluoroacético, ácido fórmico, y ácido clorhídrico acuoso: y,

- 5 c) en caso necesario someter el compuesto de fórmula L donde R_1 es OH obtenido anteriormente a una reacción con la correspondiente amina para dar el correspondiente compuesto de fórmula L;

donde:

10

X e Y son independientemente halógeno;

R_2 y R_6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en F and CF_3 :

- 15 R_3 y R_7 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: H, (C_1-C_4) -alquilo; (C_1-C_4) -alcoxilo y un halógeno seleccionado entre Cl, Br e I;

z es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3;

- 20 q es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4;

la suma de z y q es 5;

m es un entero seleccionado entre 1, 2, y 3;

25

r es un entero seleccionado entre 2, 3, y 4;

la suma de m y r es 5;

- 30 con la condición de que cuando R^6 es F, z es 2 o 3 y q es 2 o 3; y R_2 es F, m es 2 o 3 y r es 2.

15. Procedimiento para la preparación de los complejos de fórmula $[\text{NiL}](\text{Z})_p$ que comprende hacer reaccionar el ligando L con una sal de níquel a una temperatura de entre 100-160 °C.

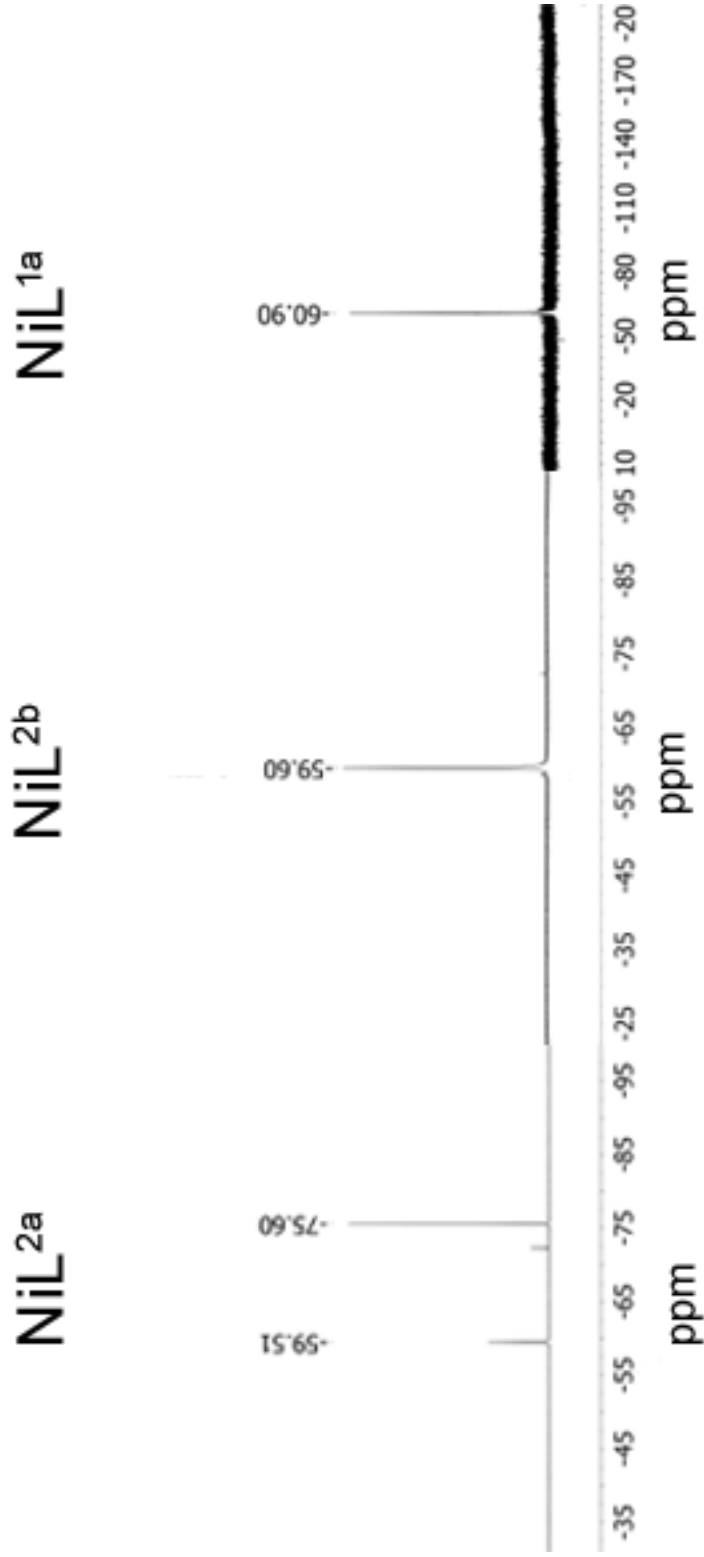


FIG. 1

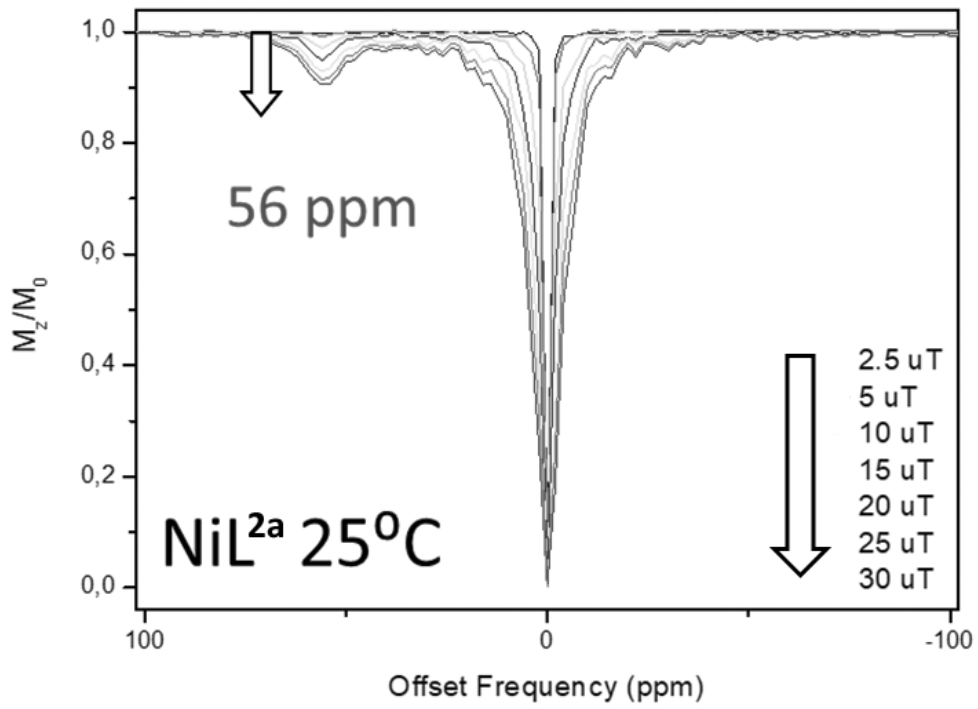


FIG. 2a

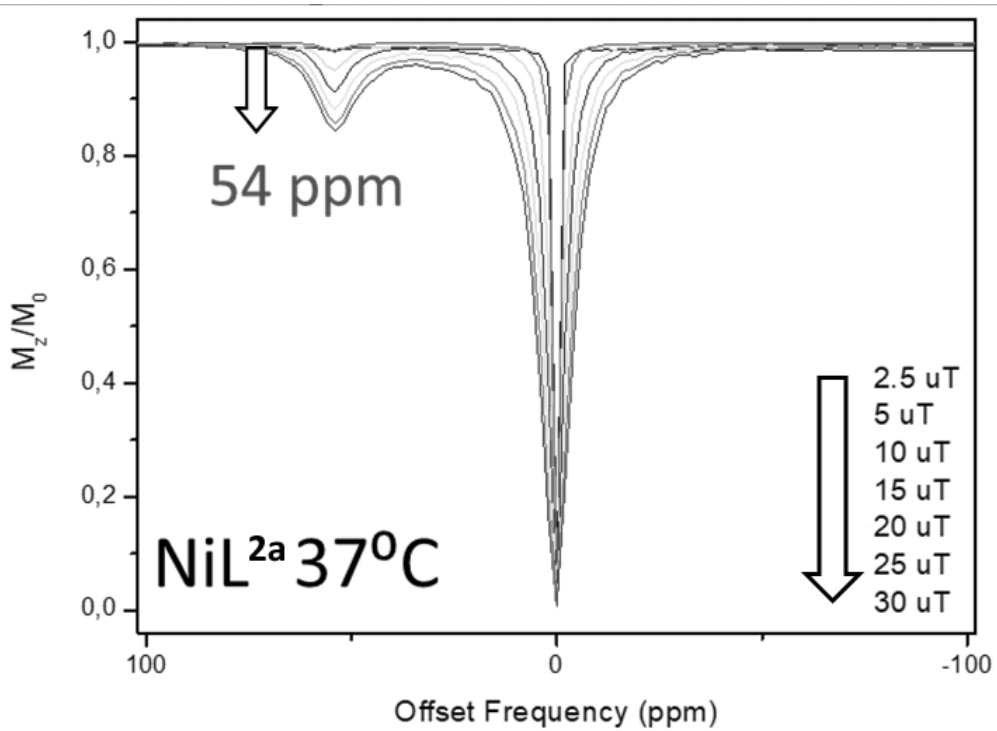


FIG. 2b

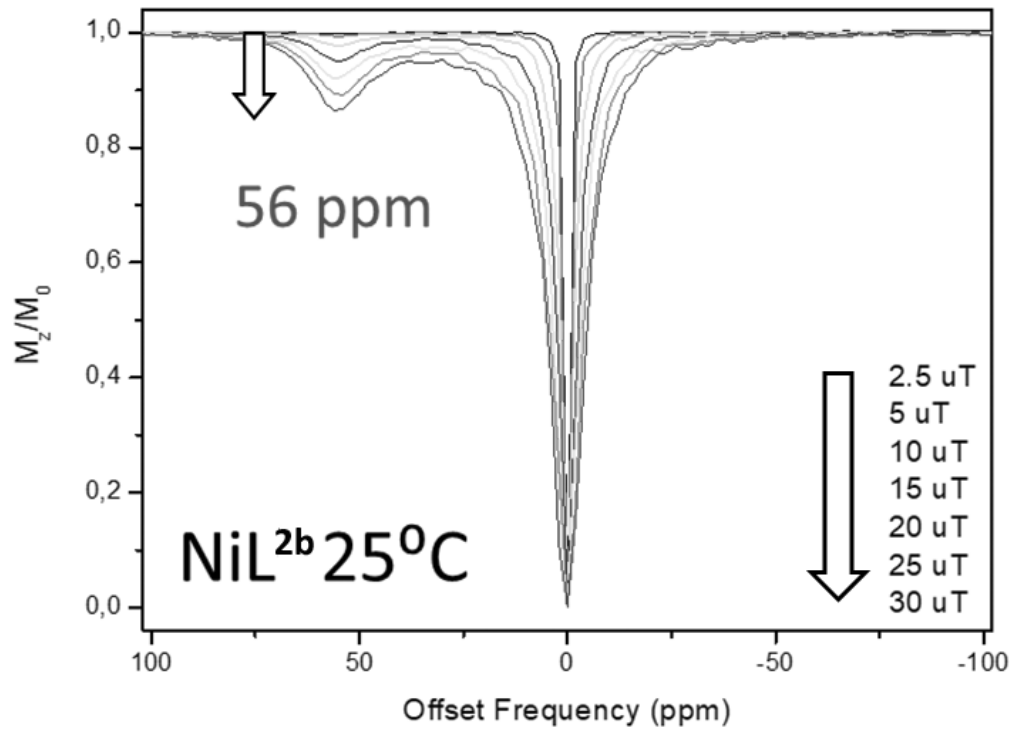


FIG. 2c

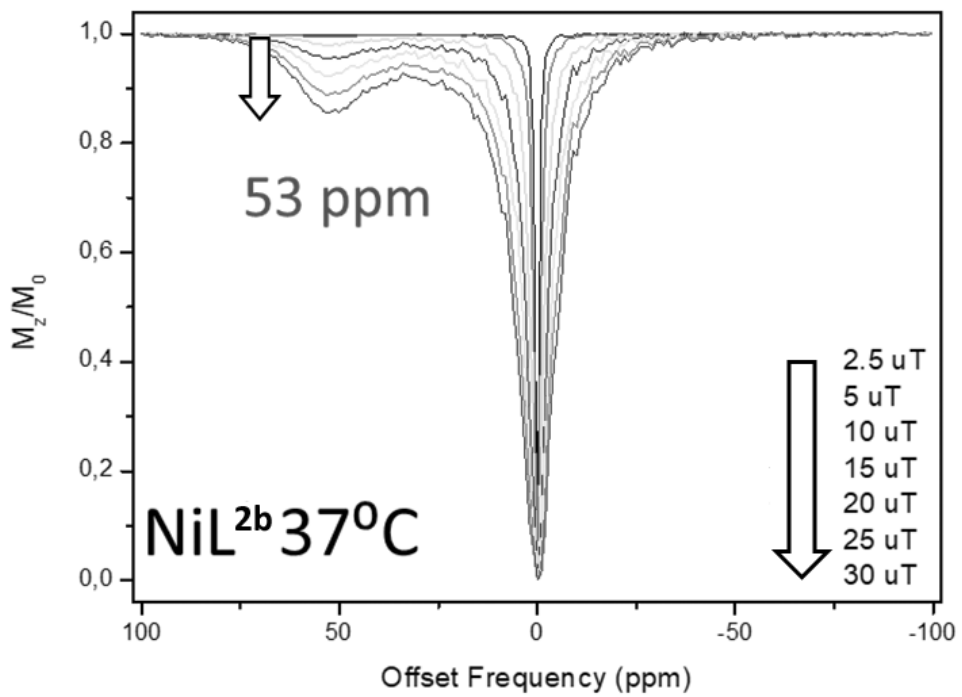


FIG. 2d

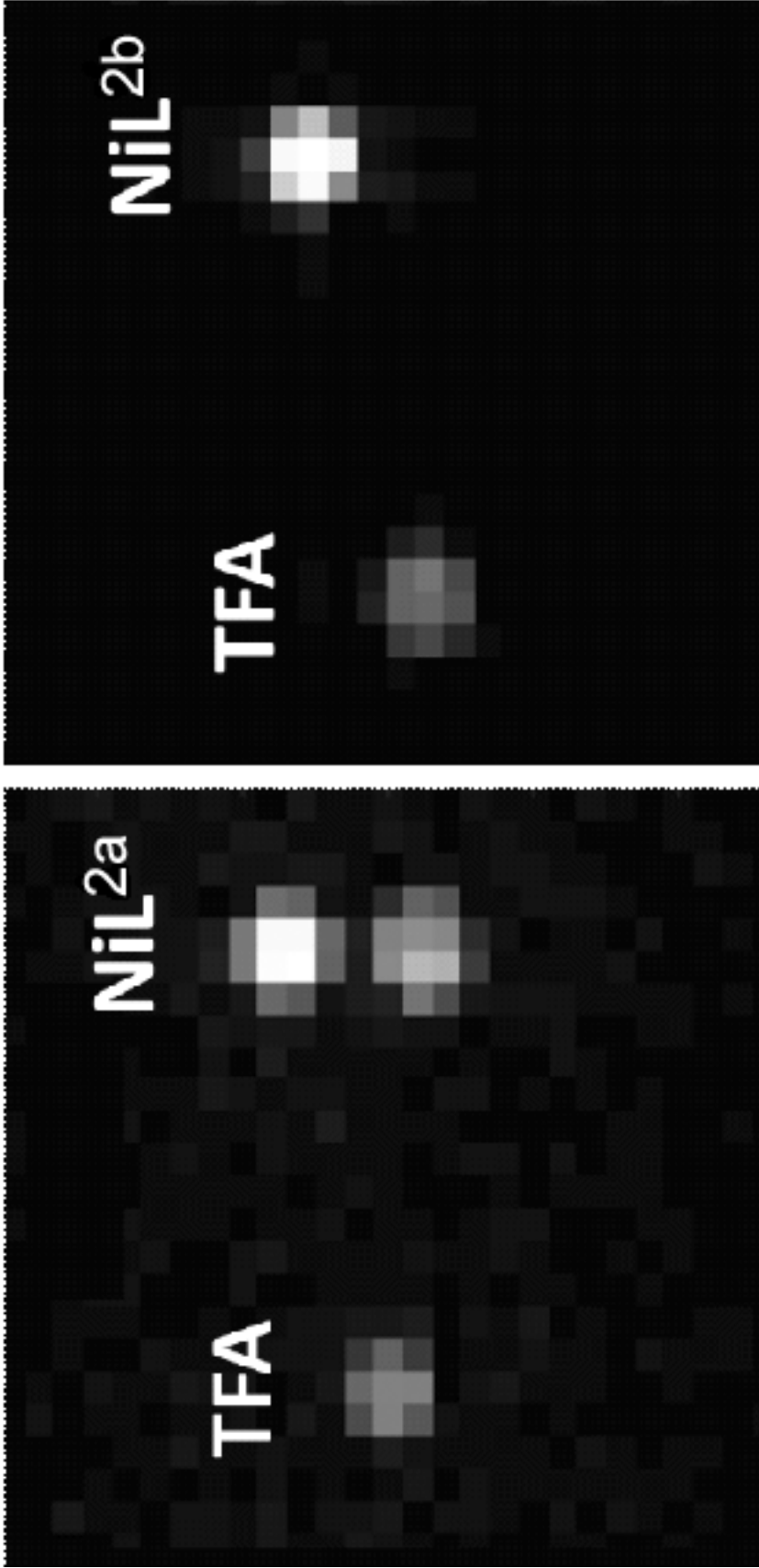


FIG. 3

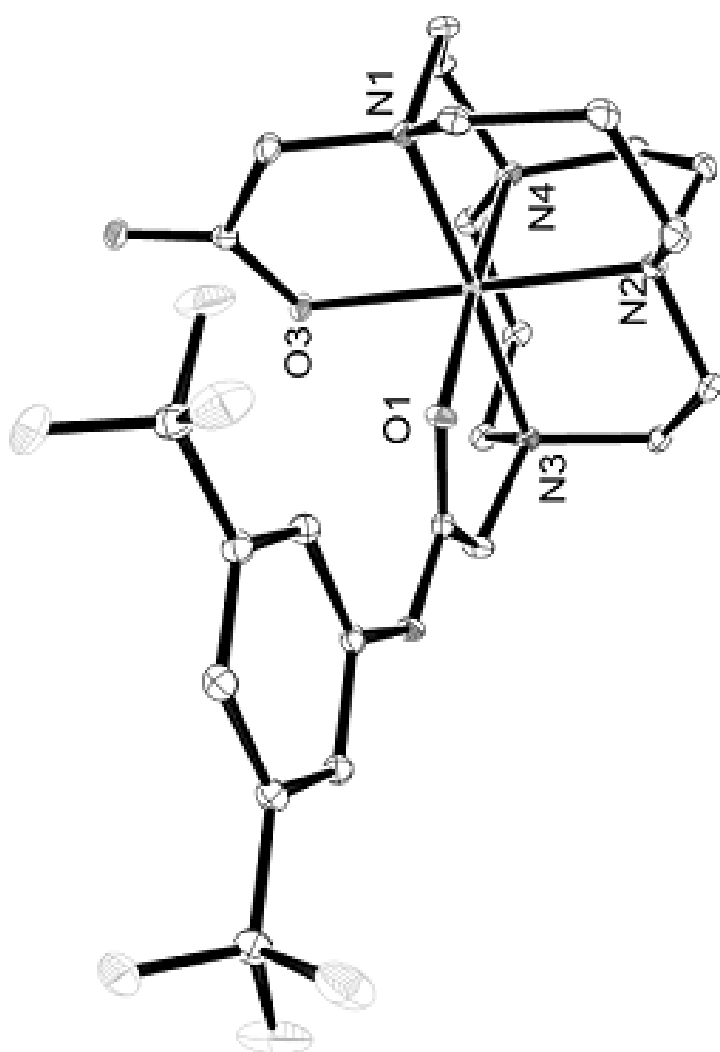


FIG. 4

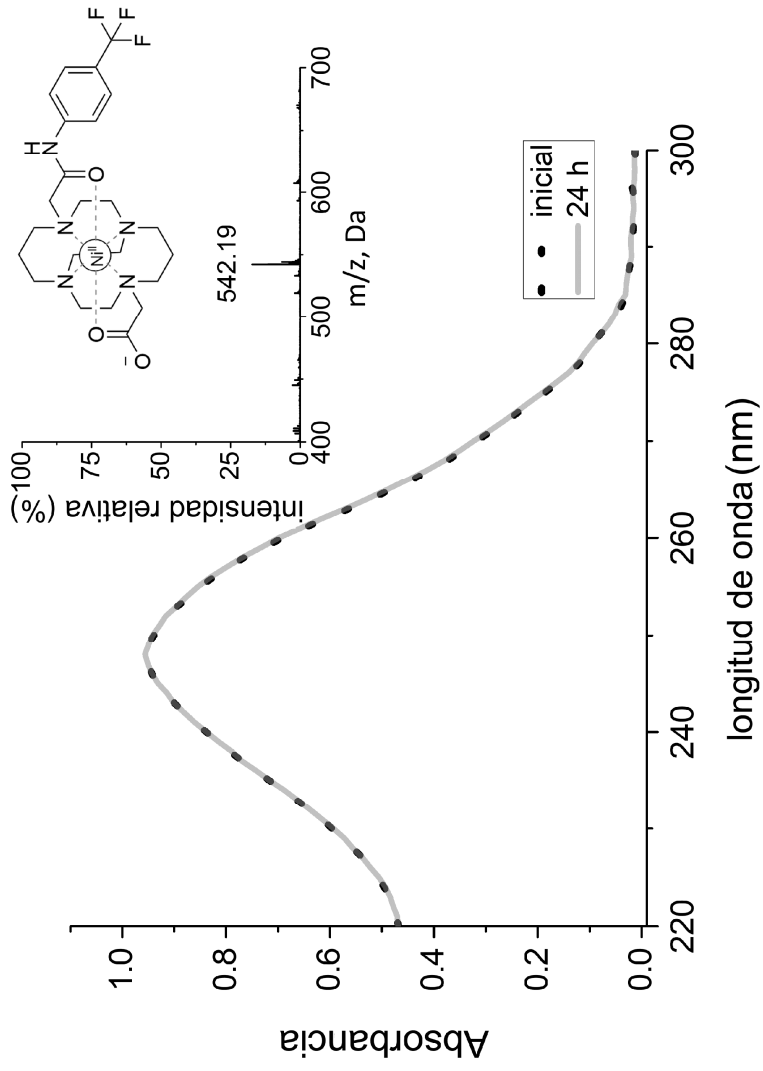


FIG. 5



②¹ N.º solicitud: 201831074

②² Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2018

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2014/195416 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Y UNIVERSITE DE BRETAGNE) 11/12/2014, todo el documento	1-15
A	A O OLATUNDE et al. The NiCEST approach: Nickel (II) paraCEST MRI contrast agent. Journal American Chemical Society, 2012, Vol. 134, Páginas 18503-18505. resumen, chart 1	1-15
A	L CANEDA MARTINEZ et al. Toward inert paramagnetic (Ni (II)-based chemical Exchange saturation transfer MRI agents. Dalton Transactions, 2017, Vol. 46, Páginas 15095-15106. resumen	1-15

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
14.03.2019

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F15/04 (2006.01)

C07D487/08 (2006.01)

A61K51/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07F, C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, REGISTRY, CAS