



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 990**

51 Int. Cl.:
C07D 451/02 (2006.01)
C07D 401/00 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97917552 .8**
96 Fecha de presentación : **19.03.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0888345**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.1999**

54 Título: **Receptores σ -2 como biomarcadores de proliferación de células tumorales.**

30 Prioridad: **20.03.1996 US 13717 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2010

73 Titular/es: **Wake Forest University Health Sciences
Medical Center Boulevard
Winston-Salem, North Carolina 27157-1023, US**

72 Inventor/es: **Mach, Robert, H.;**
Wheeler, Kenneth, T., Jr.;
Yang, Biao y
Childers, Steven, R.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 342 990 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

Receptores σ -2 como biomarcadores de proliferación de células tumorales.

5 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de mama se caracteriza por un potencial proliferativo que puede variar considerablemente de un paciente a otro. Se ha demostrado que el índice de proliferación celular tumores de mama predice la respuesta a la radioterapia y a la quimioterapia. Actualmente, se obtienen medidas de proliferación celular por análisis histológico o citométrico de flujo. Ambos procedimientos están limitados por procedimientos de muestreo y sólo el 60-70% de las muestras de paciente son adecuadas para análisis citométrico de flujo. Se demostró recientemente que los receptores sigma-2 (σ 2) se expresan en alta densidad en varias líneas celulares de cáncer de mama humanas y de roedor (Cancer Research, 55, 408 (1995). Sin embargo, su expresión es heterogénea y su función se desconoce.

15 Existe la continua necesidad de procedimientos no invasivos que puedan evaluar con precisión el estado proliferativo del cáncer de mama. Dichos procedimientos podrían tener un impacto significativo sobre la determinación de una terapia óptima para tratar a los pacientes con cáncer de mama.

20 El documento de Patente de Estados Unidos N° 4.808.588 desvela ureas heterocíclicas y carbonatos útiles como productos farmacéuticos, siendo compuestos de la fórmula que se ilustra a continuación, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



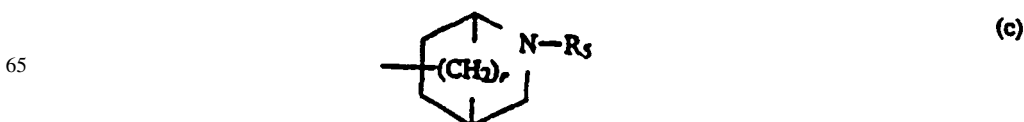
en la que:

35 Het es un heteroarilo monocíclico que tiene dos átomos de carbono adyacentes, a y b, representados en la fórmula (I); R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, CF₃, alquilo y alcoxi C₁₋₆;

R₃ es hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, metoxi-alqueno C₃₋₇, fenoxi o fenil alcoxi C₁₋₄ en el que el resto fenilo puede estar sustituido por uno o dos alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ o halo; CO₂R₆ en el que R₆ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆, CONR₇R₈ o SO₂NR₇R₈ en el que R₇ y R₈ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₆ o son juntos son polimetileno C₄₋₆, NO₂, (CH₂)_mOR₉ en la que m es 1 ó 2 y R₉ es alquilo C₁₋₆ o S(O)_nR₁₀ en la que n es 0, 1 ó 2 y R₁₀ es alquilo C₁₋₆ alquilo;

L es NH u O;

45 Z es un grupo de fórmula (a), (b) o (c);



ES 2 342 990 T3

en las que n es 2 ó 3; p es 1 ó 2; q es 1 a 3; r es de 1 a 3; y

R₄ o R₅ es alquilo C₁₋₄.

5

La Patente de Estados Unidos Nº 5.106.843 desvela compuestos heterocíclicos, particularmente derivados de ari-lureas y ácido carbámico de la fórmula general dada a continuación, que son útiles como antagonistas de 5-HT₃:

10

A-NHCW-Y-B

en la que A es un radical aromático específico incluyendo

3,5-diclorofenilo;

15

W es O o S;

Y es NH u O, y

20

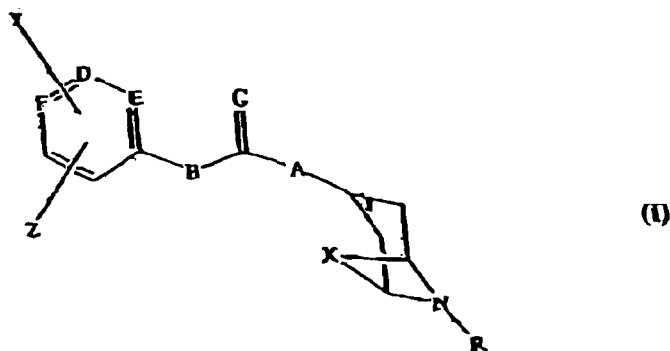
B es un anillo azacíclico saturado específico tal como tropan-3-ilo o quinuclidin-3-ilo.

Sumario de la invención

25

La presente invención proporciona un procedimiento no invasivo para detectar células cancerosas o para evaluar el estado de proliferación de células cancerosas que expresan receptores de sigma-2 (σ_2), tal como células de tumores sólidos. El procedimiento comprende preferentemente (a); poner en contacto una muestra celular del tumor *in vitro* con una cantidad de compuesto marcado detectable de fórmula (I):

30



40

45

en la que R es C₆F₅CH₂, o T-C₆H₄CH₂ en el que T es halo, CH₃S, CH₃O, NH₂ o H; A es NH, O o S, B es NH, O o S; G es O o S; D es CH o N; E es CH o N; F es CH o N; Y son Z son individualmente H, halo, OH, alquilo (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₄), alquilo (C₁-C₄)-C(O), alquilo (C₁-C₄)-S, NH₂, SH, N(R)₂ o juntos son OCH₂O, en las que dicho alquilo puede ser lineal, ramificado, cicloalquilo o alquil (cicloalquilo); X es (CH₂)₂, (CH₂)₃ o CH=CH; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en las que el marcador comprende un radionúclido; y (b) determinar el grado en el que el compuesto de fórmula (I) se une a las células de dicho tumor, dicho grado proporciona una medida del estado proliferativo de dicho tumor, cuyo estado que se correlaciona con el grado de expresión del receptor sigma-2 por dichas células. El procedimiento se basa en la habilidad del compuesto de fórmula (I) para unir selectivamente receptores de sigma-2 (σ_2) con receptores de σ_1 .

50

55

Los grupos Z e Y pueden ocupar cualquier posición del anillo, es decir, una cualquiera de E, D o F puede ser CY o CZ. Preferentemente, al menos uno de Y o Z no es H. Preferentemente A es O y B es NH. Preferentemente, R es CH, bencilo o fenilo. El alquilo puede ser ramificado, no ramificado, cicloalquilo o (cicloalquil)alquilo.

60

El marcador es un radionúclido, seleccionado entre un radioisótopo de halógeno (¹²⁵I, ¹²³I, ¹⁸F, ¹⁹F) o ¹¹C. El compuesto se administra preferentemente por vía parenteral, es decir, por administración por vía intravenosa, i.p., intratecal o enteral.

65

Los nuevos compuestos de fórmula (I), marcados y no marcados, también están dentro del ámbito de la invención, ya que son composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de dichos compuestos. Los compuestos no marcados pueden usarse como intermedios para preparar compuestos marcados o como ligandos específicos de sigma-2 que pueden usarse en ensayos competitivos para ensayar la presencia de receptores de σ_2 , como se describe a continuación. La configuración en la posición 3 puede ser *exo*- o *endo*-; de los cuales se prefiere *endo*-.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra compuestos de la invención.

5 La Fig. 2 muestra compuestos de la invención.

La Fig. 3 muestra compuestos de la invención.

Descripción detallada de la invención

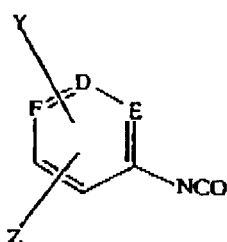
10

Se ilustran procedimientos para preparar compuestos de fórmula I mediante los siguientes procedimientos en los que los significados de los radicales genéricos son como se dan anteriormente a menos que se indique otra cosa.

15

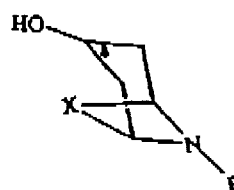
Los compuestos de fórmula I en los que A es oxígeno y B es nitrógeno pueden prepararse generalmente haciendo reaccionar un isocianato de fórmula II con un alcohol de fórmula III en condiciones convencionales.

20



(II)

25



(III)

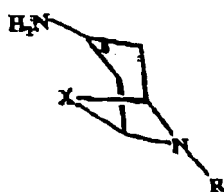
30

Los disolventes, bases y condiciones de reacción adecuados para una reacción de este tipo se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la reacción puede realizarse convenientemente en condiciones similares a aquellas descritas en el Ejemplo 1.

35

Los compuestos de fórmula I en los que A es nitrógeno y B es nitrógeno pueden prepararse generalmente haciendo reaccionar un isocianato de fórmula II con una amina de fórmula IV en condiciones convencionales.

40



(IV)

45

50

Los disolventes, bases y condiciones de reacción adecuados para una reacción de este tipo se conocen muy bien en la técnica.

55

Se observa que muchos de los materiales de partida que se emplean en los procedimientos descritos a continuación están disponibles en el mercado, se indican en la bibliografía científica, o se pueden preparar usando procedimientos análogos a los descritos en la bibliografía.

60

En casos en los que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácido o de base estables no tóxicas, puede ser apropiada la administración de los compuestos en forma de sales. Son ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión psicológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas, incluyendo clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y sales carbonato.

65

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico como una amina con un ácido adecuado produciendo un anión psicológicamente aceptable. También pueden prepararse sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

ES 2 342 990 T3

Los compuestos de fórmula I pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano en una diversidad de formas adaptadas a la vía de administración seleccionada, es decir, por vía oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

5 Por lo tanto, los presentes compuestos pueden administrarse por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina de carcasa dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidos que pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para su administración terapéutica oral, el compuesto puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, 10 trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deberían contener al menos el 0,1% del compuesto. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede por supuesto variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma farmacéutica monodosis dada. La cantidad de compuesto en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz. Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden 15 contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; pueden añadirse excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saporífero tal como menta, aceite de gauteria o aroma de cereza. Cuando la forma farmacéutica monodosis es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo 20 líquido tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes diversos otros materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma fisiológica de la forma farmacéutica monodosis sólida. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, píldoras o cápsulas con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y saporífero tal como sabor de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la 25 preparación de cualquier forma farmacéutica monodosis debería ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

Los presentes compuestos también pueden administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Puede prepararse soluciones de un compuesto o sus sales en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante que evita el desarrollo de microorganismos.

35 Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden un compuesto marcado o no marcado de fórmula I adaptado para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones infundibles o inyectables estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma farmacéutica última debe ser estéril, líquida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo o excipiente líquido puede ser un disolvente o medio de 40 dispersión líquido que comprenda, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada, puede mantenerse, por ejemplo, por formación de liposomas, por mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, 45 fenol, ácido sórbico, atimerosal y similares. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. Puede producirse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Se preparan soluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los otros agentes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y las técnicas de liofilización, que dan un polvo del compuesto de fórmula (I) marcado o no marcado más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones 55 previamente esterilizadas por filtración.

Para su administración tópica, los presentes compuestos pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable que puede ser un sólido o un líquido.

60 Pueden determinarse dosificaciones útiles de los compuestos de fórmula I comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en modelos animales. Se conocen en la técnica procedimientos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales a seres humanos; por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 4.938.949.

65 En general, la concentración del compuesto o compuestos de fórmula I en una composición líquida tal como una loción será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición sólida o semi-sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,5%-2,5% en peso. Las dosificaciones individuales para inyección,

ES 2 342 990 T3

infusión o ingestión variarán generalmente entre 50-1500 mg y pueden administrarse, es decir, 1-3 veces al día para dar niveles de aproximadamente 0,5-50 mg/kg para adultos.

5 Por consiguiente, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto marcado o no marcado de fórmula I como se ha descrito en el presente documento anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Los compuestos de fórmula (I) pueden marcarse usando cualquiera de varios procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede incorporarse un radioisótopo en dicho compuesto o añadirse a dicho compuesto de fórmula (I) usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas análogas de las descritas en: Arthur Murry III, D. Lloyd Williams; *Organic Synthesis with Isotopes*, vol. I y II, Interscience Publishers Inc., N.Y. (1958) y Melvin Calvin y col. *Isotopic Carbon* John Wiley and Sons Inc., N.Y. (1949). Preferentemente, un compuesto de fórmula (I) puede marcarse por adición de un radioisótopo de un halógeno al DEF que comprende un anillo aromático.

15 Además, un compuesto de fórmula (I) puede marcarse con un grupo quelante de metales que comprende opcionalmente un radionúclido tal como un radioisótopo metálico. Dichos grupos quelantes son bien conocidos en la técnica e incluyen ácidos policarboxílicos tales como, por ejemplo, ácido dietilentriaminopentacético, ácido etilendiaminotetracético y similares o análogos u homólogos de los mismos, así como los grupos quelantes descritos en S. Meegalla y col. *J. Am. Chem. Soc.* 117 11037-11038, 1995 y en S. Meegalla y col. *Bioconjugate Chem.* 7: 421-429, 1996.

20 El grupo quelante o el radionúclido del mismo puede unirse directamente a un compuesto de fórmula (I), o puede unirse a un compuesto de fórmula (I) por medio de un grupo de engarce orgánico bifuncional o divalente. Dichos grupos de engarce bifuncionales son bien conocidos en la técnica y tienen preferentemente menos de 50 ángstrom de longitud. Los ejemplos de grupos de engarce adecuados incluyen 2-aminoetilo, 2-mercaptoetilo, 2-aminopropilo, 2-mercaptopropilo, ácido ϵ -amino caproico, 1,4-diaminobutano y similares. Preferentemente, el grupo de engarce bifuncional se une a un compuesto de fórmula (I) en el nitrógeno cabeza de puente que está sustituido con el grupo R en la fórmula (I). Un compuesto de fórmula (I) que lleva un grupo de engarce puede prepararse convenientemente a partir de un compuesto de fórmula (I) en el que R es hidrógeno por alquilación del nitrógeno cabeza de puente. Se conocen bien en la técnica condiciones adecuadas para la alquilación de aminas secundarias. El grupo de engarce también puede unirse a cualquier posición sintéticamente viable. Por ejemplo, la Figura 3 muestra dos compuestos de la invención (compuestos V y VI) que son compuestos de fórmula (I), marcados con un grupo quelante de metales que comprende un radionúclido (M).

35 Cualquier radioisótopo metálico que pueda detectarse en un procedimiento de diagnóstico puede emplearse como radionúclido. Por ejemplo, los radioisótopos adecuados incluyen: Antimonio-124, Antimonio-125, Arsénico-74, Bario-103, Bario-140, Berilio-7, Bismuto-206, Bismuto-207, Cadmio-109, Cadmio-115m, Calcio-45, Cerio-139, Cerio-141, Cerio-144, Cesio-137, Cromio-51, 152, Gadolinio-153, Oro-195, Oro-199, Hafnio-175, Hafnio-175-181, Indio-111, Iridio-192, Hierro-55, Hierro-59, Cripton-85, Plomo-210, Manganeso-54, Mercurio-197, Mercurio-203, Molibdeno-99, Neodimio-147, Neptunio-237, Níquel-63, Niobio-95, Osmio-185 + 191, Paladio-103, Platino-195m, Praseodimio-143, Prometio-147, Protactinio-233, Radio-226, Renio-186, Rubidio-86, Rutenio-103, Rutenio-106, Escandio-44, Escandio-46, Selenio-75, Plata-110 ml, Plata-111, Sodio-22, Estroncio-85, Estroncio-89, Estroncio-90, Azufre-35, Tántalo-182, Tecnecio-99m, Telurio-125, Telurio-132, Talio-204, Torio-228, Torio-232, Talio-170, Estaño-113, Titanio-44, Tungsteno-185, Vanadio-48, Vanadio-49, Yterbio-169, Ytrio-88, Ytrio-90, Ytrio-91, Cinc-65 y Zirconio. Preferentemente, el tecnecio-99m puede ser útil para estudios de formación de imágenes SPECT y el renio-188, renio-186, cobre-64 y ytrio-90 pueden ser útiles para radioterapia de tumores de mama.

La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos detallados.

50 Ejemplo 1

55 En el presente estudio, se examinó la expresión de receptores σ_2 sobre células proliferativas (P) y quiescentes (Q) de la línea de adenocarcinoma mamario de ratón 66. Se realizaron análisis de Scatchard de receptores σ_2 sobre preparaciones de membrana de células 66 P (3 días de cultivo) y 66 Q (7, 10, 12 días de cultivo). Las membranas celulares (30 μ g de proteína) se incubaron con [3 H] 1,3-di-*o*-tolilguanidina ([3 H]DTG) 4 nM y cantidades variables DTG sin marcar (0,1-1000 nM) en presencia de (+)-pentazocina 100 nM, que enmascara receptores σ_1 . Los estudios de Scatchard pusieron de manifiesto que las células P tenían aproximadamente tres veces más receptores σ_2 /célula que las células Q de siete días y aproximadamente 10 veces más receptores σ_2 /célula que las células Q de 10 días. Por lo tanto, aunque > 97% de las células eran quiescentes después de 7 días en cultivo (Cell Tissue Kinet, 17, 65, (1984)), el diferencial máximo en la expresión de σ_2 entre células 66 P y Q no se alcanzaba hasta que estas se habían estado en cultivo durante 10 días (véase la Tabla 1).

65

ES 2 342 990 T3

TABLA 1

		<u>Células de 7 días</u>		
		células P	células Q	relación P:Q
5	receptores/célula	$5,10 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	2,8
	Kd \pm E.T.M	$56,3 \pm 7,3$	$41,6 \pm 4,3$	--
10		<u>Células de 10 días</u>		
	receptores/célula	$8,40 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	9,8
15	Kd \pm E.T.M	$43,8 \pm 8,1$	$34,0 \pm 7,2$	--

La diferencia en receptores/células entre las células Q de día 7 y de día 10 indican que la quiescencia prolongada da como resultado una regulación negativa de receptores delta 2.

Ejemplo 2

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(3',4'-diclorofenil)-carbamato (2)

Una mezcla de (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanol (100 mg, 0,43 mmol) y el isocianato de 3,4-diclorofenilo (78 mg, 0,43 mmol) en tolueno seco (10 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de un periodo de refrigeración, la solución orgánica se hizo alcalina con una solución saturada de bicarbonato sódico y después se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml). Las fases orgánicas se combinaron se secaron con sulfato sódico. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/acetato de etilo, dando el compuesto del título.

RMN (CDCl₃) δ 1,14-1,58 (m, 4H), 1,92-2,15 (m, 4H), 2,42-2,52 (m, 2H), 3,01-3,07 (d, $\Delta J = 21$ Hz, 2H), 3,80 (s, 2H), 5,20-5,29 (p, 1H), 6,58 (s, 1H), 7,13-7,65 (m, 8H).

Ejemplo 3

Una mezcla de (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanol (100 mg, 0,43 mmol) y el isocianato de 2,5-dimetoxifenilo (78 mg, 0,43 mmol) en tolueno seco (10 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de un periodo de refrigeración, la solución orgánica hizo alcalina con una solución saturada de bicarbonato sódico y después se extrajo con cloroformo (3 x 20 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato sódico. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/acetato de etilo, dando el compuesto del título.

RMN (CDCl₃) δ 1,41-2,18 (m, 8H), 2,42-2,52 (m, 2H), 2,99-3,04 (d, $\Delta J = 15$ Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,80 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 5,21-5,30 (p, 1H), 6,49-7,36 (m, 8H), 7,85 (s a, 1H).

Ejemplo 4

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(5'-cloro-2',4'-dimetoxifenil)-carbamato (4)

Una mezcla de (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanol (100 mg, 0,43 mmol) y el isocianato 5-cloro-2,4-dimetoxifenilo (91,85 mg, 0,43 mmol) en diclorometano seco (10 ml) se agitó con diacetato de dibutilestano (2 gotas) durante 12 horas. La solución organizada se concentró a sequedad al vacío. El aceite vítreo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con 1:1:0,02 de EtOAc:hexano:trietilamina. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/EtOAc, dando el compuesto del título.

RMN (CDCl₃) δ 1,45-2,22 (m, 8H), 2,50-2,55 (m, 2H), 3,01-3,06 (d, $\Delta J = 15$ Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,82 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 5,24-5,30 (p, 1H), 6,97-7,36 (m, 7H), 8,04 (s a, 1H).

Ejemplo 5

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(2'-cloro-5'-metoxifenil)-carbamato (5)

Una mezcla de (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanol (100 mg, 0,43 mmol) y el isocianato de 5-cloro-2-metoxifenilo (78,94 mg, 0,43 mmol) en diclorometano seco (10 ml) se agitó con diacetato de dibutilestano (2 gotas) durante 12 horas. La solución orgánica se concentró a sequedad al vacío. El aceite vítreo resultante se cromatografió

ES 2 342 990 T3

sobre gel de sílice con 1:1:0,02 de EtOAc:hexano:triethylamina. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/EtOAc, dando el compuesto del título.

5 RMN (CDCl₃) δ 1,39-2,18 (m, 8H), 2,42-2,53 (m, 2H), 2,99-3,03 (d, DJ =15 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,81 (s, 2H), 5,24-5,32 (p, 1H), 6,75-7,21 (m, 8H), 8,14 (s a, 1H).

Ejemplo 6

10 *(3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octil-3-N-(2',5'-dimetoxifenil)-carbamato (6)*

Una mezcla de (3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octanol (100 mg, 0,46 mmol) y el isocianato de 2,5-dimetoxifenilo (82 mg, 0,46 mmol) en diclorometano seco (10 ml) se agitó con diacetato de dibutylestano (2 gotas) durante 12 horas. La solución orgánica se concentró a sequedad al vacío. El aceite vítreo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con 1:1:0,02 de EtOAc:hexano:triethylamina. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/EtOAc, dando el compuesto del título.

20 RMN (CDCl₃) δ 1,80-3,22 (m, 8H), 3,64 (s a, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 4,05 (s, 2H), 5,22-5,32 (m, 1H), 6,64-7,40 (m, 8H), 8,14 (s a, 1H).

Ejemplo 7

25 *(3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octil-3-N-(3',4'-diclorofenil)-carbamato (7)*

Una mezcla de (3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octanol (100 mg, 0,46 mmol) y el isocianato de 3,4-diclorofenilo (86 mg, 0,46 mmol) en diclorometano seco (10 ml) se agitó con diacetato de dibutylestano (2 gotas) durante 12 horas. La solución orgánica se concentró a sequedad al vacío. El aceite vítreo resultante se cromatografió sobre gel de sílice con 1:1:0,02 de EtOAc:hexano:triethylamina. El disolvente se retiró al vacío y el residuo cristalizó en pentano/EtOAc, dando el compuesto del título.

30 RMN (CDCl₃) δ 1,79-3,20 (m, 8H), 3,66 (s a, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 4,05 (s, 2H), 5,19-5,30 (m, 1H), 7,22-7,81 (m, 8H), 8,24 (s a, 1H).

35 Ejemplo 8

La capacidad de los siguientes compuestos para unirse selectivamente a receptores de σ_2 puede demostrarse por la medición de sus afinidades a receptores sigma usando ensayos de unión a receptor conocidos (Mach y col. Life Sciences, 57, PL57-62 (1995)).

40

Ejemplo 9

45 *Estudios farmacológicos*

A. Unión a Receptor Sigma

Los sitios de unión a Sigma-1 se marcaron el radioligando σ_1 -selectivo, [³H](+)-pentazocina (Dupont-NEN) en membranas cerebrales de cobaya (Rockland Biological). Se ensayaron sitios Sigma-2 en membranas hepáticas de rata con [³H]DTG (Dupont-MEN) en presencia de (+)-pentazocina (100 nM). También se ensayó el sitio Sigma-2 en membranas de cobaya con [³H]DTG en presencia de (+)-pentazocina (100 nM).

50

B. Ensayo de Unión σ_1

55 Se incubaron membranas cerebrales de cobaya (100 μ g de proteína) con [³H](+)-pentazocina 3 nM (31,6 Ci/mmol) en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a 25°C durante 120 ó 240 minutos. Los compuestos de ensayo se disolvieron en etanol (7 concentraciones que variaban de 1-1000 nM) y después de diluyeron en tampón para un volumen de incubación total de 0,5 ml. Los ensayos se terminaron por adición de Tris-HCl 10 mM enfriado en hielo, pH 8,0 seguido de filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (preempapados en polietileno al 0,5%) usando un recolector de células Brandel (Gaithersburg, MD). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón enfriado en hielo. Se determinó la unión inespecífica en presencia de (+)-pentazocina 10 μ M. Se realizó el recuento de escintilación líquida en EcoLite (+) (ICN Radiochemicals; Costa Mesa, CA) usando un espectrómetro Beckman LS 6000IC con una eficacia de recuento del 50%. Los recuentos típicos eran de 70 dpm/ μ g proteína para unión total, 6 dpm/ μ g proteína para unión inespecífica y 64 dpm/ μ g proteína para unión específica.

65

ES 2 342 990 T3

C. Ensayo de Unión σ_2

Se incubaron membranas hepáticas de rata (35 μg de proteína) o membranas cerebrales de cobaya con [^3H]DTG 3 nM (360 μg) en presencia (+)-pentazocina 100 nM para enmascarar sitios σ_1 . Las incubaciones se llevaron a cabo usando el compuesto de los Ejemplos 2-5 y el antagonista competitivo (7 concentraciones diferentes que variaban de 1-1000 nM) en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 durante 120 minutos a 25°C en un volumen de incubación total de 0,5 ml. Los ensayos se determinaron por adición de Tris-HCl 10 mM enfriado en hielo, pH 8,0 seguido de filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (preempapados en polietilenimina al 0,5%) usando un recolector de células Brandel (Gaithersburg, MD). Después, los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de tampón enfriado en hielo. Se determinó la unión inespecífica en presencia de DTG 5 μM . Se realizó el recuento de escintilación líquida en EcoLite (+) (ICN Radiochemicals; Costa Mesa, CA) usando un espectrómetro Beckman LS 6000IC con una eficacia de recuento del 50%. Los recuentos típicos para hígado de rata eran de 297 dpm/ μg de proteína para unión total, 11 dpm/ μg de proteína para unión inespecífica y 286 dpm/ μg de proteína para unión específica. Los recuentos típicos para cerebro de cobaya eran de 16 dpm/ μg de proteína para unión total, 2 dpm/ μg de proteína para unión inespecífica y 14 dpm/ μg de proteína para unión específica.

D. Análisis de Datos

Los valores de CI_{50} en sitios sigma se determinaron por triplicado a partir de una regresión no lineal de los datos de unión según se analizó por JMP (SAS Institute; Cary, NC), usando 5-10 concentraciones de cada compuesto. Se calcularon los valores K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff, representan los valores medios \pm ETM. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a menos que se indicará otra cosa. El valor K_d usado para [^3H]DTG en hígado de rata era 17,9 nM y era de 4,8 nM para [^3H](+)-pentazocina en cerebro de cobaya. El valor K_d para [^3H]DTG en cerebro de cobaya se determinó por análisis de Scatchard separados que era de 21,6 nM.

E. Resultados

Los datos de unión *in vitro* para los compuestos descritos en la presente solicitud de patentes se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

	K_i [nM]	
	σ_1	σ_2
Compuesto 2	33,3	91,9
Compuesto 3	329,1	28,2
Compuesto 4	189	22,9
Compuesto 5	> 1000	63,5
Compuesto 6	72,4	22,1
Compuesto 7	716	16,2

Generalmente compuestos de la invención demuestran una alta selectividad por receptores σ_2 frente a σ_1 .

Se cree que los compuestos de fórmula pueden proporcionar ligandos marcados de forma detectable que pueden unirse selectivamente a células transportadoras y pueden cuantificarse usando técnicas de formación de imágenes funcionales tales como tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT) y formación de imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI). Dichos componentes tienen el potencial de evaluar de forma no invasiva el estado proliferativo de células tumorales conocidas o sospechosas o células sometidas a hiperplasia, en vejiga, colon, próstata, mama, pulmón, intestino, páncreas, sistema reproductor, cerebro y similares. Los compuestos de fórmula (I) marcados también pueden usarse para tratar el cáncer o células en división anormal inhibiendo selectivamente su proliferación.

REIVINDICACIONES

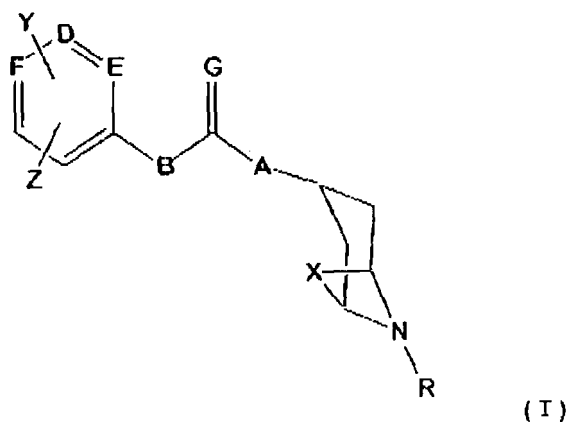
1. Un compuesto de fórmula (I):

5

10

15

20



en la que

25

R es $C_6F_5CH_2$, y T- $C_6H_4CH_2$ en la que T es halo, CH_2S , CH_3O , NH_2 o H;

A es NH, O o S;

B es NH, O o S;

30

G es O o S;

D es CH o N;

35

E es CH o N;

F es CH o N;

40

Y y Z son individualmente H, halo, OH, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), alquilo (C_1-C_4)-C(O), alquil (C_1-C_4)-S, NH_2 , SH, $N(R)_2$ o juntos son OCH_2O , en las que dicho alquilo puede ser lineal, ramificado, cicloalquilo o (cicloalquil)alquilo; y

X es $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$ o $CH=CH$;

45

o su sal farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A es O o S.

50

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que G es S.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que D es CH.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que E es CH.

55

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y y Z son individualmente H, halo, OH, alquilo (C_1-C_4), alquilo (C_1-C_4)-C(O), alquilo (C_1-C_4)-S, NH_2 , SH, $N(R)_2$ o juntos son OCH_2O .

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es $(CH_2)_3$ o $CH=CH$.

60

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y y Z son ambos alcoxi (C_1-C_4).

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que D es N.

65

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que E es N.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que F es N.

ES 2 342 990 T3

12. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y y Z son H.

13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en:

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(3',4'-diclorofenil)-carbamato;

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(2',5'-dimetoxifenil)-carbamato;

(3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(2'-cloro-5'-metoxifenil)-carbamato;

(3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octil-3-N-(2',5'-dimetoxifenil)-carbamato; o

(3-endo)-8-bencil-8-azabicyclo[3,2,1]octil-3-N-(3',4'-diclorofenil)-carbamato;

o su sal farmacéuticamente aceptable;

o un derivado marcado detectable del compuesto seleccionado o de su sal farmacéuticamente aceptable, en el que el marcador comprende un radionúclido.

14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13 que es (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(2',5'-dimetoxifenil)-carbamato.

15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que

R es bencilo;

A es O;

B es NH;

G es O;

E es CH;

F es CH;

cada uno de Y y Z es metoxi

X es (CH₂)₃;

e incluyendo adicionalmente un sustituyente adicional en el anillo fenilo, en el que el compuesto es (3-endo)-9-bencil-9-azabicyclo[3.3.1]nonanil-3-N-(5'-cloro-2',4'-dimetoxifenil)-carbamato.

16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en el que dicho compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable es marcado de forma detectable y en el que el marcador comprende un radionúclido.

17. Un compuesto de la reivindicación 16, en el que E, D y F son CH.

18. Un compuesto de la reivindicación 16, en el que B es NH y A es O.

19. Un compuesto de la reivindicación 16, en el que Y y Z son halo.

20. Un compuesto de la reivindicación 16, en el que Y y Z son OCH₃.

21. Un compuesto de la reivindicación 16, en el que R es bencilo o CH₃.

22. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el alquilo puede ser de cadena lineal, ramificado, cicloalquilo o (cicloalquil)alquilo; y cuyo compuesto está marcado de forma detectable añadiendo un radioisótopo de un halógeno al anillo aromático que comprende DEF; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

23. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el alquilo puede ser de cadena lineal, ramificado, cicloalquilo, o (cicloalquil)alquilo; y dicho compuesto está marcado de forma detectable con un grupo quelante metálico que comprende un radionúclido; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 342 990 T3

24. El compuesto de la reivindicación 23, en el que el grupo quelante metálico se añade directamente a un compuesto de fórmula (I), o el grupo quelante metálico se une a un compuesto de fórmula (I) por medio de un grupo enlazador orgánico divalente o difuncional.

5 25. El compuesto de la reivindicación 24, en el que el grupo enlazador bifuncional es 2-aminoetilo, 2-mercaptoetilo, 2-aminopropilo, 2-mercaptopropilo, ácido e-amino caproico o 1,4-diaminobutano.

26. El compuesto de la reivindicación 23, en el que el radionúclido es un radioisótopo metálico.

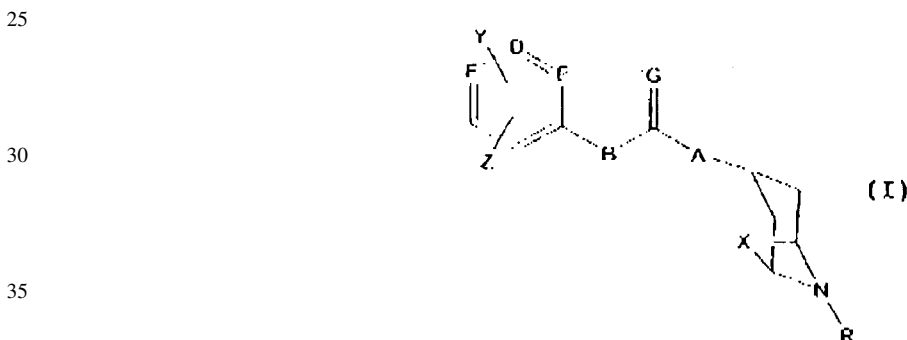
10 27. El compuesto de la reivindicación 24 en el que el grupo enlazador bifuncional es menor de 5 nm (50 ángstrom) de longitud.

28. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21; y un diluyente farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 29. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Un procedimiento para determinar el estado de proliferación de un tumor que comprende:

20 (a) poner en contacto una muestra celular *in vitro* del tumor con un compuesto marcado de forma detectable de fórmula (I):



40 en el que el marcador comprende un radionúclido y

R es $C_6F_5CH_2$, y T- CH_4CH_2 en el que T es halo, CH_2S , CH_3O , NH_2 o H;

45 A es NH, O o S;

B es NH, O o S;

G es O o S;

50 D es CH o N;

E es CH o N;

55 F es CH o N;

Y y Z son individualmente H, halo, OH, alquilo (C_1-C_4), alcoxi (C_1-C_4), alquilo (C_1-C_4)-C(O), alquilo (C_1-C_4)-S, NH_2 , SH, $N(R)_2$ o juntos son OCH_2O , en el que dicho alquilo puede ser lineal, ramificado, cicloalquilo o (cicloalquil)alquilo;

60 X es $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$ o $CH=CH$;

o su sal farmacéuticamente aceptable; y

65 (b) determinar el grado en que el compuesto de fórmula (I) se une a las células de dicho tumor, proporcionando dicho grado una medición del estado de proliferación de dicho tumor.

ES 2 342 990 T3

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que E, D y F son CH.

32. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que B es NH y A es O.

5 33. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que Y y Z son halo.

34. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que Y y Z son OCH₃.

10 35. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que R es bencilo.

36. Un procedimiento para determinar *in vitro* el estado de proliferación de un tumor que comprende células que expresan receptores de sigma-2, comprendiendo:

15 (a) poner en contacto las células tumorales *in vitro* con un ligando sigma-2 marcado de forma detectable, en el que el marcador comprende un radionúclido, y

(b) determinar el grado en que el ligando se une a las células, en el que el grado proporciona una medición del estado de proliferación del tumor **caracterizado** porque el ligando sigma-2 marcado de forma detectable es un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que la muestra celular se toma de un tumor localizado en la vejiga, colon, próstata, mama, pulmón, intestino, páncreas, sistema reproductor o cerebro.

25 38. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para el tratamiento de un tumor sólido en un ser humano.

39. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 28 o la reivindicación 29 para el tratamiento de un tumor sólido en un ser humano.

30

40. Un compuesto marcado de forma detectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para identificar la presencia de un tumor sólido en un sujeto humano, en el que el marcador comprende un radionúclido.

35 41. Una composición farmacéutica marcada de forma detectable de acuerdo con la reivindicación 28 o la reivindicación 29 para identificar la presencia de un tumor sólido en un sujeto humano, en el que el marcador comprende un radionúclido.

42. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso como una sustancia terapéutica activa o como una ayuda en el diagnóstico.

40

45

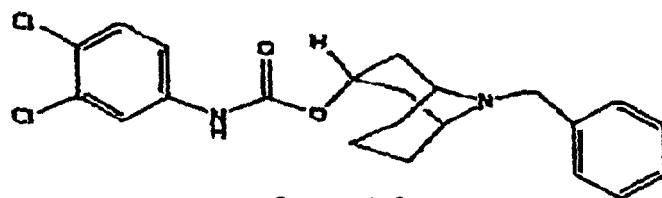
50

55

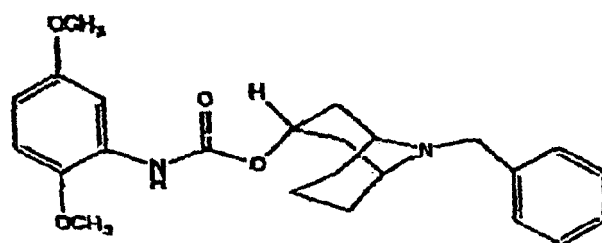
60

65

Figura 1

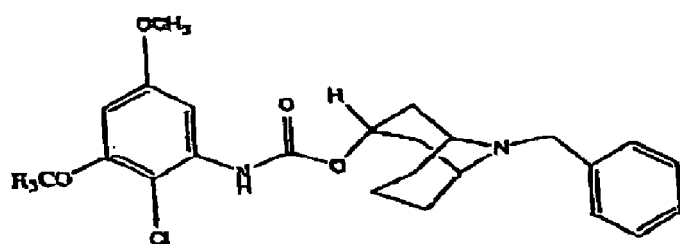


Compuesto 2

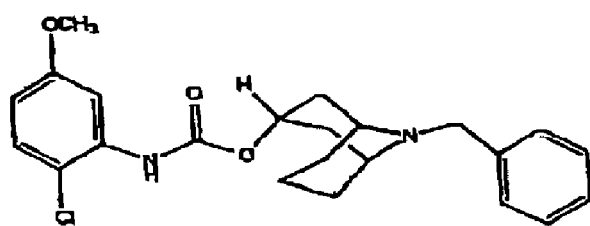


Compuesto 3

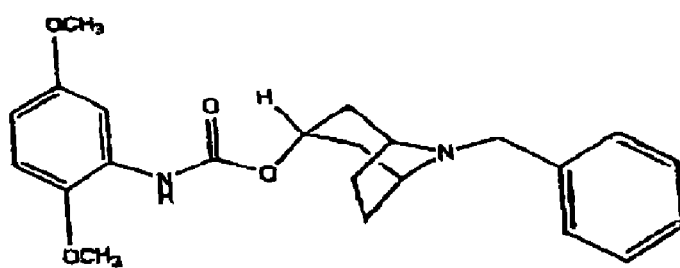
Figura 2



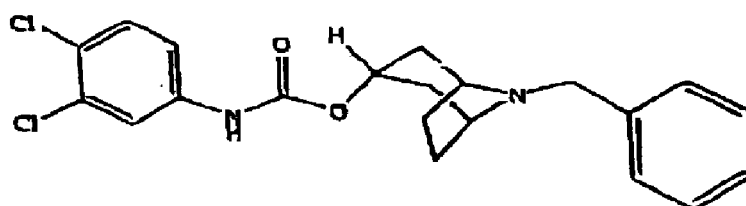
Compuesto 4



Compuesto 5

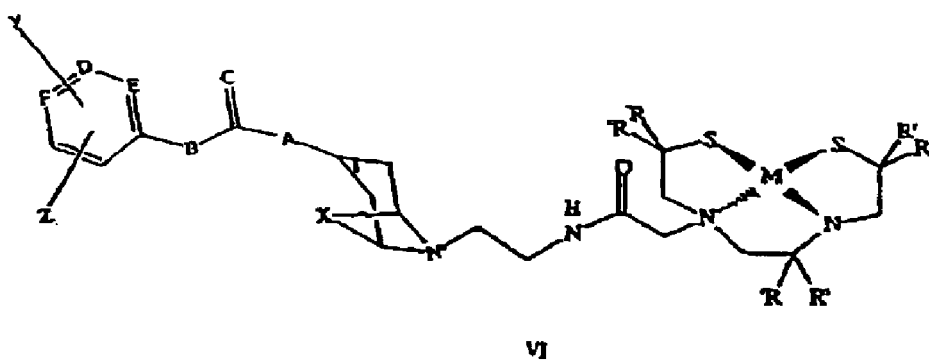
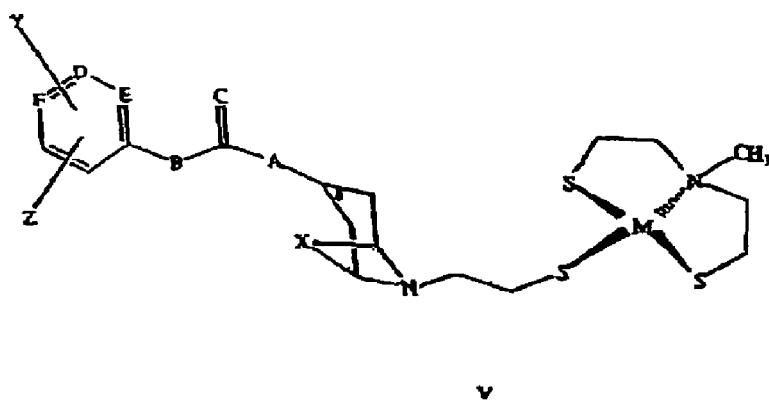


Compuesto 6



Compuesto 7

Figura 3



R' = metilo o bencilo,