



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 225**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00990692 .6**

86 Fecha de presentación : **08.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1238097**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Dietoxifluoresceína como indicador para citocromo P450.**

30 Prioridad: **13.12.1999 US 170405 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

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

72 Inventor/es: **Bambal, Ramesh y**
Bloomer, Jacqueline, Carol

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

Dietoxifluoresceína como indicador para citocromo P450.

Esta invención se refiere al uso de un derivado de fluoresceína como sustrato para enzimas del citocromo P450.

La mayoría de las interacciones de los fármacos basadas en el metabolismo son resultado de la inhibición de las enzimas del citocromo P450. Las interacciones de los fármacos que implican enzimas de P450 individuales se pueden predecir usando métodos *in vitro*. Los ensayos de enzimas de P450 *in vitro*, típicos, implican la incubación de un sustrato apropiado con una fuente de enzima. Tradicionalmente, se han usado métodos cromatográficos que exigen mucho tiempo para la detección de metabolitos en estas incubaciones. Más recientemente, la disponibilidad de lectores de placas fluorimétricas ha facilitado el rendimiento más alto de los ensayos enzimáticos en general. Los ensayos de P450 de adaptación a la tecnología de los lectores de placas fluorescentes requieren la identificación de los sustratos con productos fluorescentes apropiados para enzimas individuales. Entre los citocromos P450 de metabolismo xenobiótico, CYP3A4 es uno de los comúnmente responsables del metabolismo de los fármacos. También se ha identificado que el CYP2C8 es responsable del metabolismo de algunos fármacos.

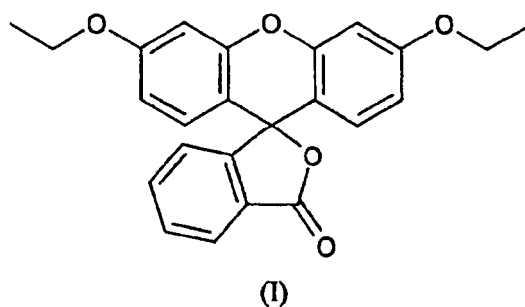
Se ha descrito la investigación de la inhibición del CYP3A4 de alto rendimiento (Crespi *et al*, *Anal. Biochem.*, 1997, **248**, 188-190) del éter bencílico de resorufina. Sin embargo, la proporción de metabolismo del éter bencílico de resorufina por CYP3A4 es baja, por lo tanto se requiere un sustrato de CYP3A4 más apropiado para permitir la investigación de la inhibición de rendimiento mayor. También se ha descrito el uso de dibencilfluoresceína como sustrato para CYP3A4 y CYP2C8, Crespi *et al*, "Innovative Technologies for the Study of Drug Metabolism", presentado en la 7ª Conferencia ISSX Europea, Budapest, Hungría, 22-26 de Agosto de 1999. Sin embargo este ensayo presenta una relación señal-ruido baja, por lo tanto, se requiere un sustrato CYP3A4 o CYP2C8 más apropiado para mejorar la sensibilidad para la investigación de la inhibición.

En Miller, *Anal. Biochem.*, 1983, **133**, 46-57 se describe el compuesto dietoxifluoresceína y la investigación de su metabolismo por homogenatos de hígado de ratón y células de hepatoma de ratón cultivadas. Miller concluye que la dietoxifluoresceína no es útil para la detección de citocromos P450 de ratón inducibles.

En la Patente Internacional WO 00/44933 se describe un derivado de resorufina como sustrato de CYP3A4.

Ahora se ha identificado la dietoxifluoresceína como un sustrato general para las enzimas de los citocromos P450 humanas. En particular la dietoxifluoresceína es un sustrato mejorado para CYP3A4 y CYP2C8, humanos, que es de uso para configurar ensayos de investigación de inhibición de alto rendimiento.

De acuerdo con la invención se proporciona un ensayo para identificar inhibidores de una enzima del citocromo CYP3A4 o CYP2C8P450, humana, que comprende poner en contacto la enzima y un compuesto de fórmula (I):

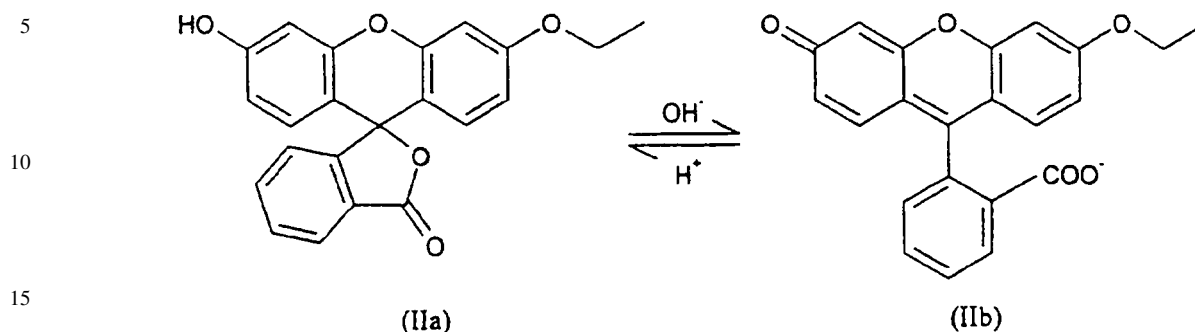


con un compuesto de ensayo y medir la inhibición de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima.

La enzima del citocromo P450 humana usada en el procedimiento de la invención es preferiblemente CYP3A4 o CYP2C8, más preferiblemente CYP3A4.

Generalmente se conocerá la proporción de O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) en ausencia de compuesto de ensayo, como lo será la extensión de la O-desalquilación en momentos puntuales dados. El ensayo puede identificar la inhibición de O-desalquilación continuamente o en momentos puntuales especificados.

La O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) siguiendo a la incubación con por ej., CYP3A4 o CYP2C8 da un compuesto O-desalquilado que existe en formas tautómeras como se muestra a continuación:



La lactona (IIa) no fluorescente predomina a pH bajos al tiempo que la forma (IIb) cargada fluorescente predomina a pH neutro a básico.

El producto fluorescente fácilmente cuantificable de fórmula (IIb) se puede explorar con escáner con longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas, por ejemplo una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La inhibición de la O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima se mide preferiblemente por cuantificación del compuesto de fórmula (IIb).

El ensayo se puede llevar a cabo bien en disolución o utilizando un soporte sólido en cuyo caso la enzima se puede unir a un soporte sólido. Cuando el ensayo se lleva a cabo en disolución, los disolventes adecuados incluyen metanol y acetonitrilo.

El ensayo se lleva a cabo preferiblemente en una disolución tamponada a un pH de 7,4 ó 7,5, por ejemplo, usando un tampón de fosfato de potasio o Tris HCl. El ensayo también se puede llevar a cabo en tampón de fosfato de potasio que contenga MgCl_2 10 mM. El ensayo se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de 37°C.

El compuesto de ensayo se puede incubar previamente con enzima previamente a la adición del sustrato o alternativamente se puede añadir el sustrato simultáneamente con el compuesto de ensayo. Las concentraciones finales de enzima y sustrato se calculan de manera que se consiga una proporción adecuada del proceso para llevar a cabo el ensayo. Si se desea, la reacción se puede detener, por ejemplo por adición de ácido o disolvente.

Como será evidente para los expertos en la materia, los cofactores para la enzima del citocromo P450 humana estará presente en el sistema de ensayo, los cofactores para enzimas del citocromo P450 humanas son (por sus siglas en inglés): NADP, glucosa-6-fosfato y glucosa-6-deshidrogenasa. Se pueden usar NADH o NADPH en vez de NADP. El ensayo se puede iniciar convenientemente por la adición de la disolución de cofactor, preferiblemente precalentada a 37°C, a la mezcla de compuesto de ensayo/enzima/sustrato.

Se puede analizar el producto fluorescente de fórmula (II) usando cualquier sistema convencional de detección de fluorescencia, por ejemplo un lector de placas de pozos múltiples/placa fluorescente.

Se puede preparar el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con el procedimiento descrito por Miller, *Anal. Biochem.*, 1983, **133**, 46-57.

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

Así, el ensayo de la presente invención puede ser beneficioso en esfuerzos para reducir la actividad inhibidora de la enzima del citocromo P450 humana de un compuesto identificado como inhibidor de una enzima del citocromo P450 de CYP3A4 o CYP2C8, humana, en el ensayo descrito anteriormente, produciendo una versión químicamente modificada del compuesto de ensayo en que se elimina o se cambia la funcionalidad que se sospecha que es responsable de la inhibición de la enzima del citocromo P450, humana.

Se puede llevar a cabo la modificación química de los compuestos de ensayo usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

La invención se ilustra por los siguientes Ejemplos y Figuras.

ES 2 269 225 T3

La Figura 1 muestra la inhibición de cetoconazol del metabolismo de la dietoxifluoresceína por CYP3A4.

La Figura 2 muestra la inhibición de la quercitina del metabolismo de la dietoxifluoresceína por CYP2C8.

5 Ejemplo 1

Metodología de ensayo para CYP3A4

Materiales

10 Dietoxifluoresceína 500 μ M, (es decir, 0,194 mg/ml en acetonitrilo) - almacenada a aprox. -20°C en la oscuridad

NaHCO₃ al 2% (p/v)- almacenado a aprox. 4°C

15 Tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4

Disolución de cofactor recientemente preparado:- aprox. lo siguiente por ml de NaHCO₃ al 2% (p/v)

1,7 mg de sal monosódica de NADP

20 7,8 mg de sal monosódica de glucosa-6-fosfato

6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Tipo VII de levaduras de panadería

Método

1) Precalentar la estufa de la lectora de placas a 37°C y precalentar la lámpara durante al menos 10 minutos.

2) Mezclar 2,5 μ l de dietoxifluoresceína 500 M, 4 μ l (40 μ g) de proteína microsomal de CYP3A4 y 213,5 μ l de tampón por incubado (dando dietoxifluoresceína 5 μ M y 160 μ g/ml de concentración final de proteína).

3) A cada pozo de una placa de 96 pozos se añaden 220 μ l de mezcla de incubación y 5 μ l de disolución de compuesto de ensayo (o 5 μ l de disolvente apropiado para pozos de control - se puede usar metanol o acetonitrilo).

4) Preincubar la placa de pozos múltiples en la lectora de placas, a 37°C, durante 5 minutos. Precalentar la disolución de cofactor, a 37°C, durante 5 minutos.

5) Añadir 25 μ l de disolución de cofactor a cada pozo y explorar con escáner con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm con un incremento de 80. Explorar con escáner durante 10 ciclos a intervalos de 1 minuto.

Resultados

45 Se consiguió confirmación de dietoxifluoresceína como un sustrato de CYP3A4 usando cetoconazol, un inhibidor de CYP3A4 de diagnóstico (Baldwin *et al*, *Xenobiotica*, 1995, **25**, 261-270). Con cetoconazol, se inhibió la dietoxifluoresceína con un IC₅₀ de 63 nM (Figura 1), un valor de inhibición típico de otros sustratos de CYP3A4, bien caracterizados.

50 Ejemplo 2

Metodología de ensayo para CYP2C8

Materiales

55 Dietoxifluoresceína 400 μ M, (es decir, 0,155 mg/ml en acetonitrilo) - almacenada a aprox. -20°C en la oscuridad

NaHCO₃ al 2% (p/v)- almacenado a aprox. 4°C

60 Tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4

Disolución de cofactor recientemente preparada:- aprox. lo siguiente por ml de NaHCO₃ al 2% (p/v)

1,7 mg de sal monosódica de NADP

65 7,8 mg de sal monosódica de glucosa-6-fosfato

6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Tipo VII de levadura de panadería

ES 2 269 225 T3

Método

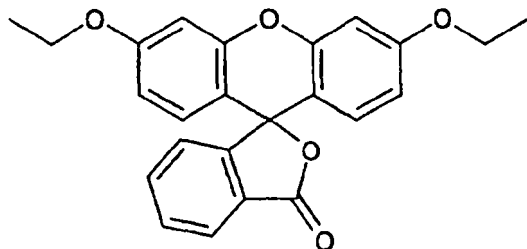
- 1) Precalentar la estufa de las lectoras de placas a 37°C y precalentar la lámpara durante al menos 10 minutos.
- 2) Mezclar 2,5 μ l de dietoxifluoresceína 400 μ M, 5 μ l (50 μ g) de proteína microsomal de CYP2C8 y 212,5 μ l de tampón por incubado (dando dietoxifluoresceína 4 μ M y 200 μ g/ml de concentración final de proteína).
- 3) A cada pozo de una placa de 96 pozos se añaden 220 μ l de mezcla de incubación y 5 μ l de disolución de compuesto de ensayo (o 5 μ l de disolvente apropiado para pozos de control - se pueden usar metanol, DMSO o acetonitrilo).
- 4) Preincubar la placa de pozos múltiples en la lectora de placas, a 37°C, durante 5 minutos. Precalentar la disolución de cofactor a 37°C, durante 5 minutos.
- 5) Añadir 25 μ l de disolución de cofactor a cada pozo y explorar con escáner con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm con un incremento de 80. Explorar con escáner durante 10 ciclos a intervalos de 1 minuto.

Resultados

Se consiguió confirmación de dietoxifluoresceína como sustrato de CYP2C8 usando quercitina, un inhibidor de CYP2C8 (Rahman *et al*, *Cancer Research*, 1.994, 54(1), 5.543-5.546). Con quercitina, se inhibió el metabolismo de la dietoxifluoresceína con un IC₅₀ de 3 μ M (Figura 2), un valor de inhibición típico de otros sustratos de CYP2C8, bien caracterizados.

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo para identificar inhibidores de una enzima del citocromo P450 CYP2C8 o CYP3A4, humana, que comprende poner en contacto la enzima y un compuesto de fórmula (I):

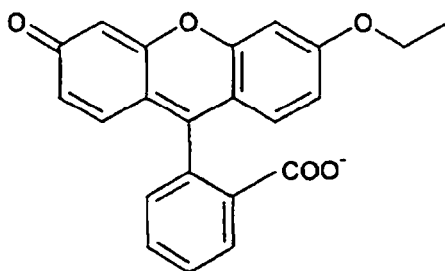


(I)

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 enzima del citocromo P450, humana, es CYP3A4.

3. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la inhibición de la O-desalquilación del compuesto de fórmula (I) por la enzima se mide cuantificando el compuesto de fórmula (IIb):



(IIb)

4. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el compuesto de fórmula (IIb) se cuantifica por detección por fluorescencia.

5. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el compuesto de fórmula (IIb) se cuantifica por exploración con escáner a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Figura 1: Inhibición por cetoconazol del metabolismo de la dietoxifluoresceína por CYP3A4

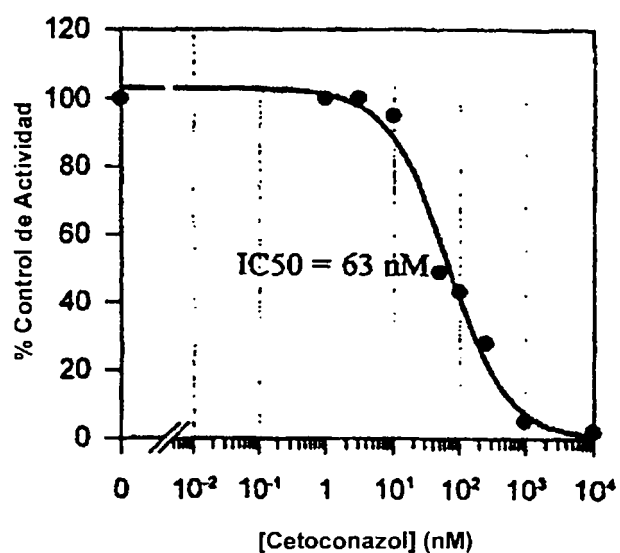


Figura 2: Inhibición por quercitina del metabolismo de la dietoxifluoresceína por CYP2C8

