



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 253 018**

② Número de solicitud: 200300936

⑤ Int. Cl.:
C07D 403/06 (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **23.04.2003**

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

Fecha de la concesión: **30.07.2007**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

⑦ Titular/es: **Universidad Nacional de educación a Distancia (U.N.E.D.)
c/ Bravo Murillo, 38 - 4ª pta.
28015 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

⑦ Inventor/es: **Ballesteros García, Paloma;
López Larrubia, Pilar;
Domínguez Mateo, Laura;
Marco Contelles, José Luis y
Cerdán García-Esteller, Sebastián**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **1, ω -di-imidazol-1-ilpolioles como indicadores extrínsecos de pH para espectroscopía e imagen por resonancia magnética.**

⑦ Resumen:

1, ω -di-imidazol-1-ilpolioles como indicadores extrínsecos de pH para espectroscopía e imagen por resonancia magnética.

Un compuesto de Fórmula General A que se puede emplear como indicador extrínseco para la determinación de pH celular por espectroscopía e imagen de Resonancia Magnética.

El compuesto de Fórmula General A en donde n es 1; n es 2; n es 3 y n es 4.

Un procedimiento para la obtención del compuesto de Fórmula General A, de la reivindicación 1 que parte de los correspondientes alditoles e implica las etapas que se indican a continuación. 1. Protección selectiva de grupos OH primarios y secundarios; 2. Desprotección selectiva de grupos primarios y 3. Activación grupos OH primarios. Los intermedios activados de los alditoles se hacen reaccionar con 4 equivalentes de imidazol en medio básico para obtener los correspondientes derivados de imidazol. La desprotección final de los grupos OH secundarios conduce a los correspondientes 1, ω -di-imidazol-1-ilpolioles deseados.

La utilización experimental y clínica del compuesto de Fórmula General A en el diagnóstico por imagen.

ES 2 253 018 B1

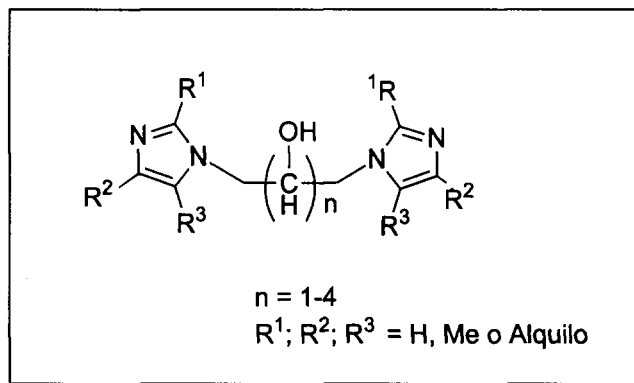
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

1, ω -di-imidazol-1-ilpolioles como indicadores extrínsecos de pH para espectroscopía e imagen por resonancia magnética.

5 **Campo técnico de la invención**

Se propone la síntesis y caracterización de 1, ω -di-imidazol-1-ilpolioles de Fórmula General A que se indica a continuación:



Fórmula A

30 Con el fin de obtener una nueva serie de indicadores de pH y volumen celular para Espectroscopia e Imagen por Resonancia Magnética (RM).

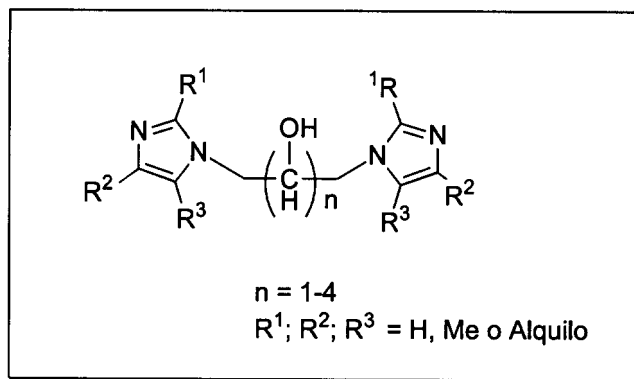
35 **Estado de la técnica anterior**

Ciertos ácidos imidazol-1-ilalcanoicos se han utilizado para determinar el pH y el volumen celular en células aisladas y en tejidos por espectroscopia e imagen de RM. Estos indicadores extrínsecos han permitido, tanto distinguir el pH intra- y extracelular, como obtener mapas de pH en tumores implantados en rata. Sin embargo, la existencia de un solo anillo de imidazol en estas estructuras da lugar a una baja sensibilidad en el análisis por Resonancia Magnética. Por otro lado, se ha comprobado que estos indicadores son excretados muy rápidamente en orina, hecho que dificulta su posible utilidad en periodos prolongados requeridos en la obtención de las imágenes.

45 En esta invención proponemos estructuras análogas a las anteriormente mencionadas, que constituyan una nueva generación de agentes de contraste funcionales de pH con una mayor sensibilidad frente al pH, con niveles aun más bajos de toxicidad así como con una mayor capacidad de retención frente a los transportadores renales. En este sentido, abordaremos la preparación de derivados de estructuras más polares como los alditoles.

50 **Descripción detallada de la invención**

Dentro de esta nueva línea se propone la síntesis de una serie de derivados de imidazol anclado a cadenas de polioles de Fórmula General que se indica a continuación:



Fórmula A

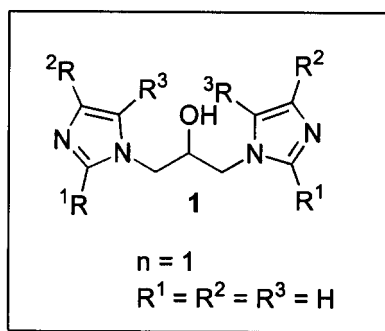
ES 2 253 018 B1

A modo de ejemplo y sin que por ello se entienda que limitan en modo alguno el ámbito de la presente invención, en esta memoria descriptiva se presentan las síntesis de las moléculas 1-3.

5

10

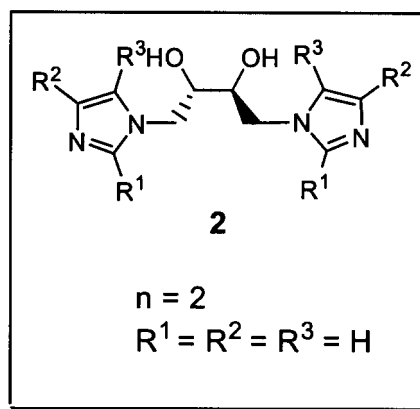
15



20

25

30



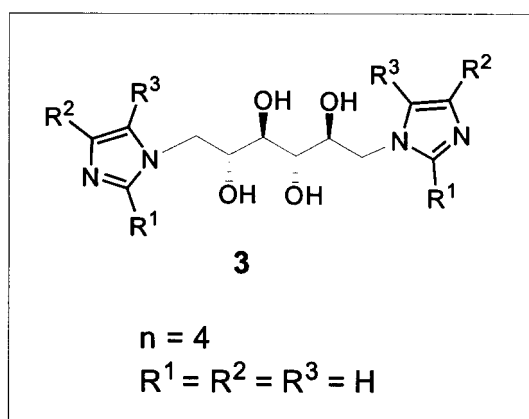
35

40

45

50

55

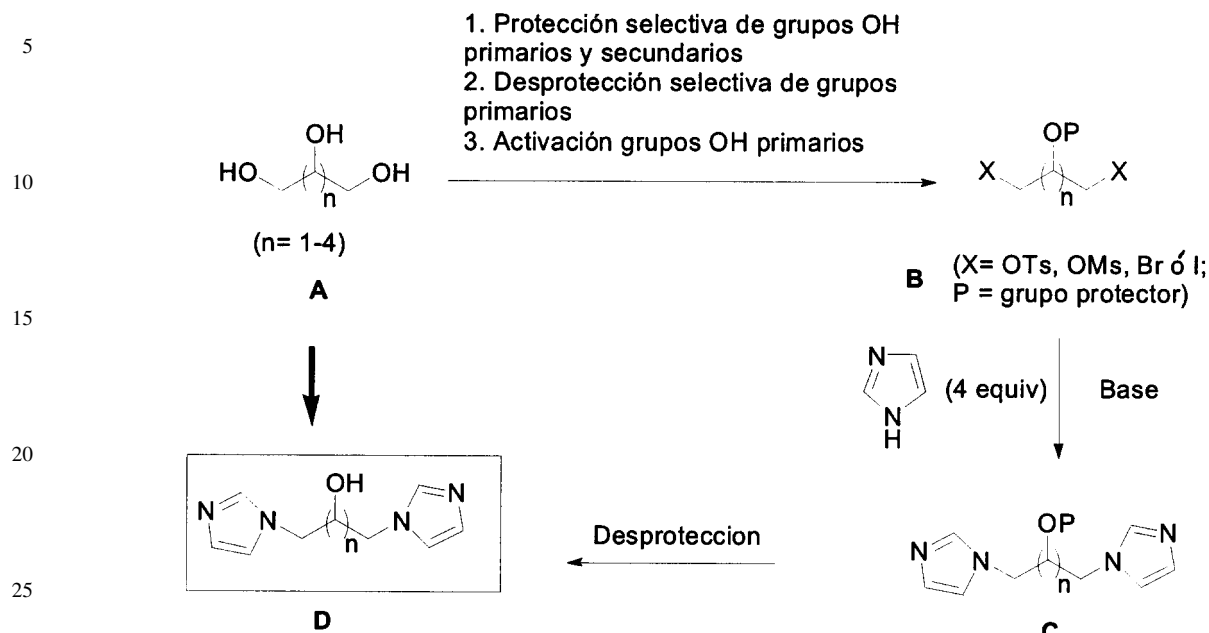


Las moléculas se sintetizarán según el siguiente esquema general de reacciones (Esquema 1).

60

65

Esquema 1



30 1. 1,3-Diimidazol-1-il-1,3-desoxi-glicerol (1)

35 A una disolución de imidazol (0.520 g, 7.7 mmol) y NaNH_2 (0.300 g, 7.7 mmol) en DMF seca (10 mL), se adiciona el 1,3-ditosilato-2-O-acetil glicerol (0.860 g, 1.94 mmol). Se deja reaccionar durante dos días a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente y se cromatografía en columna usando como mezcla eluyente (CH_2Cl_2 :MeOH, 2:1). Posteriormente, se purifica por recristalización en etanol. Se obtiene el producto como un aceite amarillo (0,121 g, 17%)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 200 MHz) δ 7.59 (s, 2H, H-2 Im), 6.92 (s, 2H, H-5 Im), 6.81 (s, 2H, H-4 Im), 3.91 (m, 3H, H-2, H-1 a, H-3a), 3.69 (m, 2H, H-1 b, H-3b).

40 $^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , 50 MHz) δ 138.4 (2 x C-2 Im), 127.6 (2 x C-4 Im), 120.8 (2 x C-5 Im), 69.8 (C-2), 50.0 (C-1, C-3).

EM (ES): 193 $[\text{M}+1]^+$, 215 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

45 IR (BrK) ν 3115, 1649, 1574, 1511, 1480, 1439, 1286, 1234, 1106, 1081 cm^{-1} .

Análisis para $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ (192.22 g/mol): Teórico: C 56.24%; H 6.29%; N 29.15%. Obtenido: C 56.01%; H 6.51%; N 29.01%.

50 2. (-)-1,4-Diimidazol-1-il-1,4-desoxi-L-treitol (2) 2HCl

2.1. (-)-1,4-Diimidazol-2,3-O-isopropiliden-1,4-desoxi-L-treitol (4)

55 Una disolución de imidazol (0.441 g, 6.48 mmol) y NaNH_2 (0.253 g, 6.48 mmol) en DMF seca (15 mL) se mantiene en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se añade 1,4-di-O-p-toluensulfonil-2,3-O-isopropiliden-L-treitol (0.764 g, 1.62 mmol) y se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez que se observa la desaparición del producto de partida y del producto intermedio 1-imidazol-2,3-O-isopropiliden-4-O-p-toluensulfonil-1-desoxitreitol, se extrae en diclorometano:agua (x2). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se elimina el disolvente codestilando con tolueno. La purificación del producto obtenido se realiza mediante cromatografía en columna con una mezcla de diclorometano:metanol (98/2) como eluyente. Se obtiene 4 (0.373 g, 88%) como un sólido blanco. $[\alpha]_{\text{D}} = -300$ (c 0.57, metanol). PF = 60-62°C

60 IR (BrK) ν 3427, 3220, 2991, 1621, 1513, 1231, 1102, 1075 cm^{-1} .

65 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.44 (s, 2 H, H-2 Im), 7.05 (s, 2 H, H-5 Im), 6.89 (s, 2 H, H-4 Im), 3.93 (s ancho, 4 H, 2 x CH_2), 3.82 (s ancho, 2 H, 2 x CH), 1.30 (s, 6 H, 2 x CH_3).

ES 2 253 018 B1

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 137.9 (2 x C-2 Im), 129.9 (2 x C-5 Im), 120.1 (2 x C-4 Im), 110.7 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}$], 77.1 (2 x CH), 48.0 (2 x CH_2), 27.0 (2 x CH_3).

EM (ES): 263 $[\text{M}+1]^+$, 525 $[2\text{M}+1]^+$, 547 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Análisis para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ (262.31 g/mol): Teórico: C 59.53%; H 6.92%; N 21.36%.

Obtenido: C 59.65%; H 6.78%; N 21.41%

2.2. (-)-1,4-Diimidazol-1-il-1,4-desoxi-L-treitol (2) 2HCl

En un matraz de 25 mL se disuelve 4 (0.180 g, 0.69 mmol) en 3 mL de HCl 1.2 M durante 3 horas a 50°C. Una vez finalizada la hidrólisis se elimina el disolvente y se purifica mediante una recristalización en metanol. Se obtiene 2 x 2HCl (0.149 g, 97%) como un sólido blanco. $[\alpha]_{\text{D}} = -25^\circ$ (c 0.67, metanol). PF = 215°C

IR (BrK) ν 3232, 1576, 1544, 1436, 1283, 1087 cm^{-1} .

^1H NMR (D_2O , 200 MHz) δ 8.61 (s, 2 H, H-2 Im), 7.38 (s, 2 H, H-5 Im), 7.32 (s, 2 H, H-4 Im), 4.32-4.16 (m, 4 H, 2 x CH_2), 3.98-3.91 (m, 2 H, 2 x CH).

^{13}C NMR (D_2O , 50 MHz) δ 135.2 (2 x C-2 Im), 122.3 (2 x C-5 Im), 119.7 (2 x C-4 Im), 69.7 (2 x CH), 52.0 (2 x CH_2).

EM (ES): 223 $[\text{M}+1]^+$, 445 $[2\text{M}+1]^+$.

Análisis para $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (295.17 g/mol): Teórico: C 38.35%; H 5.79%; N 17.89%. Obtenido: C 38.41%; H 5.80%; N 18.01%.

3. (+)-1,6-Diimidazol-1-il-1,6-desoxi-D-manitol (3) 2 x HCl

3.1. (-)-1,6-Diimidazol-1-il-2,4;3,5-diisopropiliden-1,6-desoxi-D-manitol (5) y (-)-1,6-diimidazol-1-il-2,3;4,5-diisopropiliden-1,6-desoxi-D-manitol (6)

En un matraz de 50 mL se disuelven bajo atmósfera de argón, imidazol (0.462 g, 6.8 mmol) y NaNH_2 (0.265 g, 6.8 mmol) en DMF seca (10 mL) y se agitan a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se añade una mezcla de 1,6-dimesilato-2,4;3,5-diisopropilidenmanitol y 1,6-dimesilato-2,3;4,5-diisopropiliden-manitol (0.710 g, 1.70 mmol) y se deja reaccionar durante 24 horas a 70°C. Una vez que se observa la desaparición del producto de partida, se extrae con diclorometano:agua (x2). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se elimina el disolvente. La purificación de los dos productos obtenidos se realiza mediante cromatografía en columna con una mezcla de diclorometano:metanol (97/3) como eluyente. Se obtienen 5 (0.312 g, 51%) y 6 (0.159, 26%), ambos como sólidos blancos. El rendimiento global de la reacción es de 77%.

(-)-1,6-Diimidazol-1-il-2,4;3,5-diisopropiliden-1,6-desoxi-D-manitol (5)

$[\alpha]_{\text{D}} = -14^\circ$ (c 0.40, metanol). PF = 125°C

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.47 (s, 2 H, H-2 Im), 7.02 (s, 2 H, H-5 Im), 6.93 (s, 2 H, H-4 Im), 3.92 (m, 4 H, 2 x CH_2), 3.81 (m, 2 H, 2 x CH), 3.55 (m, 2 H, 2 x CH), 1.28 (s, 12 H, 4 x CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 138.0 (2 x C-2 Im), 129.3 (2 x C-5 Im), 119.9 (2 x C-4 Im), 110.6 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}$], 69.2 (2 x CH), 68.3 (2 x CH), 48.3 (2 x CH_2), 24.7 (2 x CH_3), 23.7 (2 x CH_3).

EM (ES): 363 $[\text{M}+1]^+$, 725 $[2\text{M}+1]^+$, 747 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Análisis para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$ (362.43 g/mol): Teórico: C 59.65%; H 7.23%; N 15.46%. Obtenido: C 59.78%; H 7.14%; N 15.31%.

(-)-1,6-diimidazol-1-il-2,3;4,5-diisopropiliden-1,6-desoxi-D-manitol (6)

$[\alpha]_{\text{D}} = -8^\circ$ (c 0.62, metanol). PF = 123°C

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.52 (s, 2 H, H-2 Im), 7.03 (s, 2 H, H-5 Im), 6.99 (s, 2 H, H-4 Im), 4.11-4.41 (m, 8 H, 2 x CH_2 , 4 x CH), 1.56 (s, 6 H, 2 x CH_3), 1.32 (s, 6 H, 2 x CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 137.8 (2 x C-2 Im), 129.7 (2 x C-5 Im), 119.6 (2 x C-4 Im), 110.1 [$\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}$], 77.5 (2 x CH), 74.3 (2 x CH), 48.6 (2 x CH_2), 27.3 (2 x CH_3), 25.6 (2 x CH_3).

EM (ES): 363 $[\text{M}+1]^+$, 725 $[2\text{M}+1]^+$, 747 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

ES 2 253 018 B1

Análisis para $C_{18}H_{26}N_4O_4$ (362.43 g/mol): Teórico: C 59.65%; H 7.23%; N 15.46%. Obtenido: C 59.71%; H 7.35%; N 15.29%

3.2. (+)-1,6-Di-imidazol-1-il-1,6-desoxi-D-manitol (3) 2 x HCl

En un matraz de 100 mL se ponen a reaccionar la mezcla de isómeros 5 y 6 (0.470 g, 1.29 mmol) en 10 mL de HCl 1.2 M durante 2 horas a 50°C. Una vez finalizada la hidrólisis se elimina el disolvente y se purifica mediante sucesivos lavados con etanol absoluto y una recristalización en metanol. Se obtiene 3 (0.215 g, 51%) como un sólido blanco. $[\alpha]_D = +10^\circ$ (c 0.43, metanol). PF = 212°C.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 200 MHz) δ 8.57 (s, 2 H, H-2 Im), 7.36 (s, 2 H, H-5 Im), 7.31 (s, 2 H, H-4 Im), 4.46-4.13 (m, 4 H, 2 x CH_2), 3.86 (m, 2H, 2 x CH), 3.47 (d, 2H, 2 x CH).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , 50 MHz) δ 135.4 (2 x C-2 Im), 122.7 (2 x C-5 Im), 119.7 (2 x C-4 Im), 69.6 (2 x CH), 68.8 (2 x CH), 52.6 (2 x CH_2).

EM (ES): 283 $[M+1]^+$, 565 $[2M+1]^+$.

Análisis para $C_{12}H_{18}N_4O_4 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$ (282.30 g/mol [391.25 g/mol]):

Teórico: C 36.84%; H 6.18%; N 14.32%. Obtenido: C 37.01%; H 6.21%; N 14.45%.

4. Determinación de pK'_a aparente (pK'_a)

El valor de pK'_a del nitrógeno N-3 del anillo de imidazol se ha determinado por espectroscopia de $^1\text{H RMN}$. La titulación de pH se ha llevado a cabo a 37°C empleando disoluciones 25 mM del compuesto en agua deuterada (D_2O), ajustando el valor de pH de cada una de las disoluciones por medio de la adición de NaOD ó DCl. En cada caso se ha barrido el intervalo de pH que oscilaba entre 3 y 11, empleando un tubo diferente para cada uno de los valores de pH. Se ha obtenido la dependencia del desplazamiento químico (δ) del protón H-2 de los anillos de imidazol respecto del pH, y se ha ajustado computacionalmente a la ecuación de Henderson-Hasselbalch con el programa Sigma Plot v 4.0.:

$$\text{pH} = \text{pK}'_a - \log[(\delta - \delta_1)/(\delta_2 - \delta)]$$

En la ecuación, los parámetros d_1 y d_2 se refieren a los límites de desplazamiento químico inferior (aniónico) y superior (catiónico) de la curva de titulación. La regresión no lineal basada en un ajuste por mínimos cuadrados, permite la determinación de los valores óptimos de δ_1 , δ_2 y pK'_a . Las variaciones observadas en el desplazamiento químico del protón H-2 se deben a la protonación/desprotonación del átomo N-3 del anillo de imidazol.

TABLA 1

Valores de pK'_a de los compuestos 1-3 en D_2O

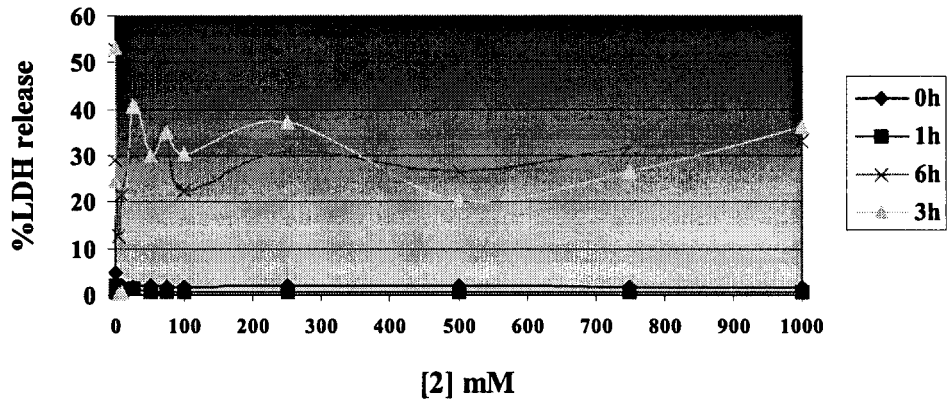
Compuesto	D_2O
1	6,45
2	6,56
3	7,00

6. Estudios de toxicidad *in vitro*

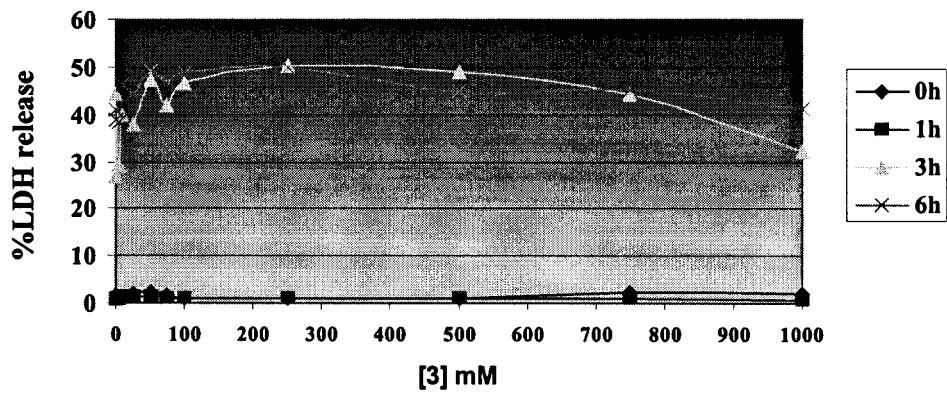
La toxicidad se ha investigado por monitorización de la cantidad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) intracelular que se extruye al medio en cultivos de células de glioma C6. Las células se crecieron hasta confluencia en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) conteniendo un 5% de suero fetal bovino. Se incubaron durante 1, 3 y 6 horas con concentraciones crecientes de 2 y 3 en medio KRB (Krebs Henseleit Buffer). La cantidad de LDH eliminada al medio se ha medido espectrofotométricamente en un lector de microplaca (Molecular Devices Spectramax, Sunnyvale, CA) a 340 nm, usando una solución base que contiene HEPES 50 mM (pH = 7.2), piruvato sódico 5 mM y NADH 0,35 mM. Al final del experimento, las células se rompieron por congelación (-70°C)/descongelación (37°C) tres veces consecutivas para determinar la cantidad total de LDH. Los resultados obtenidos para cada tiempo, se han expresado como porcentaje de la cantidad total de LDH presente en el medio después de la destrucción celular.

ES 2 253 018 B1

Toxicidad compuesto 2

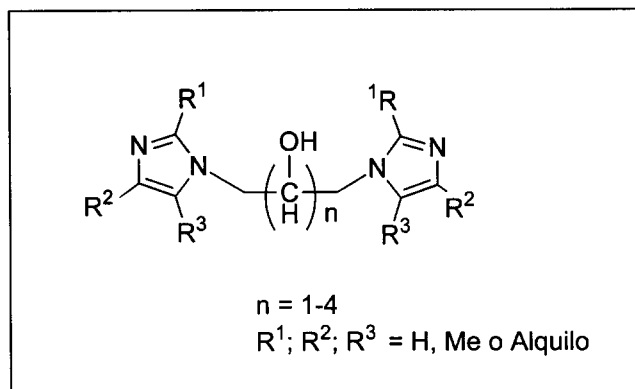


Toxicidad compuesto 3



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Formula General A



Formula A

Donde n puede variar de 1 a 4 y donde los radicales R_1 , R_2 y R_3 , pueden ser H o Alquilo que se pueden emplear como indicadores extrínsecos para la determinación de pH celular por espectroscopia e imagen de Resonancia Magnética.

2. El compuesto de la reivindicación 1 en donde n es 1.

3. El compuesto de la reivindicación 1 en donde n es 2.

4. El compuesto de la reivindicación 1 en donde n es 3.

5. El compuesto de la reivindicación 1 en donde n es 4.

6. Un procedimiento para la obtención del compuesto de Fórmula General A, de la reivindicación 1 que parte de los correspondientes alditoles e implica las etapas que se indican a continuación:

1ª. Protección selectiva de grupos OH primarios y secundarios;

2ª. Desprotección selectiva de grupos primarios y

3ª. Activación de los grupos OH primarios.

4ª. Los intermedios activados de los alditoles se hacen reaccionar con 4 equivalentes de imidazol en medio básico para obtener los correspondientes derivados de imidazol.

5ª. La desprotección final de los grupos OH secundarios conduce a los correspondientes 1,ω-diimidazol-1-ilpolioles deseados.

7. La utilización de los compuestos de la Reivindicación 1 en el diagnóstico clínico.

8. La utilización de los compuestos de la Reivindicación 1 como indicadores extrínsecos para la determinación de pH celular por espectroscopia e imagen de Resonancia Magnética.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 253 018

② Nº de solicitud: 200300936

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.04.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07D 403/06** (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SOMMERDIJK, N. A. J. M. et al. "Copper(II) Complexes of a Dicocephalic Imidazole Surfactant. Tunable Organization of Metalloaggregates". Langmuir, 1999, Volumen 15, páginas 7008-7013. Ver página 7008, compuesto 1.	1,2
X	US 3911133 A (EDWARDS, P. N.) 07.10.1975, compuesto II; columna 1, líneas 10-43.	1,2
A	ES 2172461 A1 (LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A.) 16.09.2002, todo el documento.	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
03.02.2006

Examinador
G. Esteban García

Página
1/1