



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 861**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Número de solicitud europea: **99948946 .1**
(86) Fecha de presentación : **04.10.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1119639**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2001**

(54) Título: **7-alcoxicumarinas como sustratos para CYP2C9.**

(30) Prioridad: **09.10.1998 GB 9822140**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

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

(72) Inventor/es: **Bambal, Ramesh, B. y**
Elliott, Richard, L.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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-alcoxicumarinas como sustratos para CYP2C9.

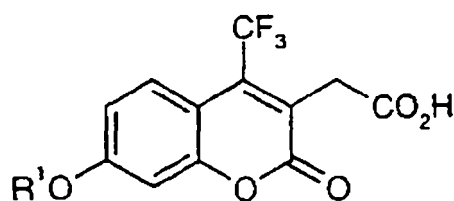
Esta invención se refiere a compuestos, a procedimientos para prepararlos y a su uso como sustratos enzimáticos.

La mayoría de las interacciones de los fármacos basadas en el metabolismo son un resultado de la inhibición de las enzimas del grupo del citocromo P450. Las interacciones de fármacos que implican enzimas P450 individuales pueden predecirse usando métodos *in vitro*. Los ensayos típicos *in vitro* con enzimas P450 implican la incubación de un sustrato apropiado con una fuente de la enzima. Tradicionalmente, para la detección de metabolitos en estas incubaciones se han usado métodos cromatográficos de larga duración. Más recientemente, la disponibilidad de lectores fluorimétricos de placas ha facilitado en general los ensayos enzimáticos de mayor productividad. Adaptar los ensayos con enzimas P450 a la tecnología de lectores de placas fluorescentes requiere la identificación de sustratos con productos fluorescentes apropiados para enzimas individuales. Entre los citocromos P450 que metabolizan compuestos xenobióticos, el citocromo CYP2C9 es uno de los normalmente responsables del metabolismo de fármacos.

Para los ensayos de alta productividad de exploración de la inhibición del citocromo CYP2C9 se ha descrito la 3-ciano-7-etoxicumarina (Crespi *et al*, Anal. Biochem., 1997; 248, 188-190). Sin embargo, la velocidad del metabolismo de la 3-ciano-7-etoxicumarina por el citocromo CYP2C9 es baja y la extensión de la inhibición de la 3-ciano-7-etoxicumarina O-desalquilasa no siempre se correlaciona bien con un ensayo de extracción en fase sólida para el citocromo CYP2C9, por tanto la 3-ciano-7-etoxicumarina no es adecuada para los ensayos de exploración de alta productividad.

Ahora, se han identificado ciertos compuestos que son mejores sustratos del citocromo CYP2C9 y que son de uso para configurar ensayos de exploración de la inhibición de alta productividad.

Según la presente invención, se proporciona un ensayo para probar agentes inhibidores de la enzima CYP2C9 el cual comprende poner en contacto a la enzima y a un compuesto de fórmula (I):



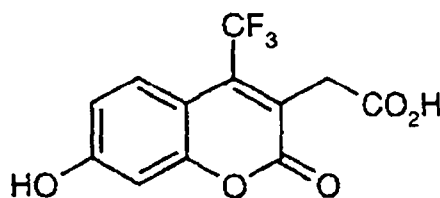
(I)

en la que R¹ representa un grupo alquilo de C₁₋₂, con un compuesto a ensayar y medir la inhibición de la O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima.

En un aspecto preferido de la invención R¹ es un grupo metilo.

En general, se conocerá la velocidad de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) en ausencia de compuesto a ensayar, como se conocerá la extensión de O-desalquilación en momentos de tiempo dados. El ensayo puede probar la inhibición de la O-desalquilación continuamente o en momentos de tiempo especificados.

La O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) tras la incubación con el citocromo CYP2C9 da un producto fluorescente fácilmente cuantificable de fórmula (II):



(II)

el cual puede someterse a un barrido con longitudes de onda de excitación y de emisión adecuadas, por ejemplo una longitud de onda de excitación de 410 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm.

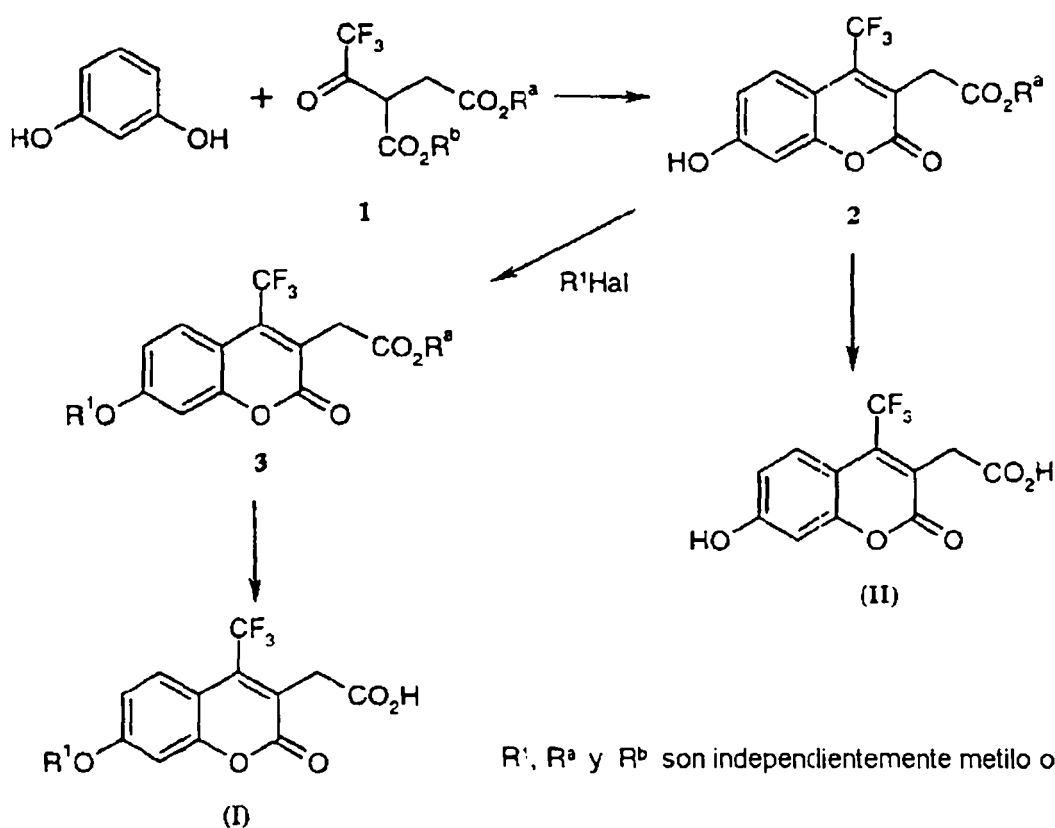
El ensayo puede llevarse a cabo en disolución o usando un producto sólido. Cuando el ensayo se lleva a cabo en disolución, los disolventes adecuados incluyen metanol, acetonitrilo y DMSO.

El compuesto a ensayar puede preincubarse con la enzima antes de la adición del sustrato, o alternativamente el sustrato se puede añadir simultáneamente. Para conseguir una velocidad adecuada de procesado para llevar a cabo el ensayo se calculan las concentraciones finales de enzima y sustrato. Si se desea, la reacción puede pararse, por ejemplo por adición de un ácido o de un disolvente. El producto fluorescente de fórmula (II) puede analizarse usando cualquier sistema convencional de detección de fluorescencia, por ejemplo un sistema tipo placa de múltiples pocillos/lector de placas fluorescentes.

Los compuestos de fórmula (I) y (II) son nuevos y como tales forman parte de la invención.

Los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden prepararse por métodos convencionales, como por ejemplo se muestra en el Esquema 1:

Esquema 1



Así, según otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I) o (II), el cual comprende:

a) reacción de resorcinol y un trifluoroacetosuccinato de dialquilo en el que los grupos alquilo se seleccionan independientemente de un grupo alquilo de C_{1-2} , en presencia de ácido polifosfórico;

b) Para los compuestos de fórmula (I), reacción de la 7-hidroxicumarina resultante con un compuesto de fórmula R^1Hal , en la que R^1 es un grupo alquilo de C_{1-2} y Hal es un átomo de halógeno, por ejemplo yodo o bromo; y

c) hidrólisis del éster para dar el ácido de fórmula (I) o (II).

La reacción de resorcinol con un trifluoroacetosuccinato de dialquilo en presencia de ácido polifosfórico puede realizarse adecuadamente a una temperatura de aproximadamente 15-30°C.

Las condiciones típicas de reacción para la alquilación de una 7-hidroxicumarina con un haluro de alquilo son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen un disolvente tal como acetona a reflujo en presencia de una base tal como carbonato de potasio.

ES 2 294 861 T3

Las condiciones de reacción típicas para la hidrólisis del éster son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen ácido clorhídrico diluido en metanol o etanol a reflujo.

5 Los trifluoroacetosuccinatos de dialquilo de fórmula 1 pueden prepararse a partir de los correspondientes bromoacetato de alquilo y trifluoroacetoacetato de alquilo según la ruta descrita en C. Aubert *et al.* J. Fluorine Chem. 1989, 44, 361. Los bromoacetatos y trifluoroacetoacetatos de alquilo están comercialmente disponibles.

10 Puesto que la inhibición de las enzimas del grupo del citocromo P450 es con frecuencia el mecanismo de las interacciones fármaco/fármaco, el ensayo según la invención es particularmente útil para identificar compuestos que pueden dar lugar a interacciones fármaco/fármaco adversas. Por lo tanto, el ensayo puede usarse en combinación con la modificación química de los compuestos a ensayar para aumentar el potencial del compuesto a ensayar para su uso como fármaco.

15 La modificación química del compuesto a ensayar según este método puede realizarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

La actividad farmacéutica de tales compuestos puede averiguarse fácilmente usando métodos biológicos de exploración convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

20 La invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

Ejemplo

Preparación de ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético

25 a) Éster de etilo del ácido 7-hidroxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético [2, $R^a = Et$]

Se añade ácido polifosfórico (45 g) a una mezcla de resorcinol (4,06 g) y trifluoroacetosuccinato de dietilo (9,96 g) (Aubert, C.; Begue, J. P.; Charpentier-Morize, M.; Nee, G.; Langlois, B. J. Fluorine Chem. 1989, 44, 361). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió hielo triturado y la mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, después se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice (eluyente metanol al 2% en diclorometano) para dar el compuesto del título (1,24 g) p.f. 112,5 - 114,0°C. δ_H ($CDCl_3$) 1,30 (t, 3H), 3,96 (m, 2H), 4,24 (q, 2H), 6,66 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 6,75 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,55 (m, 1H); espectro de masas m/z 317 (MH^+).

35 b) Éster de etilo del ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético [3, $R^1 = Me$, $R^a = Et$]

Se añadió yoduro de metilo (0,41 mL) a una mezcla de 2 (0,7 g), carbonato de potasio (0,46 g) y acetona (15 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 h. Después de enfriar, el disolvente se evaporó y el residuo se repartió entre diclorometano y agua. La fase orgánica se lavó con agua y después se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice (eluyente, metanol al 0,5% en diclorometano) para dar el compuesto del título (0,62 g). δ_H ($CDCl_3$) 1,26 (t, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,94 (m, 2H), 4,19 (q, 2H), 6,86 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 6,91 (dd, $J = 9,2, 2,6$ Hz, 1H), 7,70 (m, 1H); espectro de masas m/z 331 (MH^+).

45 c) Ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético [(I), $R^1 = Me$]

Se calentó a reflujo una mezcla de 3 (0,615 g), etanol (5 mL) y ácido clorhídrico diluido (3 M, 100 mL). Después de 6 h, la mezcla se enfrió y el sólido se recogió por filtración. El sólido seco se cristalizó en éter de dietilo/hexano para dar el compuesto del título (0,475 g) p.f. 198,5 - 200,0°C (Encontrado: C, 51,60; H, 2,82. $C_{13}H_9F_3O_5$ requiere C, 51,67; H, 3,00%); δ_H ($CDCl_3$) 3,90 (s, 3H), 3,94 (m, 2H), 6,87 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 6,92 (dd $J = 9,2, 2,6$ Hz, 1H), 7,70 (m, 1H); espectro de masas m/z 325 ($M + Na^+$), 303 (MH^+), 285 ($M - OH^-$).

Metodología de ensayo

55 Materiales

Ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético 6,25 mM (es decir, 1,88 mg/mL en DMSO).

60 $NaHCO_3$ al 2% en peso - almacenado a aproximadamente 4°C.

Disolución amortiguadora del pH de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4.

Disolución del cofactor recientemente preparada: aproximadamente lo siguiente por mL de $NaHCO_3$ al 2% en peso:

65 NADP, sal monosódica, 1,7 mg.

ES 2 294 861 T3

Glucosa-6-fosfato, sal monosódica, 7,8 mg.

6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Tipo VII, de Bakers.

Levadura.

Método

1) Se mezclan, por incubación, 1 μL de ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético 6,25 mM, 10 μL (100 μg) de proteína microsomal de citocromo CYP2C9 y 209 μL de disolución amortiguadora del pH (lo que da una concentración final de 25 μM de ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína).

2) A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 220 μL de mezcla de incubación y 5 μL de compuesto a ensayar en metanol. (o 5 μL de disolvente apropiado para los pocillos testigo - pueden usarse metanol, acetonitrilo o DMSO).

3) La placa de múltiples pocillos se preincuba en un lector de placas a 37°C durante 5 minutos. La disolución del cofactor se precalienta a 37°C durante 5 minutos.

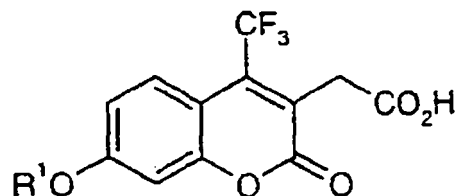
4) Se añaden 25 μL de disolución del cofactor a cada pocillo y se realiza un barrido con una longitud de onda de excitación de 410 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm con una ganancia de 80. Se realiza el barrido durante 10 ciclos a intervalos de 1 minuto.

Resultados

La confirmación del ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético como sustrato del citocromo CYP2C9 se logró usando sulfafenazol, un agente inhibidor de diagnóstico del citocromo CYP2C9 (Back *et al*, British Journal of Clinical Pharmacology, 1988, 26, 23-29). El ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético fue inhibido por el sulfafenazol con un IC_{50} de 0,29 μM (Figura 1), un valor típico de inhibición de otros sustratos, bien caracterizados, del citocromo CYP2C9.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ensayo para probar agentes inhibidores de la enzima CYP2C9, que comprende poner en contacto la enzima y un compuesto de fórmula (I):

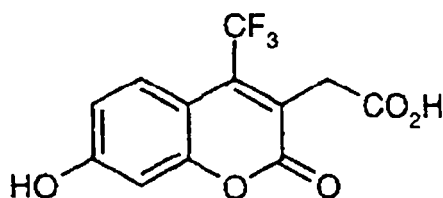


(I)

10 en la que R¹ representa un grupo alquilo de C₁₋₂, con un compuesto a ensayar y medir la inhibición de la O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima.

- 20 2. El ensayo según la reivindicación 1, en el que R¹ es un grupo metilo.

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



(II)

- 35 4. El ensayo según la reivindicación 3, en el que el compuesto de fórmula (II) se cuantifica mediante detección de fluorescencia.

- 40 5. El ensayo según la reivindicación 4, en el que el compuesto de fórmula (II) se cuantifica realizando un barrido a una longitud de onda de excitación de 410 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm.

6. Un compuesto de fórmula (I) o (II), según la reivindicación 1 ó 3.

- 45 7. Un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I) o (II) según la reivindicación 1 ó 3, que comprende:

a) reacción de resorcinol y un trifluoroacetosuccinato de dialquilo en el que los grupos alquilo se seleccionan independientemente de un grupo alquilo de C₁₋₂, en presencia de ácido polifosfórico;

50 b) para los compuestos de fórmula (I), reacción de la 7-hidroxycumarina resultante con un compuesto de fórmula R¹Hal, en la que R¹ es un grupo alquilo de C₁₋₂ y Hal es un átomo de halógeno, por ejemplo yodo o bromo; e

c) hidrólisis del éster para dar el ácido de fórmula (I) o (II).

Figura 1: Inhibición del metabolismo del ácido 7-metoxi-4-trifluorometilcumarin-3-acético con sulfafenazol

