



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 312 207**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/26 (2006.01)
C07D 311/16 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **99923518 .7**
⑨6 Fecha de presentación : **28.04.1999**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1075539**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2001**

⑤4 Título: **7-alcoxicoumarinas como sustratos de la citocromo P450.**

③0 Prioridad: **08.05.1998 GB 9810016**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

⑦3 Titular/es: **SMITHKLINE BEECHAM plc.**
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB

⑦2 Inventor/es: **Clarke, Stephen, Edward**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

7-alcoxicoumarinas como sustratos de la citocromo P450.

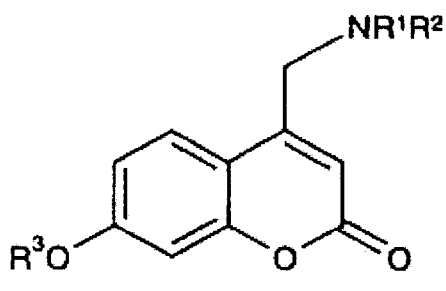
Esta invención se refiere a un ensayo que utiliza derivados de cumarina. También se describen procedimientos su preparación y su uso como sustratos de enzima.

La mayoría de las interacciones de fármacos basadas en metabolismo son un resultado de la inhibición de las enzimas citocromo P450. Las interacciones de fármaco que implican las enzimas P450 individuales se pueden predecir usando procedimientos *in vitro*. Los ensayos típicos de enzima P450 *in vitro* implican la incubación de un sustrato apropiado con una fuente de enzima. Tradicionalmente, se han usado procedimientos cromatográficos que requieren tiempo largo para la detección de metabolitos en estas incubaciones. Más recientemente la disponibilidad de los lectores de placas fluorimétricas ha facilitado el mayor rendimiento de los ensayos de enzima en general. La adaptación de los ensayos de P450 a la tecnología de lector de placas fluorescentes requiere la identificación de sustratos con productos fluorescentes apropiados para las enzimas individuales. Entre los citocromos P450 que metabolizan xenobióticos, CYP2D6 es uno de los responsables comúnmente usados para el metabolismo de fármacos.

3-Ciano-7-etoxicumarina se ha descrito para la selección de la inhibición de CYP2D6 (Crespi *et al*, Anal. Biochem., 1997, 248; 188-190). También se han descrito otros sustratos de CYP2D6 (Koymans *et al*, Chem. Res. Toxicol., 1992, 5, 211-219), sin embargo éstos no proporcionan productos fluorescentes adecuados para la selección de alto rendimiento.

Ahora se han identificado ciertos compuestos que mejoran los sustratos para CYP2D6 y que son de uso para configurar los ensayos de selección de inhibición de alto rendimiento.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un ensayo para ensayar los inhibidores de la enzima CYP2D6 que comprende poner en contacto la enzima y un compuesto de fórmula (I):



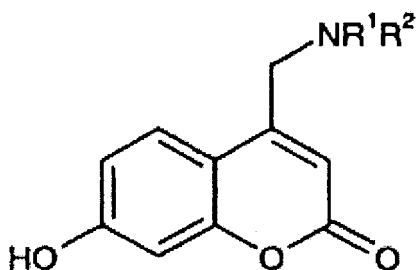
(I)

en la que R¹ y R² independientemente representan hidrógeno o metilo y R³ es metilo, y al menos uno de R¹ y R² representa metilo, con un compuesto de ensayo y medir la inhibición de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima.

Preferiblemente R¹ es hidrógeno y R² es metilo.

En general se conocerá la velocidad de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) en ausencia del compuesto de ensayo, así como el grado de O-desalquilación en momentos dados. El ensayo se puede hacer para determinar la inhibición de la O-desalquilación de manera continua o en momentos especificados.

La O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la CYP2D6 proporciona un producto fluorescente fácilmente cuantificable de fórmula (II):



(II)

en la que R¹ y R² son como se definen para al fórmula (I), que se puede explorar con longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas por ejemplo una longitud de onda de excitación de 409 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm.

El ensayo se puede llevar a cabo o bien en solución o utilizando un soporte sólido. Cuando el ensayo se lleva a cabo en solución los disolventes adecuados incluyen metanol, acetonitrilo y DMSO.

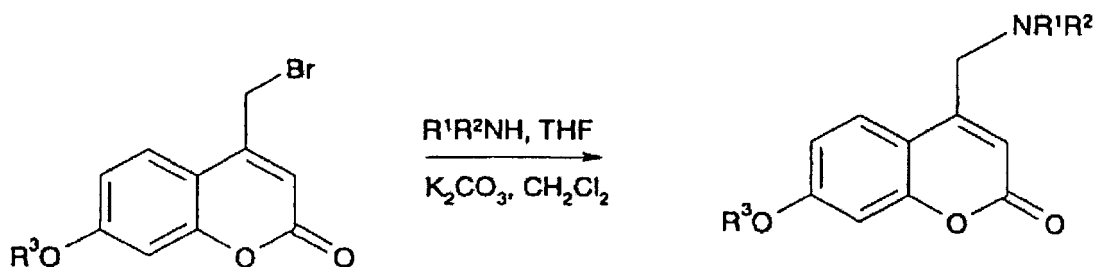
El compuesto de ensayo se puede incubar previamente con enzima antes de la adición del sustrato, o como alternativa el sustrato se puede añadir de manera simultánea. Las concentraciones finales de enzima y sustrato se calculan de manera que se logre una velocidad adecuada de procesamiento para llevar a cabo el ensayo. Si se desea, la reacción se puede detener, por ejemplo mediante la adición de ácido o disolvente. El producto se puede analizar usando cualquier sistema convencional de detección fluorescente, por ejemplo mediante un lector de placa de pocillos múltiples/de placa fluorescente.

Ciertos compuestos de fórmula (I) son de particular interés, por ejemplo un compuesto de fórmula (I), como se ha definido anteriormente, en el que al menos uno de R^1 y R^2 representa metilo.

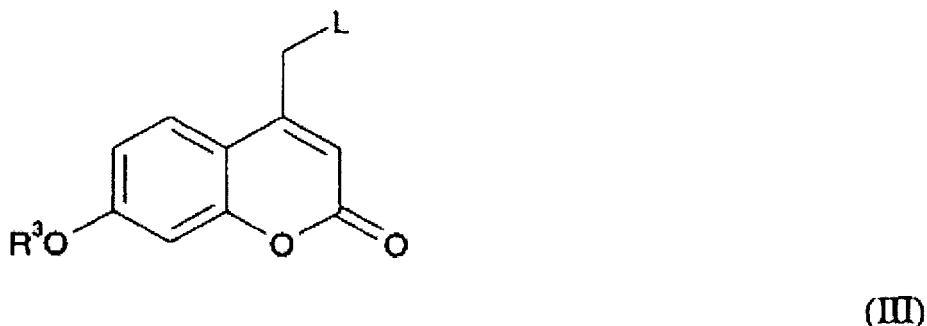
Ciertos compuestos de fórmula (II) son de particular interés, por ejemplo un compuesto de fórmula (II), como se ha definido anteriormente, en la que R^1 es metilo y R^2 es hidrógeno.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante procedimientos convencionales, por ejemplo como se muestra en el esquema I:

Esquema I



De este modo un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I) comprende reacción de un compuesto de fórmula (III):



en la que L es un grupo saliente por ejemplo, Br, y R^3 es metilo, con un compuesto de fórmula (IV):



en la que R^1 y R^2 son como se han definido para la fórmula (I) con la condición de que al menos uno de R^1 y R^2 representa metilo.

La reacción se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una base, por ejemplo, carbonato de potasio.

Puesto que la inhibición de las enzimas citocromo P450 es a menudo el mecanismo para las interacciones fármaco/fármaco, el ensayo de acuerdo con la invención es particularmente útil para identificar compuestos que pueden dar lugar a interacciones adversas fármaco/fármaco. Por lo tanto el ensayo se puede usar en combinación con la modificación química de los compuestos de ensayo para incrementar el potencial del compuesto de ensayo para uso como un compuesto farmacéutico.

De este modo un procedimiento para reducir la actividad inhibidora de la enzima CYP2D6 de un compuesto puede comprender las etapas de identificar los compuestos como un inhibidor de la CYP2D6 en el ensayo descrito

ES 2 312 207 T3

anteriormente; y a continuación producir la versión modificada químicamente del compuesto de ensayo en el que la funcionalidad sospechosa de ser responsable de la inhibición de CYP2D6 se cambia o elimina.

La modificación química de los compuestos de ensayo de acuerdo con este procedimiento se puede realizar usando las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de 7-Metoxi-4-(metilaminometil)cumarina

Una solución de metilamina en tetrahidrofurano (2M, 1,10 ml) se añadió a una mezcla enfriada de 4-bromometil-7-metoxicumarina (0,30 g), carbonato de potasio (0,5 g) y diclorometano (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días después se añadió a una solución acuosa de carbonato de potasio. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó (MgSO_4) y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyente 10% de metanol en diclorometano), después se cristalizó en metanol proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,14 g). p. de f. 109,0-109,5°C;

Encontrado: C, 65,64; H, 5,93; N, 6,34, $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ requiere C, 65,74; H, 5,98; N, 6,39%; δ_{H} (CDCl_3): 2,54 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,90 (d, J = 1,1 Hz, 2H), 6,36 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 6,83-6,88 (m, 2H), 7,58 (d, J = 8,2 Hz, 1H); espectro de masas m/z 220 (MH+).

Ejemplo 2

Preparación de 7-Metoxi-4-(dimetilaminometil)cumarina

Una mezcla de clorhidrato de dimetilamina (0,18 g), 4-bromometil-7-metoxicumarina (0,30 g), carbonato de potasio (0,5 g) y diclorometano (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se retiró el sólido por filtración y se concentró el filtrado. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyente 5% de metanol en diclorometano), después se cristalizó en metanol proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,145 g).

p. de f. 97,0°C;

δ_{H} (CDCl_3): 2,31 (s, 6H), 3,50 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 6,31 (s, 1H), 6,82-6,87 (m, 2H), 7,76 (d, J = 8,6 Hz, 1H);

espectro de masas m/z 234 (MH+).

Metodología de ensayo

Materiales

7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina 5 mM (es decir, 1,095 mg/ml en metanol) - almacenar a aprox. -20°C en la oscuridad 2% (p/v)

NaHCO_3 - almacenar a aprox. 4°C

tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4

Solución de cofactor preparada recientemente:- aprox. lo siguiente por ml de 2% (p/v) de NaHCO_3

1,7 mg de NADP, sal monosódica

7,8 mg glucosa-6-fosfato, sal monosódica

6 Unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Tipo VII de Levadura de panadería

Procedimiento

1) Mezclar 1 ul (5 mM) de 7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina, 5 ul (50 ug) de proteína microsómica CYP2D6 y 214 ul de tampón por incubado (proporcionando 20 uM de 7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina y 200 ug/ml de concentración de proteína final).

2) A cada pocillo de una placa de 96 pocillos añadir 220 ul de mezcla de incubación y 5 ul del compuesto de ensayo (o 5 ul de disolvente apropiado para los pocillos de control - se puede usar metanol, acetonitrilo o DMSO).

ES 2 312 207 T3

3) Preincubar la placa de pocillos múltiples en el lector de placas a 37°C durante 5 minutos. Calentar previamente la solución de cofactor a 37°C durante 5 minutos.

- 5 4) Añadir 25 µl de solución de cofactor a cada pocillo y explorar con longitud de onda de excitación de 409 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm con una ganancia de 80. Explorar durante 10 ciclos a intervalos de 1 minuto.

Resultados

- 10 La confirmación de 7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina como un sustrato de CYP2D6 se logró usando quinidina, un inhibidor de diagnóstico de CYP2D6 (Otton *et al.*, J. Pharm. Expt. Ther., 1988, **247**, 242-247). Con quinidina, se inhibió el metabolismo (O-desalquilación) de 7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina con una CI_{50} de 17 nM (Figura 1), un valor de inhibición típico para otros, sustratos de CYP2D6, bien caracterizados.

- 15 Figura 1: Inhibición del metabolismo de 7-metoxi-4-(metilaminometil)cumarina con quinidina.

20

25

30

35

40

45

50

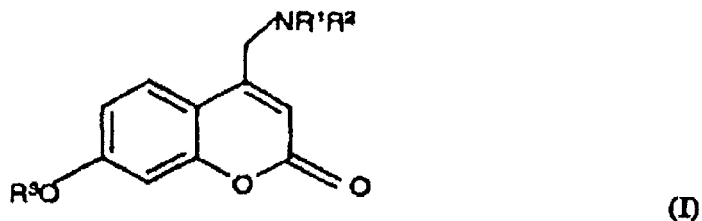
55

60

65

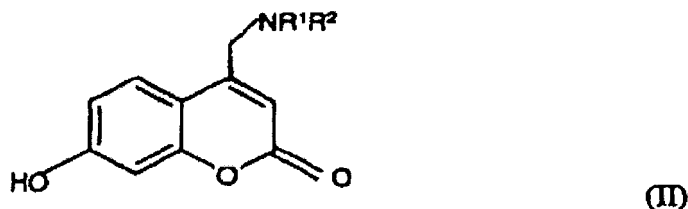
REIVINDICACIONES

1. Un ensayo para evaluar los inhibidores de la enzima CYP2D6 que comprende poner en contacto la enzima y un compuesto de fórmula (I):



en la que R^1 y R^2 independientemente representan hidrógeno o metilo. R^3 es metilo y al menos uno de R^1 y R^2 representa metilo, con un compuesto de ensayo y medir la inhibición de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima.

2. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la inhibición de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima se mide cuantificando el compuesto de fórmula (II):



en la que R^1 y R^2 son como se definen en la reivindicación 1; mediante la detección de la fluorescencia.

3. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el compuesto de fórmula (II) se cuantifica mediante exploración a una longitud de onda de excitación de 409 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm.

4. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que R^1 es hidrógeno y R es metilo.

5. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que R^1 y R^2 ambos representan metilo.

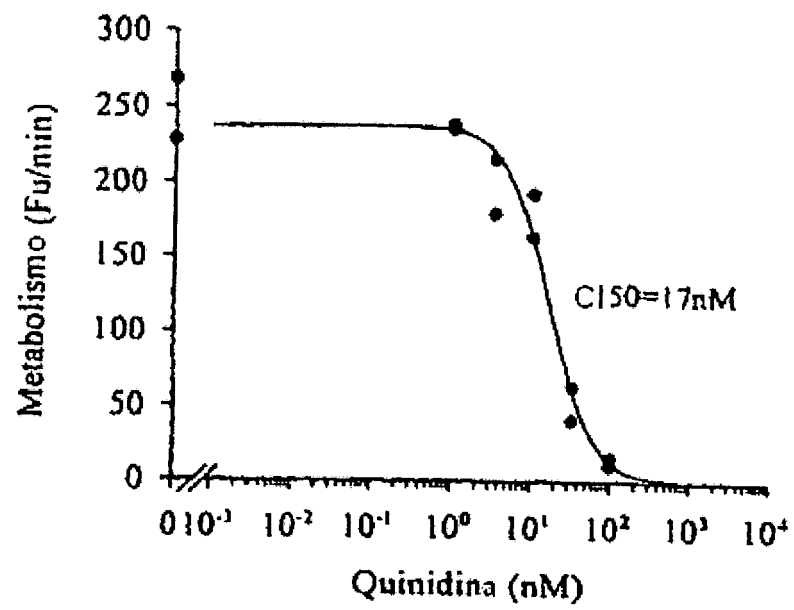


FIG. 1