



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 523**

51 Int. Cl.:
A61K 49/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96902106 .2**

86 Fecha de presentación : **16.01.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0806968**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.1997**

54 Título: **Agentes de contraste para el diagnóstico por imagen con retención de sangre prolongada.**

30 Prioridad: **01.02.1995 US 382317**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **EPIX Pharmaceuticals, Inc.**
4 Maguire Road
Lexington, Massachusetts 02421, US

72 Inventor/es: **McMurry, Thomas, J.;**
Sajiki, Hironao;
Scott, Daniel, M. y
Lauffer, Randall, B.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 274 523 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes de contraste para el diagnóstico por imagen con retención de sangre prolongada.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a agentes de contraste para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética. En particular, esta invención se refiere a nuevos compuestos que presentan mejor retención en la sangre. Los compuestos comprenden:

- 10 a) un grupo potenciador de imagen (o generador de señal) (IEM);
- b) un grupo de fijación a la proteína del plasma (PPBM); y
- 15 c) un grupo que prolonga la vida media en la sangre (BHEM). Esta invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a los métodos de utilización de los compuestos y composiciones para la prolongación de la vida media en la sangre y la mejora del contraste en diagnóstico por imagen.

20 **Antecedentes de la invención**

Las técnicas de diagnóstico por imagen, tales como por imagen de resonancia magnética (MRI), rayos X, por imagen radiofarmacéutica nuclear, luz ultravioleta/visible/infrarroja y ultrasonidos, se han utilizado en el diagnóstico médico durante muchos años. En algunos casos, la utilización de medios de contraste para mejorar la calidad de la imagen o para proporcionar información específica ha estado en curso durante muchos años. En otros casos, tal como en el diagnóstico por imagen con luz o ultrasonidos, la introducción del medio de contraste es inminente.

El agente de contraste debe interferir con la longitud de onda de la radiación electromagnética utilizada en la técnica de diagnóstico por imagen, aparte de las propiedades físicas del tejido para proporcionar una señal alterada, o, como en el caso de los productos radiofarmacéuticos, proporcionar la fuente de la propia radiación. Los materiales normalmente utilizados incluyen moléculas orgánicas, iones metálicos, sales o quelatos, partículas (especialmente partículas de hierro) o péptidos, proteínas, polímeros o liposomas marcados. Después de la administración, el agente puede que no se difunda específicamente a través de los compartimentos del cuerpo antes de ser metabolizado y/o excretado; estos agentes son conocidos generalmente como agentes no específicos. Alternativamente, el agente puede tener una actividad específica para un compartimento, célula, órgano o tejido del cuerpo determinado. Estos agentes pueden denominarse agentes dirigidos.

Para los agentes que se inyectan o se absorben en el cuerpo y se distribuyen en la sangre, es deseable que tengan una vida media apropiada en la sangre. Aunque las vidas medias muy largas (es decir, días o semanas) son innecesarias en situaciones clínicas de diagnóstico por imagen y posiblemente peligrosas (debido al aumento de la probabilidad de toxicidad y descomposición metabólica en moléculas más tóxicas), las vidas medias cortas tampoco son deseables. Si el aumento de diagnóstico por la imagen dura un periodo demasiado breve, es difícil adquirir una imagen de alta calidad del paciente. Además, la desaparición rápida del agente dirigido reducirá la cantidad de agente disponible para unirse al punto objetivo y de este modo reducir la "luminosidad" del punto diana en la imagen.

Aumentar la vida media en la sangre de un agente de diagnóstico por imagen implica interferir con uno o más de los siguientes mecanismos de depuración:

- 50 1) *Excreción renal*. Moléculas de peso molecular inferior a 60.000 dalton, especialmente moléculas pequeñas, pueden eliminarse en la sangre por filtración glomerular no específica en los riñones. Si las moléculas presentan algún grado de fijación a las proteínas de plasma u otros constituyentes en la sangre, solamente la fracción libre estará disponible para la filtración y por consiguiente se reducirá la tasa de excreción renal.
- 55 2) *Absorción hepatocelular*. Si una molécula posee carácter hidrófobo, alguna fracción del complejo es absorbida por las células del hígado y excretada en la bilis. En general, cuanto mayor es el grado de hidrofobia que posee una molécula, mayor es la tasa de absorción de hepatocitos. Aunque la hidrofobia también conduce a la fijación de las proteínas del plasma y a una reducción de la concentración libre aparente de la molécula, la tasa de absorción hepatocelular puede ser todavía muy elevada (D. Sorrentino *et al.*, *Prog. Liver Disease*, págs. 203-24 (1990)), reduciendo de este modo la vida media en la sangre. La reducción de la vida media en la sangre puede o no estar acompañada de un aumento en la excreción hepatobiliar total, es decir, la fracción de la dosis administrada que aparece finalmente en las heces. La cantidad última se determina por muchos factores aparte de la tasa de absorción hepatocelular, incluyendo el alcance de la fijación de la proteína citosólica dentro del hepatocito, la afinidad para los sistemas de transporte canalicular (hepatocitos a bilis), los efectos sobre el flujo de bilis y la recirculación enterohepática. La prolongación de la vida media en la sangre debe estar reflejada por un muestreo de sangre o de plasma, no simplemente midiendo las disminuciones en la excreción hepatobiliar total. Asimismo, obteniendo y midiendo simplemente la fijación significativa de la proteína del plasma de un agente de contraste contemplado no es suficiente para demostrar que su vida media en la sangre sea más prolongada debido a la excreción renal inferior.

- 3) *Sistemas reticuloendotelial (RE) u otros.* Las sustancias de peso molecular grande, tales como liposomas, polímeros, proteínas y partículas, pueden eliminarse fácilmente en la sangre por reconocimiento (p. ej., opsonización o recubrimiento con proteínas antes de la absorción celular) y en la médula ósea.

5 Se han descrito dos estrategias generales para aumentar la vida media en la sangre para agentes de diagnóstico por imagen. Una manera consiste en unir por enlace covalente el agente de diagnóstico por imagen mediante enlaces químicos fuertes o metabolizables a un polímero, proteína, liposoma o partícula de peso molecular grande. Por ejemplo, el ácido dietilentriamin-pentacético de gadolinio (Gd-DTPA) se ha unido a una albúmina de suero humano (HSA), poli-L-lisina o dextrano (A. N. Oksendal *et al.*, *J. Magn. Reson. Imaging*, 3, págs. 157-165 (1993); S. M. Rocklage, "Contrast Agents", *Magnetic Resonance Imaging*, Mosby Year Book, págs. 372-437 (1992)). Esto se hace para reducir la tasa de filtración glomerular en los riñones y mantener el agente en la sangre. Sin embargo, esto puede conducir a la retención a largo plazo del agente. Además, los agentes de diagnóstico por imagen unidos firmemente pueden liberar en potencia subproductos tóxicos tales como iones metálicos libres en los puntos de metabolismo para la macromolécula. Además, los conjugados grandes pueden ser difíciles de dirigir a puntos específicos en el cuerpo.

15 El segundo método ha sido aplicado a liposomas, polímeros, proteínas y partículas que normalmente son eliminados rápidamente de la circulación por el sistema RE o por otros medios. La colocación de polímeros hidrófilos largos, tales como polietilenglicol (PEG), en la superficie en la sustancia reduce la absorción por el RE u otros sistemas (C. Tilcock *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1148, págs. 77-84 (1993); A. A. Bogdanoy *et al.*, *Radiology*, 187, págs. 701-706 (1993)). Se supone que los grupos poliméricos grandes, muy hidratados interfieren con el proceso molecular requerido para el reconocimiento y absorción de las sustancias. Los inconvenientes de este método incluyen: a) coste elevado y procedimientos de preparación engorrosos; b) falta de capacidad de direccionamiento de los conjugados grandes; y c) la capacidad de aplicación parece estar limitada a las sustancias de peso molecular grande.

25 Existe un reto especial para las moléculas pequeñas dirigidas que poseen algún carácter lipófilo. Éstas pueden experimentar absorción hepatocelular y eliminación en la sangre rápidas, reduciendo posiblemente la "luminosidad" en el punto diana. Éste es un problema especial cuando se requiere lipofilia para conseguir dirigir las proteínas u otras dianas biológicas.

30 Un caso especial de este problema consiste en el desarrollo de agentes de molécula pequeña en mezcla de sangres. Los agentes no específicos de molécula pequeña actuales, tales como Gd-DTPA para MRI, presentan una desaparición relativamente rápida en la sangre y no son por lo tanto óptimos para el diagnóstico por imagen en los vasos sanguíneos (es decir, angiografía MR) o para controlar la circulación sanguínea en el corazón, cerebro, tumores u otros órganos o lesiones. Los agentes lipófilos que dirigen las proteínas del plasma son conocidos en la materia. Véase las patentes de Estados Unidos nº 4.880.008 y nº 5.250.285. Aunque estos agentes se unen a la proteína del plasma, en especial a la albúmina de suero humano, pueden también estar sometidos a absorción hepatocelular rápida y vida media en la sangre reducida.

40 Continúa habiendo necesidad de agentes de contraste que se conserven en la sangre durante un periodo de tiempo prolongado.

M. Rowland y T. N. Tozer, *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Application*, 1980, LEA & FEBIGER, Filadelfia, U.S., págs. 65-74 describe la relación entre la fijación de la proteína del plasma y la eliminación de un compuesto. P. C. de Smidt *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 11 de septiembre de 1991, vol. 19, nº 17, págs. 4675-700 describe los modos de prolongar la vida media de un compuesto en la sangre.

Compendio de la invención

50 La presente invención proporciona agentes de contraste para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética que presentan mejor retención en la sangre. Los nuevos compuestos comprenden:

- a) un grupo potenciador de imagen (o generador de señal) (IEM);
- b) un grupo de fijación a la proteína del plasma (PPBM); y
- 55 c) un grupo que prolonga la vida media en la sangre (BHEM).

60 Esta invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a la utilización de los compuestos para el diagnóstico por RM y a las composiciones para la prolongación de la vida media en la sangre y la mejora del contraste en diagnóstico por imagen.

65 Estos agentes de contraste presentan velocidades reducidas tanto de absorción renal como hepatocelular y absorción no aparente por el sistema RE. Los agentes pueden dirigirse a la mezcla de sangre o a cualquier otro componente biológico. Ya que el agente se pierde menos rápidamente en el torrente sanguíneo, pueden utilizarse dosis menores con un margen mayor de seguridad. El método es general tanto para moléculas grandes como pequeñas.

Descripción detallada de la invención

Para que la invención descrita en la presente memoria pueda entenderse con más detalle, se publica la descripción detallada siguiente.

La expresión “afinidad específica” o “afinidad molecular” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la capacidad del agente de contraste para ser absorbido o retenido por un componente biológico determinado o unirse al mismo en un grado sustancialmente mayor que otros componentes. Los agentes de contraste que presentan esta propiedad se dice que “se dirigen” al componente “diana”.

La presente invención proporciona se refiere a nuevos compuestos que mejoran el contraste en el diagnóstico por imagen. Estos compuestos comprenden:

- a) un grupo potenciador de imagen (o generador de señal) (IEM);
- b) un grupo de fijación a la proteína del plasma (PPBM); y
- c) un grupo que prolonga la vida media en la sangre (BHEM).

El diagnóstico por imagen incluye, pero no se limita a, MRI, rayos X, diagnóstico por imagen radiofarmacéutica nuclear, luz ultravioleta/visible/infrarroja y ultrasonidos.

Grupo potenciador de diagnóstico por imagen (“IEM”)

Según la presente invención, el primer dominio, IEM, puede ser cualquier producto químico o sustancia que se utilice para proporcionar la señal o contraste en el diagnóstico por imagen.

El dominio de potenciación en la señal puede ser una molécula orgánica, un ión metálico, una sal o quelato, una partícula (especialmente una partícula de hierro) o un péptido, proteína, polímero o liposoma marcados.

Un IEM especialmente útil es un compuesto de quelato metálico fisiológicamente compatible que está constituido por uno o más agentes quelantes orgánicos cíclicos o acíclicos acomplejados con uno o más iones metálicos con números atómicos 21 a 29, 42, 44 o 57 a 83.

Para MRI, el IEM está constituido por un complejo metal-ligando de una forma paramagnética de un ión metálico con números atómicos 21 a 29, 42, 44 o 57 a 83.

Para aumentar de manera eficaz el diagnóstico por imagen de RMN, el complejo debe ser capaz de potenciar las tasas de relajación $1/T_1$ (longitudinal o spin-retículo) y/o $1/T_2$ (transversal o spin-spin) de los protones del agua o de otros núcleos para diagnóstico por imagen o espectroscópico, incluyendo protones, P-31, C-13, Na-23 o F-19 en otras biomoléculas o biomarcadores inyectados. Las capacidades de relajación R_1 y R_2 se definen como la capacidad para aumentar $1/T_1$ o $1/T_2$, respectivamente, por mM de ión metálico; las unidades son $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Para la forma más corriente de MRI clínica, la MRI de protón de agua, la capacidad de relajación es óptima cuando el ión paramagnético unido al ligando del quelante todavía tiene uno o más puntos de coordinación abiertos para el intercambio de agua (R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 87, págs. 901-927 (1987)). Sin embargo, esto puede equilibrarse con la estabilidad del quelato metálico (véase más adelante) que generalmente disminuye con el aumento de las cifras de los puntos de coordinación abiertos. Más preferentemente, por consiguiente, el complejo contiene solamente uno o dos puntos de coordinación abiertos.

Además de aumentar la $1/T_1$ o $1/T_2$ de los núcleos del tejido mediante interacciones dipolo-dipolo, los agentes de MRI pueden afectar a otras dos propiedades magnéticas y por lo tanto ser de utilidad desde el punto de vista clínico:

- 1) una partícula de hierro o quelato metálico de gran susceptibilidad magnética, particularmente los quelatos de Dy, Gd o Ho, puede alterar la intensidad en la señal de MRI del tejido creando gradientes de susceptibilidad magnética microscópica (A. Villringer *et al.*, *Magn. Reson. Med.* 6, págs. 164-174 (1988)). Para esta aplicación no se requieren puntos de coordinación abiertos en un quelato.
- 2) una partícula de hierro o quelato metálico puede también utilizarse para desplazar la frecuencia de resonancia de los protones del agua u otros núcleos de diagnóstico por imagen o espectroscópicos, incluyendo protones, P-31, C-13, Na-23 o F-19 en otras biomoléculas o biomarcadores inyectados. Dependiendo del núcleo y de la estrategia utilizados, pueden emplearse de cero a tres puntos de coordinación abiertos.

El metal paramagnético preferido se selecciona del grupo constituido por Gd (III), Fe (III), Mn (II y III), Cr (III), Cu (II), Dy (III), Tb (III), Ho (III), Er (III) y Eu (III). El más preferido es Gd (III).

Aunque el metal paramagnético se utiliza en forma acomplejada, los efectos tóxicos pueden aumentar todavía debido a la disociación del ión metálico del complejo. El ligando orgánico quelante debería ser fisiológicamente compatible. El tamaño molecular del ligando quelante debería ser compatible con el tamaño del metal paramagnético.

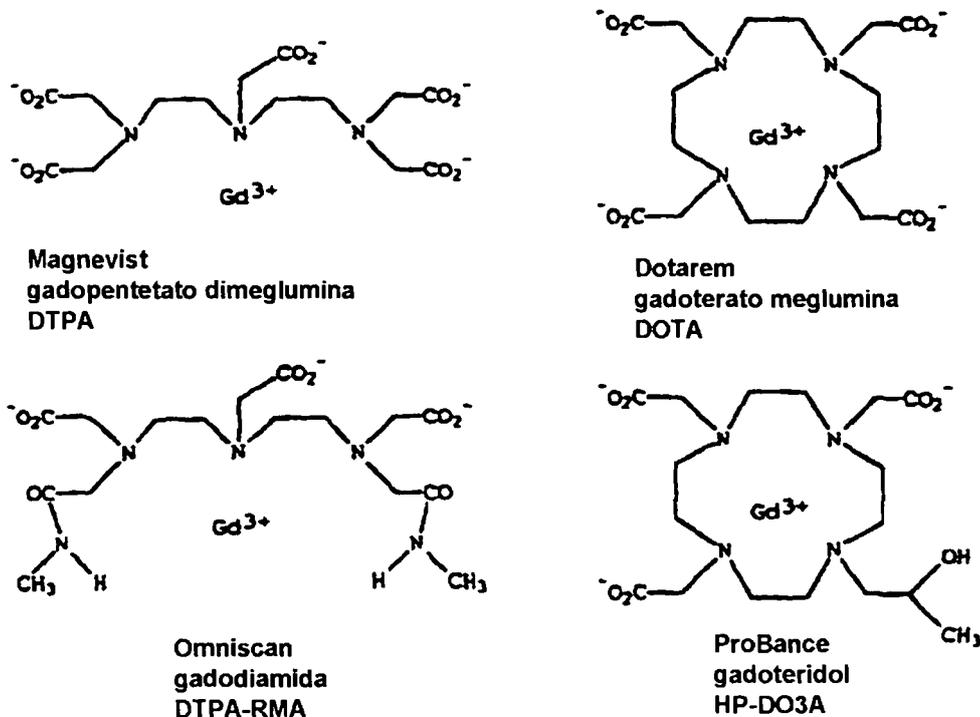
ES 2 274 523 T3

De este modo el gadolinio (III), que tiene un radio iónico cristalino de $0,938 \times 10^{-10}$ m ($0,938 \text{ \AA}$), requiere un ligando quelante mayor que el hierro (III), que tiene un radio iónico cristalino de $0,64 \times 10^{-10}$ m ($0,64 \text{ \AA}$).

En general, el grado de toxicidad de un quelato metálico está relacionado con su grado de disociación *in vivo* antes de la excreción. La toxicidad generalmente aumenta con la cantidad de ión metálico libre. Para los complejos en los que la estabilidad cinética es baja, es deseable una estabilidad termodinámica elevada (una formación constante de al menos 10^{15} M^{-1} (y más preferentemente al menos 10^{20} M^{-1}) para minimizar la disociación y su toxicidad acompañante. Para los complejos en los que la estabilidad cinética es comparativamente mayor, la disociación puede minimizarse con una formación constante menor, es decir, 10^{10} M^{-1} o mayor.

La toxicidad es también función del número de puntos de coordinación abiertos en el complejo. Cuantos menos puntos de coordinación, menos tendencia existe, generalmente, para que el agente quelante libere la sustancia paramagnética. Preferentemente, por consiguiente, el complejo contiene dos, uno o cero puntos de coordinación abiertos. La presencia de más de dos puntos abiertos en general aumentará de forma inaceptable la toxicidad por liberación del ión metálico *in vivo*.

Muchos ligandos quelantes adecuados para los agentes de MRI son conocidos en la materia. Pueden también ser utilizados por los quelatos metálicos para otras formas de pronóstico por imagen biológico. Para el pronóstico por imagen por MRI, los IEM preferidos incluyen:



Grupo de fijación de la proteína del plasma ("PPBM")

Según la presente invención, el segundo componente de los agentes de contrastes de esta invención es un PPBM. Este fragmento del compuesto une el agente de contraste a las proteínas del plasma y reduce la tasa de excreción renal.

Las proteínas del plasma de interés incluyen la albúmina, particularmente la albúmina del suero humano (HSA), que es una molécula que posee algunos fragmentos lipófilos y cargas negativas a pH fisiológico o átomos de oxígeno o azufre o flúor cargados en parte negativamente; glucoproteína alfa ácida, que es principalmente moléculas cargadas positivamente. Globulinas, que son moléculas esteroideas; y lipoproteínas, que son moléculas lipófilas o del tipo de ácido graso. El PPBM por consiguiente debe seleccionarse de manera apropiada para conseguir la fijación a la proteína apropiada. Como la HSA está presente a la concentración más alta en el suero y tiene gran afinidad y capacidad para unir una gama amplia de moléculas, es la proteína preferida del plasma que debe utilizarse para aumentar las vidas medias en la sangre. HSA es también la proteína diana preferida del plasma porque une a moléculas cargadas negativamente que tienden a ser menos tóxicas que las moléculas cargadas positivamente.

Para la fijación a HSA, puede ser útil una amplia gama de sustancias hidrófobas o anfífilas como el PPBM (U. Kragh-Hansen, *Pharm. Rev.*, 33, págs. 17-53 (1981); X. M. He *et al.*, *Nature*, 358, págs. 209-215 (1992); D. C. Carter, *Adv. Protein Chem.*, 45, págs. 153-203 (1994)). Éstas incluyen grupos alifáticos o arílicos con 1 a 60 átomos de carbono así como cualquier número de átomos de nitrógeno, oxígeno, azufre, halógenos, grupos alquilo,

ES 2 274 523 T3

amidas, ésteres y sulfonamidas sustituyentes. Alternativamente, el PPBM puede ser un péptido que contenga restos de aminoácidos hidrófobos y/o sustituyentes con o sin grupos con terminación hidrófoba o hidrófila. Para obtener el 10% de fijación en el plasma, el PPBM preferido posee al menos 7 átomos de carbonos, más preferentemente 13 y aun más preferentemente 18 átomos de carbono.

Como se indicó anteriormente, para la fijación al HSA, puede ser útil una amplia gama de sustancias hidrófobas como el PPBM. En general, la afinidad de fijación a HSA y posiblemente a otras proteínas aumentará con la hidrofobia del PPBM. Las estimaciones teóricas de la hidrofobia de un sustituyente tal como un PPBM pueden obtenerse calculando la contribución al log del coeficiente de reparto (log P) del octanol-agua (o tampón de octanol) para el propio PPBM utilizando la constante π de Hansch para sustituyentes. Véase A. Leo y C. Hansch, "Partition Coefficients and their Uses", *Chemical Reviews*, 71, págs. 525-616 (1971); K. C. Chu, "The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships", *Burger's Medicinal Chemistry*, parte 1, págs. 393-418 (4ª edición 1980). La afinidad de fijación aumentará con el aumento de las contribuciones de log P. Por ejemplo, para los sustituyentes en grupos alifáticos, pueden utilizarse las constantes π siguientes:

Grupo	π -alifático
CH ₃	0,50
Fenilo	2,15

Para los sustituyentes en los grupos arilo, pueden utilizarse las constantes π siguientes:

Grupo	π -alifático
CH ₃	0,56
CH ₂ CH ₃	1,02
Fenilo	1,96

Así pues, la contribución de log P a un grupo p-metilbencilo acoplado a un IEM se calcularía de la forma siguiente (utilizando el valor del π -alifático para CH₃ como una estimación para el grupo -CH₂-):

$$\text{contribución del log P} = 0,50 + 2,15 + 0,56 = 3,21$$

En el enlace a HSA, se requiere una contribución mínima al log P de 2 (equivalente a 4 grupos CH₃ o un anillo fenilo) para conseguir la fijación significativa. Es más preferida una contribución a log P de 3. Aun más preferida es una contribución a log P de 4.

La fijación a HSA puede evaluarse por diálisis en equilibrio o ultrafiltración utilizando 4,5% peso/volumen de HSA en un tampón de pH 7,4. Preferentemente al menos el 10%, y más preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 80%, y lo más preferentemente al menos el 95% del agente de contraste está unido a HSA a unas concentraciones fisiológicas relevantes (0,01-10 mM en el plasma para MRI, rayos X, luz y ultrasonidos; < 1 μ M para productos radiofarmacéuticos). En esta aplicación, la medición del porcentaje de fijación del agente de contraste a HSA presenta un error de aproximadamente $\pm 5\%$. La fijación de la proteína a otras proteínas o al suero puede evaluarse de modo similar.

La adición de grupos lipófilos a un agente de contraste es probable que disminuya la solubilidad del agente. Para conservar la solubilidad eficaz del agente de contraste a concentraciones de dosis clínicamente eficaces o mayores, puede preferirse a incorporar uno o más grupos de fijación al hidrógeno (oxígeno, nitrógenos, etc.) al PPBM.

Aunque pueden utilizarse grupos puramente alifáticos tales como los PPBM, éstos pueden no ser tan preferidos como los grupos alifático-arilo mixtos o los grupos puramente arílicos.

Especialmente cuando se une una carga negativa a grupos puramente alifáticos, en particular los largos y flexibles, el agente de contraste puede interferir con el metabolismo de moléculas endógenas tales como ácidos grasos o las interacciones entre las proteínas de la membrana y los lípidos. Esto puede aumentar la toxicidad del agente. Por lo tanto, se prefiere que el PPBM contenga al menos un anillo arilo.

En el caso de los agentes de MRI ligados a HSA para potenciación de mezcla de sangre, tumor o tejido, es especialmente preferible que el agente de contraste contenga dos o más grupos lipófilos distintos para inmovilizar completamente el agente cuando se fija a la proteína. Estos agentes pueden estar en un PPBM, o como dos o más grupos químicos separados unidos al agente de contraste. Debido a su voluminosidad y rigidez naturales, es preferible que los dos o más grupos consistentes en un anillo aromático, con los dos o más anillos en la molécula completa se dispongan en una orientación rígida, no plana.

ES 2 274 523 T3

La eficacia magnética, o capacidad de relajación, de un agente MRI es generalmente máxima cuando el agente tiene un periodo de correlación rotativo aproximadamente igual al de la HSA (R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 87, págs. 901-927 (1987)). Aunque una molécula pequeña tal como Gd-DTPA tiene un periodo de correlación rotativo de aproximadamente 0,1 nanosegundos (ns), HSA tiene un periodo de correlación mayor de 5 a 10 ns; si un quelato tiene este periodo de correlación mayor, las fluctuaciones magnéticas entre el ión paramagnético y los protones del agua se producen en la misma escala de tiempo que la frecuencia Larmor, generando la relajación (T_1) longitudinal más eficaz posible y por lo tanto la capacidad de relajación mayor posible. Cualquier flexibilidad del quelato cuando se fija a la proteína es de esperar que disminuya el periodo de correlación rotativa eficaz y por lo tanto disminuya la capacidad de relajación. Dado que un punto de unión para la proteína puede todavía proporcionar flexibilidad en varias direcciones, pueden ser preferibles puntos de unión adicionales.

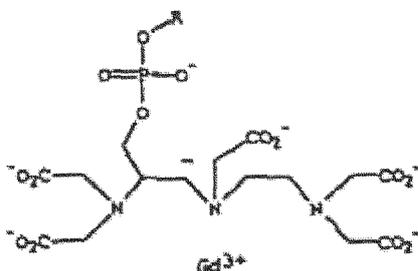
El grado en el que un agente ha sido modulado para la máxima capacidad de relajación puede evaluarse midiendo el enlace con capacidad de relajación (enlace con R_1) en presencia de HSA. Esto requiere medir la capacidad de relajación del quelato libre (R_1 -libre) así como la capacidad de relajación (R_1 -observada) y la fijación por ciento del agente en HSA al 4,5%. La R_1 observada es una media ponderada de la fracción molar de R_1 libre y R_1 ligada:

$$R_1 \text{ observada} = (\text{fracción libre} \times R_1 \text{ libre}) + (\text{fracción ligada} \times R_1 \text{ ligado})$$

Por lo tanto:

$$R_1 \text{ ligada} = \frac{[R_1 \text{ observada} - (\text{fracción libre} \times R_1 \text{ libre})]}{\text{fracción ligada}}$$

La utilidad de tener dos o más anillos arilo mantenidos de manera rígida, no plana puede observarse en la tabla siguiente que presenta valores de capacidad de relajación ligada para MS-322 ($56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) y MS-325 ($42 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) frente a MS-317 ($34 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Los grupos bifenilo o difenilo de MS-322 y MS-325 parece ser que restringen la movilidad del agente de contraste de HSA ligado. En esta aplicación, el error asociado a la medición de los valores de la capacidad de relajación ligada es aproximadamente de $\pm 5\%$.



	R	R_1 -ligada, $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
MS-317		34
MS-322		56
MS-325		42

Como puede apreciarse en la tabla anterior, los compuestos que tienen dos anillos mantenidos en forma rígida en una orientación no plana tenían valores de capacidad de relajación ligada mayores.

Como puede apreciarse en las ecuaciones anteriores, la R_1 observada real puede aumentarse incrementando la fracción de enlace, esto es, incrementando la afinidad de fijación del agente a HSA. Esto puede conducir también a excreción renal menor y vidas medias en la sangre mayores y es por lo tanto sinérgica. No obstante, a fin de utilizar la dosis menor y tener un margen máximo de seguridad, es importante todavía maximizar la potencia del agente maximizando el R_1 ligado.

Grupo de prolongación de la vida media en la sangre ("BHEM")

El tercer dominio de los agentes de contraste de esta invención, el BHEM, reduce la tasa de absorción de hepatocitos del agente de contraste. El equilibrio de hidrofilia y de lipofilia y la estructura molecular exacta de una molécula determinan su tasa de absorción de hepatocitos.

En los agentes de contrastes de esta invención, los BHEM de esta invención reducen o eliminan la absorción de hepatocitos sin interferir de manera indebida con la eficacia del PPBM. Los BHEM son grupos sumamente hidrófilos que pueden unirse por enlace de hidrógeno con el agua. La presencia en un agente de contraste del BHEM hidrófilo reduce la absorción de hepatocitos del agente.

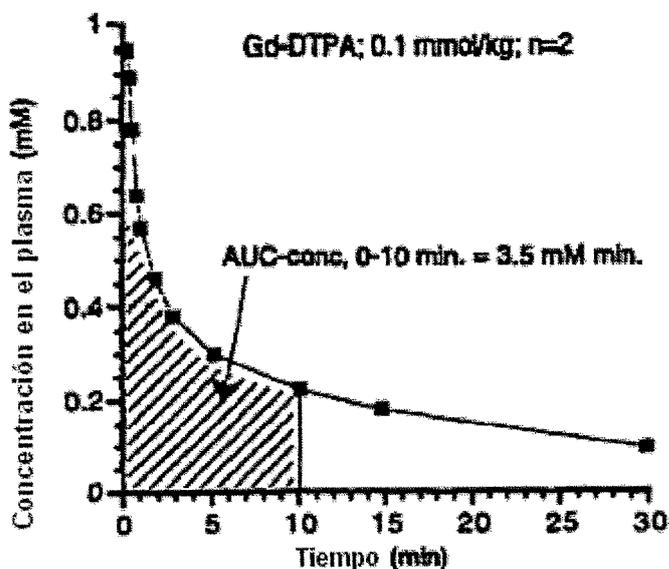
Ejemplos de grupos químicos que servirían como un BHEM incluyen los átomos de carbono, fósforo, tungsteno, molibdeno o azufre con cargas acopladas o heteroátomos neutros tales como los átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos (especialmente el flúor) que poseen dos o más pares de electrones solos (es decir, cargas negativas totales o parciales) o átomos de hidrógeno electropositivo (es decir, amina protonada) para el enlace del hidrógeno con el agua. Éstos incluyen grupos tales como sulfona, éter, urea, tiourea, amina sulfonamida, carbamato, péptido, éster, carbonato y acetales. Los grupos preferidos incluyen los que poseen una o más cargas negativas parciales o totales en solución acuosa a pH fisiológico en las que los átomos con carga negativa no pueden estar parcial o totalmente neutralizados por enlace covalente o covalente coordinado al IEM. Ejemplos de estos BHEM preferidos incluyen los grupos con carga negativa tales como monoéster de fosfato, diéster de fosfato, carboxilato y sulfonato. Más preferidos son aquellos que tienen grupos fosfato o algunas formas éster de los mismos. Aun más preferidos son los diésteres de fosfato, ya que: a) son muy hidrófilos con cuatro oxígenos unidos por enlace de hidrógeno; b) se sintetizan con relativa facilidad utilizando técnicas mostradas a continuación; c) sirven como excelentes enlazadores entre el IEM y el PPBM; y d) debido a que existen compuestos de fosfato y son metabolizados de forma natural en el cuerpo, los agentes de contraste que contienen diéster de fosfato es de esperar que no sean tóxicos.

Todos los grupos anteriores pueden a su vez unirse a un grupo enlazador que les enlaza al IEM, PPBM o a ambos. Un grupo enlazador es cualquier grupo químico fisiológicamente compatible que no interfiera con las funciones del IEM, PPBM o BHEM. Los enlazadores preferidos son sintéticamente fáciles de incorporar a un agente de contraste. No son tampoco indebidamente tan grandes como para que manifiesten su propia función biológica no deseada de dirigir la influencia sobre el agente de contraste. Preferentemente, la longitud del enlazador está comprendida entre 0,1 y 5 nm (1 y 50 angstroms), más preferentemente 0,1 y 1 nm (y 10 angstroms).

La incorporación en un agente de contraste de esta invención de un BHEM produce la retención de sangre prolongada del agente. La retención de sangre se mide preferentemente calculando, en un experimento farmacocinético de plasma de rata, el área bajo la concentración de plasma frente a la curva de tiempo ("Área bajo la curva" o "AUC-conc.") para una longitud específica de tiempo (p. ej., 0 a 10 minutos, 0 a 30 min., 0 a 60 min., 0 a 120 min. o 0 a infinito). La retención de sangre (medida por AUC-conc.) puede evaluarse experimentalmente mediante la administración de un agente de contraste a ratas, conejos o animales superiores. Se ha observado que la prolongación de la vida media en la sangre es mayor en conejos y en mamíferos superiores que en ratas. En esta aplicación, los datos de la vida media en la sangre, medidos por AUC-conc., representan la experimentación en ratas. El error asociado a estos datos es aproximadamente de $\pm 10\%$.

La razón de que la propia medición de vida media no se utilice es que la definición matemática de esta cantidad no está clara con frecuencia y las estimaciones resultantes son variables dependiendo del modelo farmacocinético utilizado y del tiempo transcurrido desde que se obtuvieron las muestras de sangre.

Por ejemplo, las concentraciones de plasma medias observadas tras la inyección en la vena de la cola de 0,1 mmol/kg de Gd-DTPA marcado con Gd^{153} en dos ratas se presentan a continuación. Utilizando el programa KaleidaGraph de Macintosh, esta AUC-conc. de 0 a 10 minutos se calculó como 3,5 mM min.



Los agentes de contraste de esta invención presentan un aumento de AUC-conc. de al menos el 20% cuando el BHEM se añade al IEM y PPBM. Preferentemente presentan un aumento de AUC-conc de al menos el 40%, más preferentemente de al menos el 70% y aun más preferentemente de al menos el 100%. En general, el aumento de AUC-conc, producido por un BHEM es mayor cuando la fijación en el plasma es significativa, p. ej., 20% a 50% o mayor. El aumento del porcentaje calculado de AUC-conc puede ser diferente para las AUC-conc determinadas en diferentes periodos de tiempo. Generalmente, el aumento de porcentaje AUC-conc, producido por el BHEM es mayor para las AUC-conc tomadas durante periodos más prolongados, p. ej. de 0 a 30 min., en lugar de 0 a 10 min.

Dado que la estructura y las características físicas de la molécula completa de agente de contraste pueden gobernar su fijación en el plasma, es importante seleccionar los IEM y los BHEM que son compatibles con el enlace deseado. Por ejemplo, para conseguir la fijación a los puntos de fijación con carga positiva en HSA, es preferible tener los IEM y los BHEM de carga neutra neta o negativa neutra para reducir la posibilidad de repulsión y quizás incluso aumentar la afinidad de enlace. Para el enlace a la alfa glucoproteína ácida, al menos una parte del agente de contraste debería estar cargado positivamente. Para el enlace a las globulinas, al menos alguna parte del agente de contraste debería ser de naturaleza esteroidea. Para el enlace a las lipoproteínas, al menos alguna parte del agente de contraste debería ser lipófila o similar a ácidos grasos.

Los agentes de contraste de la presente invención están comprendidos generalmente en tres categorías:

- 1) *Agentes para mezcla de sangre.* Cuando la afinidad del enlace a las proteínas del plasma es grande (es decir, más del 50% unidas, o preferentemente más del 80% unidas, o más preferentemente más del 95% unidas), los agentes tienden a actuar principalmente como agentes para mezcla de sangre. Aunque los agentes pueden acceder al espacio intersticial (espacio extracelular entre las células) fuera de los capilares sanguíneos, generalmente la concentración de proteínas relevantes del plasma tal como HSA son menores en este espacio en comparación con el plasma. Por lo tanto, la concentración en el plasma de los agentes es mayor que la concentración intersticial, y por consiguiente las estructuras en el cuerpo vitales tales como los vasos sanguíneos o los tejidos que contienen una gran cantidad de vasos sanguíneos están más aumentadas que las estructuras con bajo contenido sanguíneo. Las aplicaciones para este tipo de agente incluyen la angiografía (diagnóstico por imagen de vasos sanguíneos), perfusión (determinación de la velocidad de la circulación sanguínea en un tejido o tumor utilizando diagnóstico por imagen rápido), y determinaciones del volumen de sangre (p. ej., para distinguir tumores malignos con aporte de sangre buena de tumores benignos con un volumen de sangre menor).
- 2) *Agentes para mejora del tejido o del tumor.* En algunos casos se desea permitir que el agente de contraste acceda rápidamente al espacio intersticial y se una ahí a las proteínas del plasma. Por ejemplo, en MRI puede ser deseable obtener el máximo aumento posible de un tejido o tumor tan pronto como sea posible después de la inyección. Ya que los agentes de MRI unidos a la proteína proporcionan mayor aumento que los agentes libres, el mejor agente sería aquel que pueda introducirse en el espacio intersticial y unirse a las proteínas. Sin embargo, si el agente está muy unido en el plasma, es decir está más del 95% unido, su velocidad de transferencia a través de los capilares (determinada por la concentración libre) es demasiado

baja, y muy pocos agentes se introducen en el espacio intersticial y producen el aumento en la señal del tejido. Asimismo, si el enlace es solamente del 10%, entonces el agente es libre de introducirse en el espacio intersticial pero tiene poco poder para aumentar la señal. Por lo tanto, se requiere un equilibrio apropiado de la velocidad de transferencia y de la afinidad del enlace. Para estas aplicaciones, la fijación de los agentes en el plasma debería ser mayor el 10% y menor del 95%, o preferentemente mayor del 50% y menor del 95%.

Este método es especialmente útil en el diagnóstico por imagen del tumor con MRI. Los tumores malignos con frecuencia tienen mejor circulación en la sangre que los tumores benignos, y por lo tanto el diagnóstico por imagen rápido del tumor y la absorción (intersticial) pueden distinguir con frecuencia estos tipos de tumor. Sin embargo, para la aplicación clínica, se necesita la máxima diferencia de señal entre los dos tejidos para permitir la discriminación más clara. El aumento de señal mediante el enlace de la proteína ayudará a este respecto. Además, los nuevos capilares que se desarrollan rápidamente de los tumores malignos son permeables, lo que conduce a una concentración mayor de proteínas del plasma en el espacio intersticial de estos tumores. Esto puede conducir a un mayor aumento en la señal en los tumores malignos en comparación con los tumores benignos con menos capilares permeables.

- 3) *Agentes dirigidos.* Cuando el agente se dirige a un tejido o lesión específicos en el cuerpo, se aplica una lógica similar a la descrita en los dos párrafos anteriores. Las afinidades relativas del agente para las proteínas del plasma y la zona objetivo necesitan estar equilibradas de modo que el agente tenga algún acceso a unirse al objetivo y al mismo tiempo tenga algún enlace con las proteínas del plasma para aumentar la vida media en la sangre. Para las aplicaciones dirigidas, el enlace de los agentes en el plasma debería ser mayor del 10% y menor del 95%, o preferentemente mayor del 50% y menor del 95%.

El grupo de direccionamiento puede ser una sustancia lipófila, un ligando receptor, un anticuerpo u otra biomolécula que se conoce al concentrarse en el componente biológico específico deseado que debe ser diagnosticado por imagen.

Colocación estructural

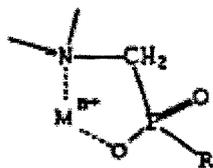
Se contempla que los tres grupos de agentes de contrastes de esta invención puedan ordenarse en varias posiciones con respecto una a la otra. Sin embargo, la posición de los grupos puede no ser de modo que un grupo interfiera con la función deseada del otro. Por ejemplo, en un agente de contraste con enlace a HSA la colocación del BHEM no debería bloquear la capacidad del PPBM para unir el agente a HSA. Dado que las zonas de enlace mayores en HSA son similares a un calcetín (X. M. He *et al.*, *Nature*, 358, págs. 209-215 (1992); D. C. Carter, *Adv. Protein Chem.*, 45, págs. 153-203 (1994)), con interiores hidrófobos (especialmente cerca de la zona de la "puntera") y zonas del "tobillo" con carga positiva, la afinidad de enlace de un PPBM disminuiría si la parte distal del PPBM se hace sumamente hidrófila. Como ejemplo ilustrativo, si el PPBM es un anillo fenilo, la posición de BHEM más preferida del anillo es la orto, seguido de la meta. Un grupo hidrófilo en posición para reduciría la afinidad de unión de PPBM a HSA.

Para los IEM que consisten en un quelato metálico, es preferible que los BHEM y los PPBM no estén unidos al IEM de modo que reduzcan de manera significativa la fuerza del enlace entre el ión metálico y el ligando quelante. Por ejemplo, cuando la rama quelante sea acetato, el BHEM o el PPBM no está unido preferentemente al oxígeno del acetato.

Otro requisito de posición es que los átomos de BHEM con carga negativa no pueden estar parcial o totalmente neutralizados por enlace covalente o covalente coordinado al IEM; esto asegura que en los sistemas acuosos los átomos muy hidrófilos del BHEM estén muy solvatados. Por ejemplo, cuando el IEM es un quelato metálico, es importante colocar los átomos con carga negativa del BHEM de modo que no puedan llegar a ser neutralizados por el ión metálico con carga positiva (M^{n+}) del IEM por el enlace covalente coordinado mediante la formación de anillos de quelato de 5 o 6 elementos, dimensiones de anillo más estables. Como los anillos de quelato de 5 elementos son los más estables para los iones metálicos de interés para los IEM (tal como gadolinio), lo más importante es evitar su formación. Por lo tanto, como se muestra en el dibujo a continuación, un BHEM con un fosfinato ($-PO_2^-$) o fosfonato ($-PO_3^-$) no puede unirse al átomo de nitrógeno de un agente quelante aminocarboxilato mediante un enlazador $-CH_2-$ ya que éste formará un anillo quelato de 5 elementos muy estable. Asimismo, un BHEM con fosfodiéster ($-OPO_3^-$) no debería estar unido al átomo de nitrógeno de un agente quelante aminocarboxilato mediante un enlazador $-CH_2-$ ya que este podría formar un anillo quelante de 6 elementos. Sin embargo, ambos BHEM pueden estar unidos en otras posiciones, tales como el eje central de etileno del ligando. En algunos casos, como se muestra, puede preferirse aumentar la longitud del grupo enlazador para hacer que no puedan formarse determinados anillos de 5 o 6 elementos.

BHEM con fosfinato

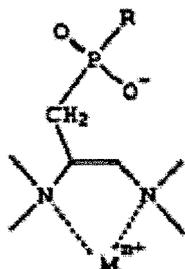
5



Muy desfavorecido
(anillo de quelato de 5 elementos,
carga neutralizada)

10

15

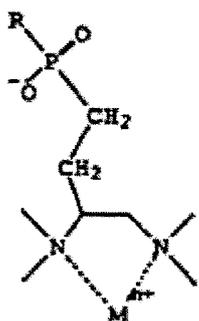


Desfavorecida
(anillo de quelato de 6 elementos,
carga neutralizada)

20

25

30



Más preferida
(ninguna posibilidad de anillos
de quelato de 5 o 6 elementos o
de neutralización de cargas)

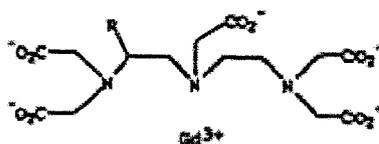
35

40

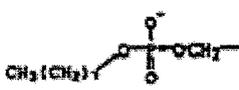
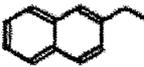
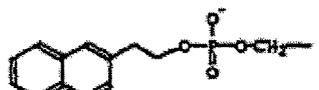
En el caso de un agente de contraste con enlace a HSA, el BHEM puede estar colocado entre el IEM y el PPBM como se muestra anteriormente en la estructura (1) o en el IEM lejos del PPBM como se muestra anteriormente en la estructura (3). De esta manera el potencial total de enlace del grupo PPBM hidrófobo puede expresarse sin interferencia del grupo BHEM hidrófilo.

Los dos pares de ejemplos siguientes sirven para mostrar la utilidad de un BHEM con fosfato insertado entre el Gd-DTPA del IEM y dos PPBM diferentes, un grupo octil C₈ alifático y un grupo naftilmetilo. Se inyectó a ratas por vía intravenosa (vena de la cola) con 0,1 mmoles/kg de complejos radiomarcados con Gd¹⁵³. Se determinaron las concentraciones en el plasma durante 30 minutos y se ajustaron a un modelo de dos compartimentos biexponencial normalizado. Se presentan los resultados de la eliminación de la vida media así como el área bajo la concentración en el plasma frente a la curva de tiempo (AUC-conc.) durante los primeros 10 minutos. Además, se registraron las 1/T₁ de las muestras de plasma (a 20 MHz, 37 grados C) para evaluar la eficacia como agentes de MRI. Estos valores se expresaron como área bajo el 1/T₁ frente a la curva de tiempo (AUC-1/T₁) durante los primeros 10 minutos.

60



65

Comp.	R	% unido a HSA	t _{1/2} , min	AUC-conc mM* min	AUC-1/T ₁ s ⁻¹ * min
DTPA	N	0	15,0	3,5	27
MS-301	CH ₃ (CH ₂) ₇	44	6,2	2,7	59
MS-315		56	14,0	3,4	87
MS-310		30	6,8	1,8	29
MS-321		40	14,0	3,2	54

5

10

15

20

25 Como se presenta en la tabla anterior, la adición de un BHEM con fosfato a MS-301 y MS-310 (que da como resultado MS-315 y MS-321, respectivamente), aumentó la vida media en la sangre de un agente de contraste (medido por AUC-conc.) en el 26% y el 78%, respectivamente.

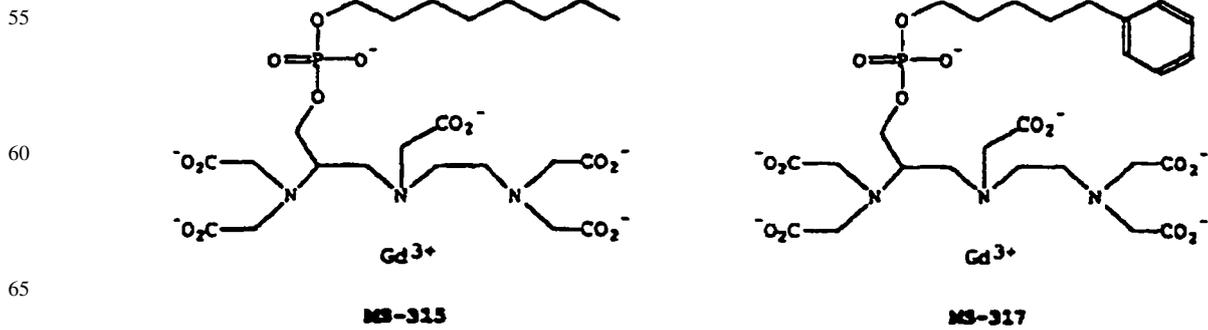
30 El Gd-DTPA de IEM es relativamente hidrófilo y presenta poco o ningún enlace a HSA. Por lo tanto, su capacidad de relajación en el plasma no está optimizada y su capacidad para alterar el 1/T₁ (y la señal en la sangre en MRI) a lo largo del tiempo está limitada (véase el valor AUC-1/T₁ relativamente bajo). Esto es a pesar de su vida media relativamente larga en la sangre de 15 minutos.

35 Para mejorar el enlace de HSA y la capacidad de relajación, puede colocarse un grupo octilo C₈ en la posición 1 del eje central de DTPA. Aunque esto comunica el enlace de HSA al quelato y alguna mejora en la señal en la sangre, el grupo lipófilo solo conduce a una vida media muy corta en el plasma. La inserción del BHEM a base de fosfato *aumenta* de hecho el enlace del HSA y restablece la vida media en el plasma a un valor próximo al de Gd-DTPA. Como resultado, la señal en la sangre se mejora de forma considerable.

40 La colocación apropiada del BHEM en estos ejemplos muestra la importancia de este aspecto de la invención. La adición de grupos marcadamente hidrófilos a MS-301 o MS-310 *intensificó* el enlace en algún grado. La colocación de grupos fosfato en MS-315 y MS-321 entre el IEM y el PPBM puede permitir que la superficie hidrófoba total de los PPBM interactúe con el interior de las zonas de HSA y al mismo tiempo cree nuevas interacciones útiles (p. ej., enlace electrostático o de hidrógeno) entre el compuesto y la zona del "tobillo" de los puntos del HSA. En particular, es posible que los grupos fosfato con carga negativa estén bien colocados para interactuar con los restos con carga positiva que se alinean en la zona del "tobillo".

45 Como se indicó anteriormente, el aumento en porcentaje en AUC-conc. puede depender del tiempo durante el que se realizan las mediciones. Por ejemplo, la adición del BHEM con fosfato en MS-310 para preparar el MS-321 aumentó AUC-conc. durante 0 a 10 min. desde 1,8 a 3,2 mM min., un aumento del 78%. Sin embargo, AUC-conc. durante 0 a 30 min. aumentó desde 2,46 a 5,57 mM min., un aumento del 126%.

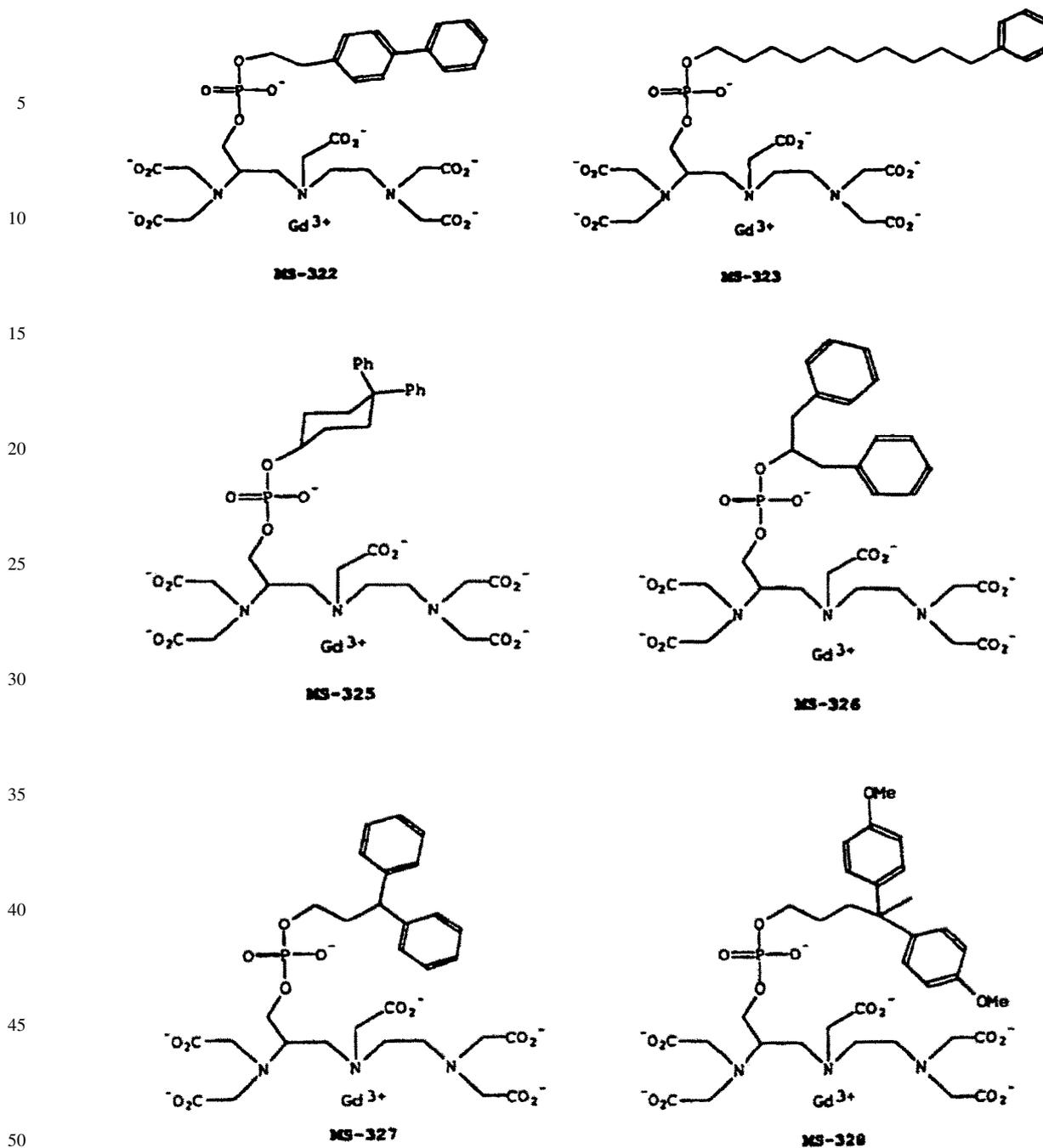
Los agentes de contraste de esta invención son:



55

60

65



55 Los agentes de contraste más preferidos de esta invención son MS-317, MS-322, MS-325 y MS-328. El más preferido es el MS-325.

Propiedades adicionales de los agentes de contraste

60 Dado que diferentes formas quirales de fármacos o biomoléculas pueden influir su rendimiento *in vivo*, lo mismo se cumple probablemente en los agentes de contraste de esta invención. Para cada centro quiral dado, una forma puede tener mayor capacidad de relajación, vida media en la sangre, toxicidad menor, menos metabolitos o alguna otra ventaja o combinación de estas ventajas. Estas formas quirales serán las preferidas.

65 Para facilitar la administración y absorción, los agentes de contraste de la presente invención deberían tener buena solubilidad en agua. Preferentemente, los agentes de contraste son solubles a una concentración de al menos 1,0 mM, y preferentemente 10 mM y más preferentemente 100 mM en agua a temperatura ambiente.

ES 2 274 523 T3

Para inyectables, los agentes formulados deberían tener una viscosidad solo moderada que permita inyecciones convenientes rápidas. La viscosidad debería ser inferior a $10,20 \times 10^{-4}$ kg-s/m² (10 centipoises) o preferentemente inferior a $5,10 \times 10^{-4}$ kg-s/m² (5 centipoises) o más preferentemente inferior a $2,04 \times 10^{-4}$ kg-s/m² (2 centipoises).

- 5 Para inyectables, los agentes formulados asimismo no deberían tener excesiva osmolalidad, ya que esto puede aumentar la toxicidad. La osmolalidad debería ser inferior a 3.000 miliosmoles/kg o preferentemente inferior a 2.500 miliosmoles/kg o más preferentemente inferior a 900 miniosmoles/kg.

Utilización de los agentes de contraste

10 Se contempla asimismo que el IEM pueda comprender una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicas u orgánicas. Entre dichas sales de ácido se incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, sulfato de dodecilo, etansulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, mecotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen las sales de amonio, las sales de metales alcalinos, tales como las sales de sodio y de potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como las sales de calcio, magnesio y cinc, las sales con bases orgánicas, tales como las sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina y las sales con aminoácidos tales como arginina, lisina. Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden estar cuaternizados con agentes tales como los haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y de fenetilo.

25 De este modo se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite. Las sales preferidas de esta invención son las sales de N-metil-D-glucamina, cálcicas y sódicas.

30 Las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenden cualquiera de los complejos de la presente invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen los intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como la albúmina del suero humano, sustancias de tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácrilatos, ceras, polímeros de bloque polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

40 Según esta invención, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable esterilizada, por ejemplo una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable esterilizada. Esta suspensión puede estar formulada según las técnicas conocidas en la materia que utilizan agentes de dispersión o de humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable esterilizada puede también ser una solución o suspensión inyectable esterilizada en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean aceites esterilizados, fijados como disolvente o medio de suspensión. Con este objeto, cualquier aceite fijado suave puede emplearse incluyendo los mono- o di-glicéridos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicérido son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxi-etiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite pueden contener asimismo un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como el de la *Ph. Helv.* o alcohol similar.

55 Dado que los agentes de contraste de la presente invención se fijan a proteínas del plasma, en algunos casos dependiendo de la dosis y de la cantidad de inyección, los puntos de fijación en las proteínas del plasma pueden llegar a estar saturados. Esto conducirá a la disminución de la fijación del agente y podría poner en riesgo la vida media o la tolerancia. Por lo tanto, puede ser deseable inyectar el agente pre-fijado a una albúmina esterilizada o una solución de sustitución en el plasma. Alternativamente, puede utilizarse un aparato/jeringuilla que contenga el agente de contraste y lo mezcle con sangre extraída en la jeringuilla; ésta se reinyecta a continuación al paciente.

60 Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, atomización por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante unas formulaciones de portador pasivo en la dosis implantadas que contienen portadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. El término "parenteral" como se utiliza en la presente memoria incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intercraneal o técnicas de infusión.

65 Cuando se administra por vía oral, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse en cualquier forma galénica oralmente aceptable incluyendo cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas.

ES 2 274 523 T3

En el caso de comprimidos para utilización oral, los portadores que se utilizan normalmente incluyen la lactosa y el almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio, se añaden también típicamente. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen la lactosa y el almidón de maíz anhidro. Cuando se requieren suspensiones acuosas para su utilización oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse también determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Alternativamente, cuando se administra en forma de supositorios para administración rectal, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por consiguiente se funda en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen la manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Como se indicó anteriormente, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden también administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo los ojos, la piel o el tubo digestivo inferior. Para cada una de estas áreas u órganos se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas.

La aplicación tópica en el tubo digestivo inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. Pueden utilizarse también parches transdérmicos por vía tópica.

Para las aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo en suspensión o disuelto en uno o más portadores. Los portadores para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen compuestos de aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsinante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos en suspensión o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores adecuados incluyen aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de etilo, alcohol cetorílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para utilización oftálmica, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, con pH ajustado, o, preferentemente, como disoluciones en solución salina isotónica, con pH ajustado esterilizadas, ya sea con o sin conservante como por ejemplo el cloruro de bencilalconio. Alternativamente, para las utilizaciones oftálmicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada como por ejemplo vaselina.

Para la administración mediante aerosol o inhalación nasal, las composiciones farmacéuticas de esta invención se preparan según las técnicas bien conocidas en materia de formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, activadores de absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La dosis depende de la sensibilidad de la instrumentación para diagnóstico por imagen, así como de la composición del agente de contraste. Por ejemplo, para el diagnóstico por imagen por MRI, un agente de contraste que contiene una sustancia muy paramagnética, p. ej. gadolinio (III), requiere generalmente una dosis menor que un agente de contraste que contenga una sustancia paramagnética con un momento magnético menor, p. ej., hierro (III). Preferentemente, la dosis estará comprendida en el intervalo entre aproximadamente 0,001 y 1 mmoles/kg de peso corporal al día del complejo metal-ligando activo. Más preferentemente, la dosis estará comprendida en el intervalo entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,05 mmoles/kg de peso corporal al día.

Debe entenderse, sin embargo, que un régimen de dosis específico para cualquier paciente en concreto dependerá también de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, duración de la administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y del criterio del médico que lleva el tratamiento.

Si la aplicación de esta invención es el diagnóstico por imagen por MRI, tras la administración de la dosis apropiada del agente de contraste, se realiza el diagnóstico por imagen por MRI. La selección en la secuencia de impulsos (recuperación de la inversión, IR; eco de rotación, SE, eco plano, EPI; tiempo de vuelo, TOF; turbo-flash, eco del gradiente, GE) y los valores de los parámetros de pronóstico por imagen (duración del eco, TE; duración de la inversión, TI; duración de la repetición, TR; eco parásito, etc.) estarán gobernados por la información de diagnóstico buscada. En general, si se desea obtener imágenes ponderadas de T_1 , entonces TE debería ser menor de 30 milisegundos (o el valor mínimo) para maximizar el peso de T_1 . Por el contrario, si se desea medir T_2 , entonces TE debería ser mayor de 30 milisegundos para minimizar los efectos competitivos de T_1 . TI y TR permanecerán aproximadamente iguales tanto para las imágenes ponderadas de T_1 como de T_2 ; TI y TR son generalmente del orden de aproximadamente 5 a 1.000 y 2 a 1.000 milisegundos, respectivamente.

Los agentes de contraste de MRI de la presente invención son útiles para el diagnóstico por imagen general de tumores, descomposición de la barrera sangre-cerebro y de otras lesiones. Además, son muy útiles para examinar la perfusión, es decir, la circulación sanguínea en los tejidos y fuera de ellos (corazón, cerebro, piernas, pulmones,

ES 2 274 523 T3

riñones, tumores, etc.) y en los vasos sanguíneos (angiografía por MR). Además, pueden utilizarse los agentes para aumentar los cambios de señal en el cerebro durante episodios cognitivos (MRI funcional).

A fin de que esta invención pueda entenderse con más detalle, se publican los ejemplos siguientes.

5

Ejemplos

Experimental

10 A menos que se indique de otro modo, todos los materiales se adquirieron en proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. El THF se destiló en cetilbenzofenona de potasio inmediatamente antes de su uso. El cloruro de metileno se destiló sobre hidruro de calcio. Toda la cromatografía en columna se realizó en nitrógeno por el método de flash descrito por Still con gel de sílice (230 a 400 mallas, separación EM). Todas las reacciones fueron controladas por cromatografía en capa fina (TLC) realizada en gel de sílice sobre soporte de alúmina 60 F₂₅₄, placas de 15 0,2 mm (separación EM) y los compuestos se observaron a la luz UV (254 nm), reactivo Ninhidrina-Plus o reactivo de Dragendorff (ambos de Alltech) después del calentamiento. Se registraron espectros RMN de protón de rutina a 300 MHz en CDCl₃ con TMS como patrón interno, excepto los espectros registrados en D₂O. Se publican las constantes de acoplamiento (J) en hercios (HZ). Se obtuvieron espectros por ³¹P RMN a 121,4 MHz.

20 *Preparación del producto intermedio de fosforamidita*

A. Amida de serina etilendiamina

25 Se disolvió hidrocloreto del éster metílico de serina (36,03 g, 232 mmoles) en 400 ml de etilendiamina y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó la etilendiamina por evaporación a presión reducida. Se disolvió el residuo en 80 ml de NaOH 4 N y se concentró a presión reducida. Este material se disolvió en metanol (150 ml), se filtró y se concentró dos veces. Este residuo se puso en suspensión en cloruro de metileno (150 ml) y metanol (5 a 10 ml) se añadió con calentamiento hasta que se disolvió el residuo aceitoso. Se secó la solución sobre Na₂SO₄, se filtró a través de celite y se concentró. El producto aceitoso viscoso se obtuvo sin purificación adicional.

30

B. Trihidrocloruro de 2-hidroximetildietilentriamina

35 Se disolvió la amida en bruto (< 230 mmoles) en 100 ml de THF. Se añadió lentamente borano·THF (1150 ml, 1,0 M) a la solución agitada. A continuación se calentó a reflujo la reacción bajo Ar durante 16 horas. El borano en exceso se enfrió mediante la adición cuidadosa de 250 ml de metanol a 0°C. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se añadió HCl concentrado (100 ml) lentamente con enfriamiento y a continuación la solución se calentó a reflujo durante 24 horas. La mezcla del producto se concentró a presión reducida y se recristalizó en MeOH/EtOH. Esto proporcionó 39,92 g de un sólido blanco (71% de éster metílico).

40 *C. Éster 1-hidroximetil-DTPA-penta-t-butílico (1)*

45 A una solución del trihidrocloruro de hidroximetil dietilendiamina (30,25 g, 124,70 mmoles) y diisopropiletilamina (218 ml, 1,25 mmoles) en 300 ml de DMF anhidra a temperatura ambiente bajo N₂ se añadió bromoacetato de t-butilo (126 ml, 0,78 moles) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron a continuación al vacío y se disolvió el residuo en EtOAc y se extrajo con H₂O, NaHCO₃ (sat), H₂O y NaCl (sat). El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃ solo -CHCl₃: MeOH = 100:1) para dar el producto puro (aceite, 70,12 g, 81,7%): R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,54, (éter:hexanos = 2:1) 0,23; ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,44 (brs, 45 H), 2,44-3,06 (m, 6 H), 3,24 y 3,29 (cada d, cada 1 H, J = 16,8), 3,34-3,58 (m, 10 H), 3,66 (dd, 1 H, J = 11,2, 5,3), 4,20-4,70 (br, 1 H).

50

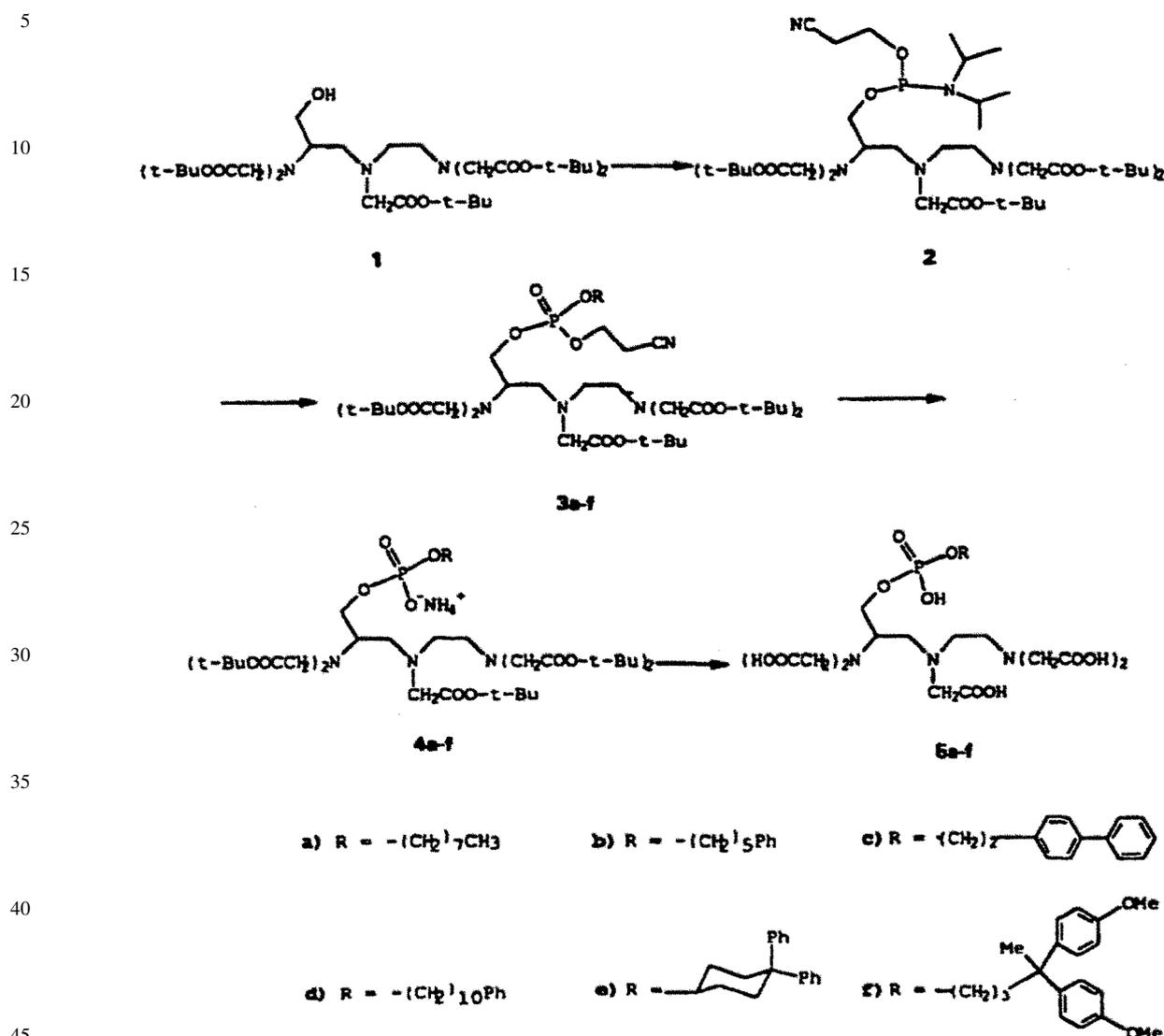
D. Producto intermedio de fosforamidita (2)

55 A una solución agitada del éster penta t-butílico (1) (12,88 g, 18,72 mmoles) y diisopropiletilamina (4,55 g, 36 mmoles) en CH₂Cl₂ destilado (100 ml) se añadió 2-cianoetil N,N-diisopropilclorofosforamidita (5,92 g, 25 mmoles) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluyó la solución con 100 ml de CH₂Cl₂ y se lavó con solución de NaHCO₃ al 10% enfriada en hielo (100 ml), H₂O (100 ml) y salmuera (100 ml) y se secó sobre MgSO₄. Se evaporó la capa orgánica para dar el producto en bruto como un aceite amarillo pálido (2). Este aceite en bruto puede utilizarse para la siguiente reacción de acoplamiento sin purificación adicional.

60 Los Ejemplos 1 a 6 presentan la síntesis de algunos de los agentes de contraste preferidos de esta invención según el esquema generalizado siguiente:

65

Síntesis de ligandos del fosfodiéster



50 Ejemplo 1

Preparación de MS-315-(2)→(3a)→(4a)→(5a)

55 A. Fosfato de octiloxi (3a)

Preparado a partir de un producto intermedio de fosforamidita en bruto (2) (preparado a partir de 4,40 g, 6,40 mmoles de éster 1-hidroximetil-DTPA-penta-t-butílico (1)) por el mismo procedimiento descrito para (3d) y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH) [2,71 g, rendimiento total del 44,7% de (2)]. R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,33.

60 B. Fosfodiéster de n-octilo (4a)

Preparado a partir del fosfato (3a) (2,70 g, 2,84 mmoles) por el mismo procedimiento descrito para (4e) (2,17 g, 85,1%).

65

ES 2 274 523 T3

C. MS-315 (5a)

La solución de (4a) (2,16 g, 2,41 mmoles) en ácido trifluoroacético (20 ml) se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evaporó el disolvente y se disolvió el residuo con 5 ml de H₂O. Se purificó la solución por columna de gel de sílice en fase inversa C₁₈ (cartucho prerrelleno Sep-Pak. Waters) (H₂O solamente - CH₃CN:H₂O = 1:4) para dar el producto (5a) puro (1,13 g, 76,2%). ³¹P-RMN (D₂O) d2,3.

Ejemplo 2

10 Preparación de MS-317-(2)→(3b)→(4b)→(5b)

A. Fosfato de 5-fenil-1-pentiloxi (3b)

15 Preparado a partir de un producto intermedio de fosforamidita en bruto (2) (preparado a partir de 2,72 g, 3,96 mmoles de éster 1-hidroxi-DTPA-penta-t-butílico (1)) por el mismo procedimiento descrito para (3d) excepto que se utilizó el producto en bruto de (3b) para la reacción siguiente sin cromatografía en columna de gel de sílice (4,28 g en bruto) R_f (CHCl₃/MeOH) [2,71 g, rendimiento total del 44,7% de (2)]. R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,26.

20 B. Fosfodiéster de 5-fenil-1-pentilo (4b)

Preparado a partir del fosfato (3b) por el mismo procedimiento descrito para (4e) excepto que el producto en bruto se purificó por cromatografía Sephadex LH 20 (2,72 g en bruto). R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,11.

25 C. MS-317 (5b)

Preparado a partir del (4b) en bruto (2,72 g) por el mismo procedimiento descrito para (5a) [1,12 g, rendimiento total del 43,5% de producto intermedio (2) de fosforamidita]. ³¹P-RMN (D₂O) d0,1.

Ejemplo 3

30 Preparación de MS-322-(2)→(3c)→(4c)→(5c)

A. Fosfato de 2-(4-bifenilil)-1-etoxi (3c)

35 Preparado a partir de un producto intermedio de fosforamidita en bruto (2) (3,50 g, 3,87 mmoles) por el mismo procedimiento descrito para (3d) excepto que se utilizó el producto en bruto de (3c) (4,13 g en bruto) para la reacción siguiente sin cromatografía en columna de gel de sílice.

40 B. Fosfodiéster 2-(4-bifenilil)-1-etílico (4c)

Preparado a partir del fosfato (3c) (4,13 g en bruto) por el mismo procedimiento descrito para (4e) excepto que el producto en bruto se purificó por cromatografía Sephadex LH 20 (2,34 g en bruto).

45 C. MS-322 (5b)

Preparado a partir del (4c) en bruto (2,34 g) por el mismo procedimiento descrito para (5a) [1,15 g, rendimiento total del 43,5% de producto intermedio (2) de fosforamidita]. ³¹P-RMN (D₂O) d3,7.

Ejemplo 4

50 Preparación de MS-323-(2)→(3d)→(4d)→(5d)

A. Fosfato de 10-fenil-1-decanoxi (3d)

55 A una fosforamidita purificada (2) (15,20 g, 16,81 mmoles) en CH₃CN destilado (50 ml) se añadió 10-fenil-1-decanol (9,00 g, 38,39 mmoles) y 1 H-tetrazol (2,36 g, 33,70 mmoles) en CH₃CN destilado (50 ml). Se añadió hidroperóxido de t-butilo (90%, 2733 ml, 21,00 mmoles) y se hizo reaccionar y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se concentró el disolvente al vacío (aprox. 10 ml) y se dividió el residuo entre AcOEt y H₂O. Se lavó la capa orgánica con H₂O y NaCl (sat.), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó. Se purificó el residuo por cromatografía de columna en gel de sílice (hexanos solamente - hexano: éter = 1:1 y a continuación CHCl₃:MeOH = 100:1 - 50:1) para dar el producto (3d) (14,12 g, 79,7%). R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,35.

60 B. Fosfodiéster 10-fenil-1-decanilo (4d)

65 Preparado a partir del fosfato (3d) (12,27 g, 11,65 mmoles) por el mismo procedimiento que para (4e) (10,52 g, 90,3%). R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,15.

ES 2 274 523 T3

C. MS-323 (5d)

La mezcla de (4d) (10,50 g, 10,50 mmoles) en cHCl (calidad metal en vestigios, 15 ml) y éter (15 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se evaporó el éter al vacío. Se añadió la capa acuosa resultante (pH < 0) cNHOH hasta ajustar el pH a 1,5. Se recogió el precipitado sólido blanco por filtración y se lavó con solución de HCl dil. (pH 1,5, 3 veces, 100 ml cada una) y éter (3 veces, 200 ml cada una). Se secó el sólido blanco con bomba durante 24 horas a temperatura ambiente para dar el producto puro (5d) (6,80 g, 90,0%). ³¹P-RMN (D₂O + NaOD, pH = 13,5) d4,9.

10

Ejemplo 5

Preparación de MS-325 - (2)→(3e)→(4e)→(5e)

15

A. Fosfato de 4,4-difenilciclohexiloxi (3e)

Preparado a partir de un producto intermedio (2) de fosforamidita purificado (4,52 g, 5,0 mmoles) por el mismo procedimiento descrito para (3d) excepto que se utilizaron disolventes de cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂ solamente - CH₂Cl₂:MeOH = 100:1) (2,97 g, 55,4%). R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,47.

20

B. Fosfodiéster de 4,4-difenilciclohexilo (4e)

Se agitó la solución de (3e) (2,14 g, 2,00 mmoles) en NH₃ 2 M-MeOH (30 ml) a temperatura ambiente durante 5 horas. Se evaporó el disolvente y se utilizó el residuo (4e) (2,00 g, 98,3%) para la reacción posterior sin purificación adicional. R_f (CHCl₃:MeOH = 10:1) 0,12.

25

C. MS-325 (5e)

La mezcla de (4b) (2,00 g, 1,96 mmoles) en cHCl (calidad metal en vestigios, 5 ml) y éter (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporaron los disolventes y el residuo se disgregó con H₂O (100 ml). Se filtró el precipitado resultante y se lavó con H₂O (5 veces, 10 ml cada una) y éter (5 veces, 50 ml cada una). Se secó el producto sólido con bomba a temperatura ambiente durante 24 horas para dar el producto puro (5b) (1,18 g, 81,5%). ³¹P-RMN (D₂O + NaOD, pH = 13,5) d-0,3.

35

Ejemplo 6

Preparación de MS-328 - (2)→(3f)→(4f)→(5f)

40

A. Fosfato de 4,4-bis(4-metoxifenil)pentilo (3f)

Preparado a partir de 32,5 g (36 mmoles) de fosforamidita en bruto (2) y 4,4-bis(4-metoxifenil)pentanol (21,06 g, 70 mmoles) por el procedimiento descrito para (3d). Se realizó la cromatografía en 50% de EtOAc/hexano para dar 18,27 g de un aceite amarillo que se contaminó en exceso con el alcohol de partida. R_f (50% de EtOAc/hex) 0,4.

45

B. Fosfodiéster de 4,4-bis(4-metoxifenil)pentilo (4f)

Se preparó una solución de (3f) (18,27 g) por el mismo procedimiento descrito para (4e) (17,26 g).

50

C. MS-328 (5f)

Preparado a partir de (4f) (17,26 g) por el procedimiento descrito para (5a) dando 4,88 g del sólido blanco (4,87 mmoles, 13% de rendimiento de fosforamidita). ³¹P-RMN (D₂O) d2,3.

55

Ejemplo 7

Formulación in situ de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5a (MS-315) (200 mM, 5 ml)

60

Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd₂O₃) (0,181 g, 0,5 mmoles), compuesto (5a) (92% en peso, 0,703 g, 1,05 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (4,1 g, 3,6 mmoles). Se añadió agua desionizada (3,5 ml) y la mezcla se agitó a 95°C durante 7 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 5,0 ml con agua desionizada. Se filtró la solución a través de un filtro de 2×10⁻⁶ m (2 micras) para dar la solución acuosa del compuesto del título.

65

ES 2 274 523 T3

Ejemplo 8

Formulación in situ de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5b (MS-317) (200 mM, 4 ml)

- 5 Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd_2O_3) (0,145 g, 0,4 mmoles), compuesto (5b) (81% en peso, 0,706 g, 0,84 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (0,60 g, 8,1 mmoles). Se añadió agua desionizada (3 ml) y la mezcla se agitó a 95°C durante 6 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 4,0 ml con agua desionizada. Se filtró la solución a través de un filtro de 2×10^{-6} m (2 micras) para dar la solución acuosa del compuesto del título.

10

Ejemplo 9

Formulación in situ de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5c (MS-322) (200 mM, 4 ml)

- 15 Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd_2O_3) (0,145 g, 0,4 mmoles), compuesto (5c) (79% en peso, 0,729 g, 0,84 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (0,61 g, 3,1 mmoles). Se añadió agua desionizada (3 ml) y la mezcla se agitó a 95°C durante 6 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 4,0 ml con agua desionizada. Se filtró la solución a través de un filtro de 2×10^{-6} m (2 micras) para dar la solución acuosa del compuesto del título.

20

Ejemplo 10

Formulación in situ de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5e (MS-325) (200 mM, 5 ml)

- 25 Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd_2O_3) (0,181 g, 0,5 mmoles), compuesto (5e) (95% en peso, 0,820 g, 1,05 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (0,68 g, 3,5 mmoles). Se añadió agua desionizada (3,5 ml) y la mezcla se agitó a 95°C durante 6 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 5,0 ml con agua desionizada. Se filtró la solución a través de un filtro de 2×10^{-6} m (2 micras) para dar la solución acuosa del compuesto del título.

30

Ejemplo 11

Formulación in situ de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5f (MS-328) (200 mM, 5 ml)

- 35 Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd_2O_3) (0,181 g, 0,5 mmoles), compuesto (5e) (97% en peso, 0,850 g, 1,05 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (0,62 g, 3,2 mmoles). Se añadió agua desionizada (3,5 ml) y la mezcla se agitó a 95°C durante 6 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 5,0 ml con agua desionizada. Se filtró la solución a través de un filtro de 2×10^{-6} m (2 micras) para dar la solución acuosa del compuesto del título.

40

Ejemplo 12

Preparación de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5b (MS-317)

- 45 Se pesaron en un tubo de ensayo óxido de gadolinio (Gd_2O_3) (0,50 g, 1,38 mmoles), compuesto (5b) (87% en peso, 1,87 g, 2,5 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (1,53 g, 7,8 mmoles). Se añadió agua desionizada (8 ml), a continuación la mezcla se agitó a 95°C durante 6 horas, tras las cuales se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó el volumen a 9,0 ml con agua desionizada. Se cargó la solución en una columna Sep-Pak[®] de 10-g y se eluyó con agua. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se secó el residuo sólido, blanco y brillante a alto vacío durante 48 horas. Rendimiento: 3,50 g (2,48 mmoles, 99%). Anal. calc. para $(NMGH^+)_3[Gd(5e^{5-})(H_2O)]$ ($C_{47}H_{91}GdN_6O_{30}P$): C, 40,08; H, 6,51; N, 5,97; Gd, 11,16. Obtenido: C, 40,24; H, 6,69; N, 5,88; Gd, 10,11.

50

Ejemplo 13

- 55 *Preparación de la sal N-metil-glucamina del complejo de gadolinio de 5d (MS-323)*

- Se pesaron en un matraz de 50 ml de fondo redondo cloruro de gadolinio hexahidratado ($Gd_2O_3 \cdot 6H_2O$) (2,11 g, 5,68 mmoles), compuesto 5d (74% en peso, 5,82 g, 5,98 mmoles) y N-metil-glucamina (NMG) (6,06 g, 31 mmoles). Se añadió agua desionizada (16 ml), a continuación la mezcla se agitó a 95°C durante 4 horas y se enfrió la solución a temperatura ambiente. Se cargó la solución en una columna C-18 (200 g) y se eluyó con una mezcla agua-metanol 1:1. Se evaporó el disolvente a presión reducida para dar un sólido, blanco y brillante. Rendimiento: 8,0 g (5,41 mmoles, 95%). Anal. calc. para $(NMGH^+)_3[Gd(5e^{5-})(H_2O)]$ ($C_{52}H_{100}GdN_6O_{30}P$): C, 42,27; H, 6,82; N, 5,97; Gd, 5,69. Obtenido: C, 42,04; H, 7,03; N, 5,83; Gd, 9,55.

65

Ejemplo 14

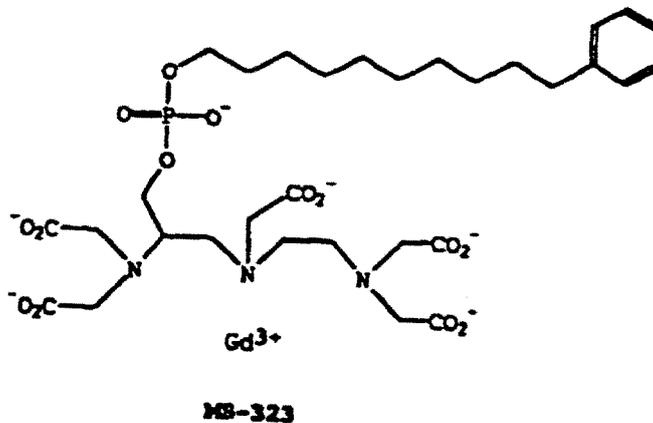
El agente de contraste siguiente presenta una fijación a HSA mayor del 95%.

5

10

15

20



25

Se demuestra que tiene una AUC-conc. (durante 0 a 10 minutos) del 100% o mayor que la del análogo siguiente:

30

35

40

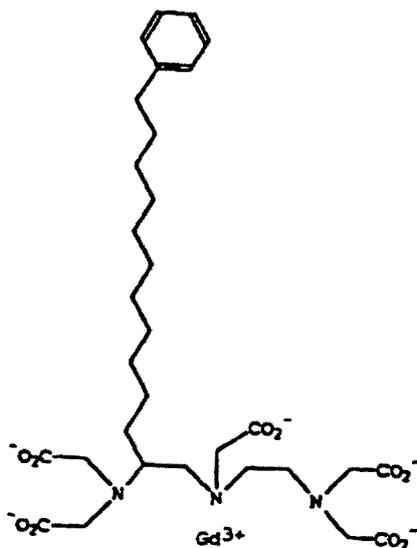
45

50

55

60

65



REIVINDICACIONES

1. Un ligando quelante seleccionado de las estructuras siguientes:

5

10

15

20

25

30

35

40

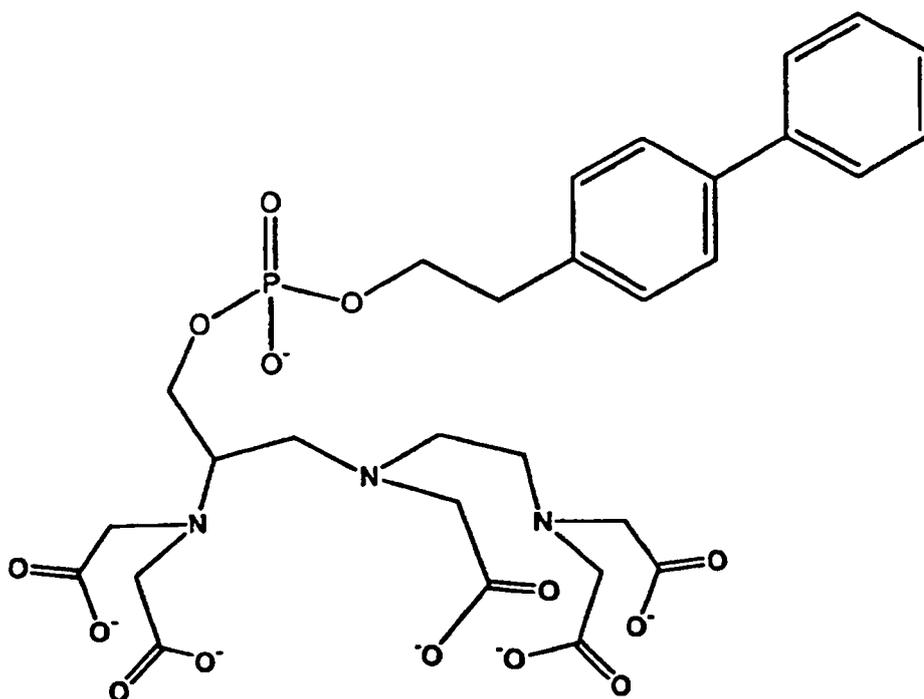
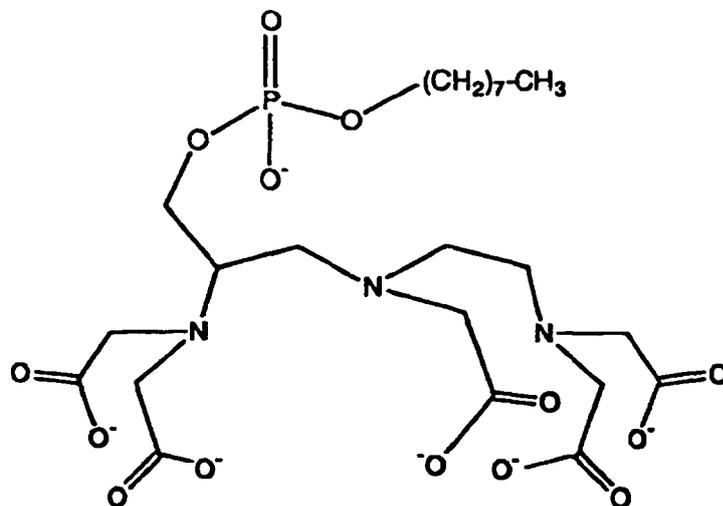
45

50

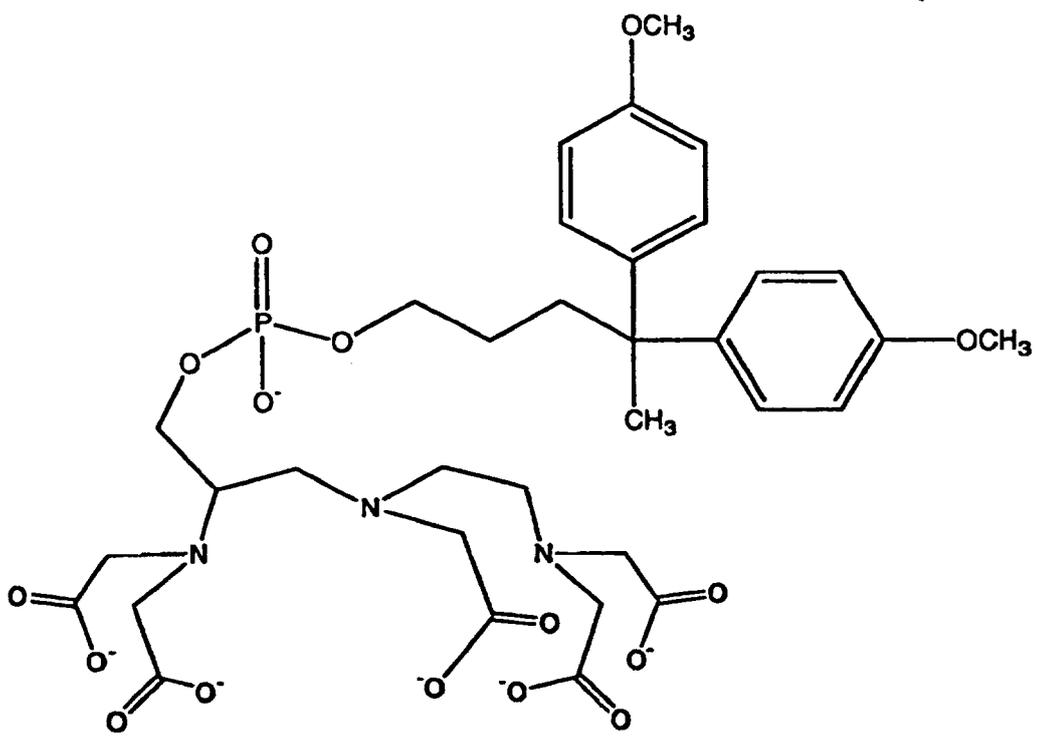
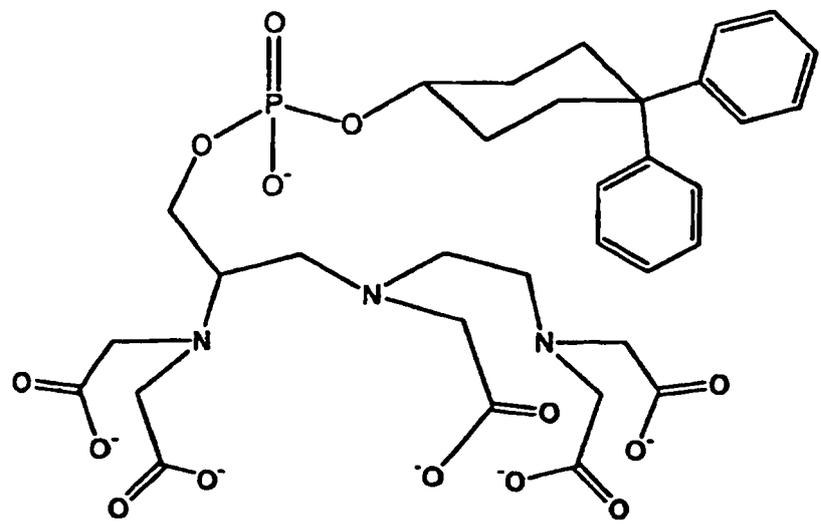
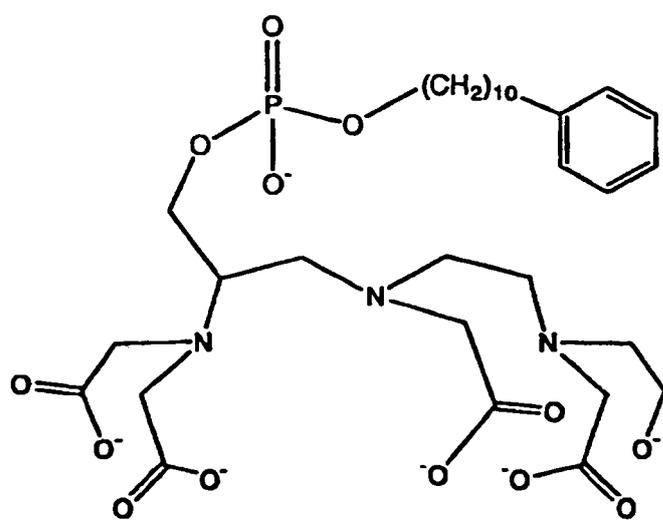
55

60

65



5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



5

10

15

20

25

o

30

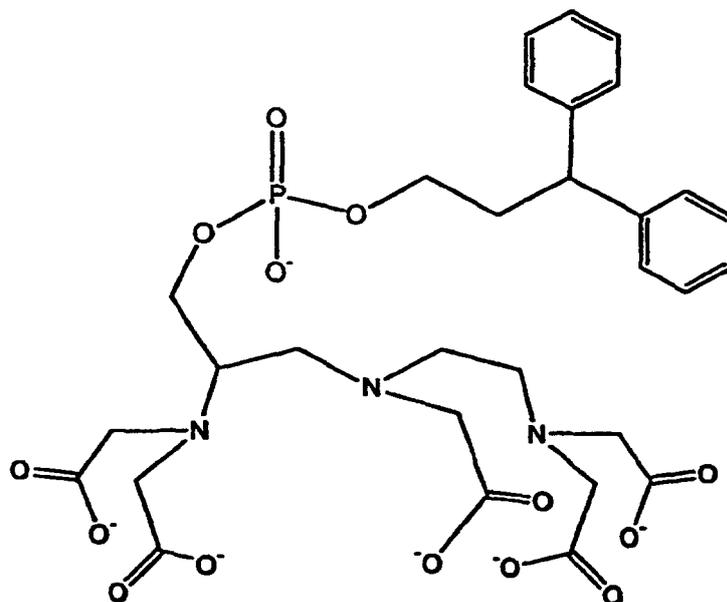
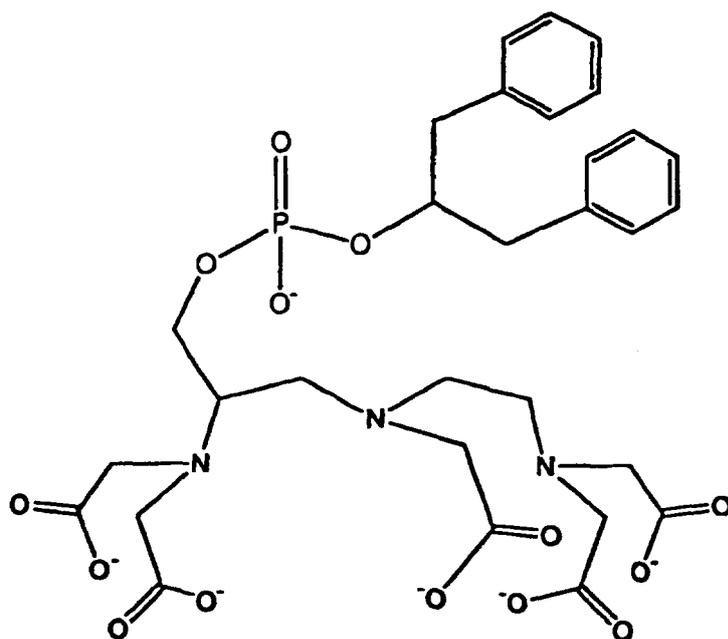
35

40

45

50

55



o su complejo de Gd (III) o sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, en la que la sal se selecciona del grupo consistente en calcio, sodio, N-metil-glucamina y sus mezclas.

60

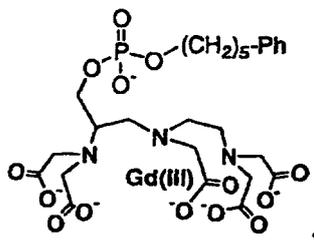
65

ES 2 274 523 T3

3. Un agente de contraste para diagnóstico por imagen que presenta la estructura siguiente:

5

10



15

en la que Ph = fenil,

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20

4. La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 3, en la que la sal es la N-metil-glucamina.

5. Una composición para diagnóstico que comprende un complejo de Gd (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un excipiente, adyuvante o vehículo.

25

6. La composición para diagnóstico según la reivindicación 5, que comprende además un ligando orgánico libre o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

7. Utilización de un complejo de Gd (III) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición para diagnóstico para diagnóstico por RM destinada a examinar el sistema vascular de un tejido.

30

8. Utilización de un complejo de Gd (III) tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición para diagnóstico para diagnóstico por RM destinada a examinar el riego sanguíneo en un tejido.

35

9. La utilización de la reivindicación 8, en la que dicho tejido se selecciona del grupo consistente en un tumor, un corazón, una pierna, un pulmón y un riñón.

10. Utilización de un complejo de Gd (III) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición para diagnóstico para diagnóstico por RM destinada a controlar un cerebro humano durante episodios cognitivos.

40

11. Utilización de un complejo de Gd (III) tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición para diagnóstico para diagnóstico por RM destinada a determinar el volumen de sangre en un tejido.

45

50

55

60

65