

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 884**

51 Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61B 8/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2017** **E 20199620 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3782990**

54 Título: **Derivado de mofezolaca como agente de generación de imágenes en un método de diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

27.04.2016 US 201662328604 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.11.2023

73 Titular/es:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI (50.0%)

Piazza Umberto I, 1

70121 Bari (BA), IT y

ITEL TELECOMUNICAZIONI S.R.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

SCILIMATI, ANTONIO;

PERRONE, MARIA GRAZIA y

VITALE, PAOLA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 953 884 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

Derivado de mofezolaca como agente de generación de imágenes en un método de diagnóstico de cáncer

5 Campo técnico de la invención

La invención se relaciona con un nuevo compuesto direccionado a COX-1. La invención también se relaciona con el uso de dicho compuesto en la detección de COX-1 en trastornos o enfermedades relacionadas tales como cáncer, en particular en tumores ginecológicos (por ejemplo, cáncer de ovario), tumores de cuello y cabeza y tumores hematológicos (por ejemplo, mieloma múltiple) y en la detección de COX-1 en "*in vitro*" (células y tejidos) y en "*in vivo*".

Cualquier referencia en la descripción a métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal se refiere a los compuestos y composiciones de la presente invención para uso en dichos métodos de diagnóstico.

15 Antecedentes de la invención

Las ciclooxigenasas (COX), conocidas como dos isoformas COX-1 y COX-2, son las enzimas clave en la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxano. El ácido araquidónico (AA) se libera de la membrana celular también ante estímulos inflamatorios y mitógenos. La inflamación es una fase común de muchas enfermedades.

COX-1 juega un papel previamente no reconocido en la neuroinflamación. La ablación genética o la inhibición farmacológica de la actividad catalítica de COX-1 atenúa la respuesta inflamatoria y pérdida neuronal. En este contexto, el tratamiento de la célula microglial estimulada por LPS (un modelo de neuroinflamación aceptado mundialmente) por inhibidores selectivos de COX-1 (P6, P10, SC-560, aspirina) y coxibs (celecoxib y etoricoxib) determina la supresión total de la expresión de COX-1 o COX-2 por sus respectivos inhibidores selectivos; NF-κB permaneció casi completamente inactivo en presencia de coxibs, como se esperaba, y totalmente inactivo en presencia de P6; P6 también contrarrestó notablemente LPS mejorando la expresión de ARNm de cPGES y producción de PGE₂. Entonces, dado que la COX-1 se localiza predominantemente en la microglía, es más probable que su inhibición altamente selectiva, en lugar de la COX-2 (por coxibs), reduzca la neuroinflamación y, por lo tanto, debe considerarse como una metodología terapéutica potencial para tratar neuroinflamación y prevenir farmacológicamente enfermedades neurológicas (por ejemplo, trastornos del espectro autista) y neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedades de Alzheimer, enfermedades de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple (MS), lesión cerebral traumática (TBI), demencia por VIH y enfermedades priónicas) con un marcado componente inflamatorio [Scilimati et al. Pharmacol. Res. 65 (2012) 137-148]. Hasta ahora, entre los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tradicionales (tNSAID), solo se han identificado algunos ejemplos de inhibidores de COX-1 selectivos.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de inhibidores específicos de COX-1 potentes que sean eficaces en el tratamiento o detección de trastornos o enfermedades relacionados con COX-1 tales como cáncer y neuroinflamación.

El diagnóstico precoz del cáncer de ovario es hoy en día un reto para aumentar la tasa de supervivencia de las pacientes a 5 años de esta neoplasia maligna. A pesar de la introducción de tratamientos quirúrgicos intensivos y los avances en el uso de nuevos agentes terapéuticos, los nuevos biomarcadores de diagnóstico son bienvenidos como un intento de reducir la morbilidad y la mortalidad causadas por el cáncer de ovario en estadio avanzado. La mayoría de las células epiteliales de cáncer de ovario expresan altos niveles de COX-1, en lugar de COX-2. Por lo tanto, la COX-1 se ha propuesto recientemente como un biomarcador ideal para la detección del cáncer de ovario. La proteína COX-1 se expresa de moderada a alta en 99 % de los tumores de alto grado y la expresión de COX-1 es significativamente mayor que la de COX-2 en los tumores de alto grado y en todos los tumores serosos en comparación con los tumores endometrioides, mucinosos y de células claras. Además, la subregulación de la expresión génica de COX-1 inhibe múltiples vías protumorigénicas y anulación de COX-1 inhibe funciones protumorigénicas como viabilidad celular, clonogenicidad y migración/invasión en células de cáncer de ovario que expresan COX-1. Todos estos datos apoyan la idea de COX-1 como biomarcador del cáncer de ovario.

55 Sumario de la invención

La presente invención se relaciona con un nuevo compuesto dotado de alta afinidad y selectividad por COX-1 así como buenas propiedades farmacocinéticas. La presente invención se relaciona también con un compuesto capaz de detectar la presencia de COX en células y tejidos (sanos, representativos de enfermedades, inflamados y tumorales).

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un compuesto que tiene la fórmula indicada en la reivindicación 1.

Un segundo objeto de la invención es el uso del compuesto para la detección *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de la presencia de COX-1 en células y tejidos.

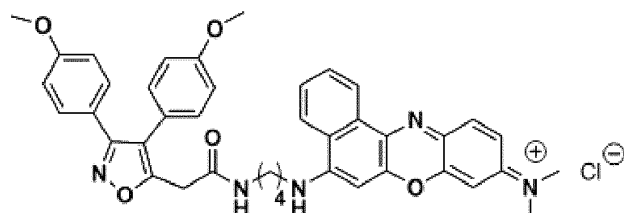
Un tercer objeto de la invención es el compuesto aquí divulgado radiomarcado isotópicamente.

Otros objetos se harán evidentes a la luz de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de la invención

Compuesto de la invención

La invención se relaciona con un nuevo compuesto que tiene la siguiente fórmula



Compuesto de la invención para uso en diagnóstico *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* mediante la detección de COX

El compuesto de la presente invención es útil para diagnóstico *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* o generación de imágenes. Es otro objeto de la invención un método *in vivo* para el diagnóstico de cáncer, en particular cáncer de ovario que comprende una etapa de administrar a un mamífero, preferiblemente a un ser humano, una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención. Las sondas de azul del Nilo, NBD y rodamina tienen ventajas de propiedades ópticas con absorción NIR (630 nm) y emisión (670 nm) y pueden detectar células cancerosas mediante el método de generación de imágenes de fluorescencia. De acuerdo con una realización preferida de la invención, las células cancerosas detectadas por el método de generación de imágenes *in vivo* o *in vitro* o *ex-vivo* son las células de cáncer de ovario. La técnica de generación de imágenes puede ser, por ejemplo, un método de generación de imágenes por fluorescencia para detectar COX en células cancerosas/tejidos tumorales durante resección quirúrgica y células y tejidos inflamados. La falta de reconocimiento adecuado de los márgenes del tumor y una resección incompleta pueden aumentar la recurrencia del tumor y disminuir la rata de supervivencia.

La cantidad eficaz administrada del compuesto de la presente invención dependerá de la condición particular que se va a diagnosticar, la edad, peso y condición física general del paciente en particular, como es bien conocido por las personas experimentadas en la técnica. La cantidad diagnósticamente eficaz del compuesto de la presente invención que se administrará antes de realizar el diagnóstico *in vivo* está dentro de un intervalo de 0.1 ng a 100 mg por kg de peso corporal, preferiblemente dentro de un intervalo de 1 ng a 10 mg por kg de peso corporal.

Es otro objeto de la invención un método *in vitro* para el diagnóstico de cáncer, en particular cáncer de ovario que comprende una etapa de administrar una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención con una muestra de células o tejidos.

Compuesto de la invención marcado isotópicamente.

La presente invención también abarca compuestos radiomarcados isotópicamente que son idénticos al compuesto de la presente invención, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que normalmente se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar al compuesto de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y flúor, tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , respectivamente. La incorporación de un átomo radiactivo en el compuesto de la presente invención se puede realizar usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante la incorporación de un átomo radiactivo de 11-carbono o 18-flúor en el compuesto de la presente invención.

Composición de generación de imágenes

Otro objeto de la invención es una composición de generación de imágenes de diagnóstico que comprende como agente de generación de imágenes el compuesto de la presente invención, en una realización marcado isotópicamente y un portador. De acuerdo con la invención, el compuesto se puede administrar en una sola dosis inyectable unitaria. Cualquiera de los portadores comunes conocidos por las personas experimentadas en la técnica, como solución salina estéril o plasma, se puede utilizar después del radiomarcado del compuesto para preparar la solución inyectable para diagnóstico por generación de imágenes de acuerdo con la invención. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo y el portador o portadores o diluyente o diluyentes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con el portador líquido.

Con fines de diagnóstico después de la administración intravenosa, la generación de imágenes del órgano *in vivo* puede tener lugar en cuestión de unos minutos. Sin embargo, la generación de imágenes tiene lugar, si se desea, en

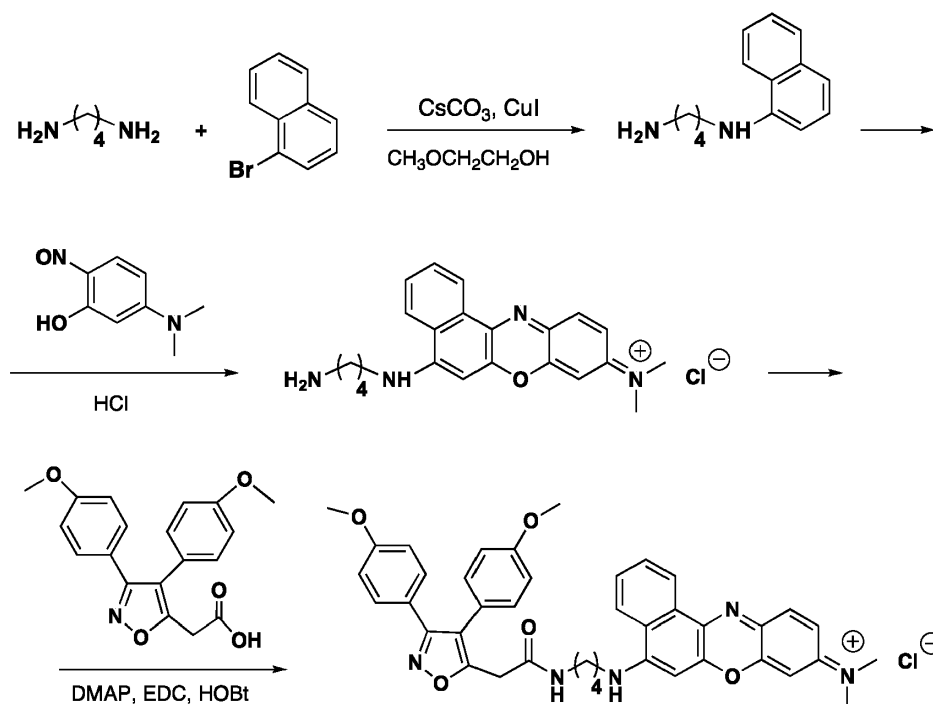
horas o incluso más, después de la inyección en los pacientes. En la mayoría de los casos, se acumulará una cantidad suficiente de la dosis administrada en el área de la que se va a generar la imagen en aproximadamente 1 hora para permitir la toma de imágenes de diagnóstico. Cualquier método convencional de generación de imágenes con fines de diagnóstico puede utilizarse de acuerdo con esta invención como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

Las composiciones de diagnóstico por generación de imágenes de la invención son útiles para uso diagnóstico o generación de imágenes *in vivo* de una afección en la que COX-1 es el objetivo molecular.

Ejemplos, datos químicos y biológicos

La invención se detalla a continuación mediante el siguiente ejemplo de preparación del nuevo compuesto.

Síntesis de cloruro de N-[4-(9-dimetilimino-9H-benzo[a]fenoxazin-5-ilamino)butil]-2-(3,4-bis(4-metoxifenil)isoxazol-5-il)acetamida



N-(4-aminobutil)naftalen-1-amina. Se agregó a una solución de 1-bromonaftaleno (1.0 g, 4.83 mmol, 0.67 mL) y 1,4-diaminoobutano (1.13 g, 12.84 mmol) en 2-metoxietanol (10 mL) CuI (46 mg, 0.24 mmol) y Cs₂CO₃ (730 mg, 2.24 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo a 125 ° C durante 24 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y el filtrado amarillo se concentró bajo presión reducida. El producto crudo, como un semisólido negro, se extrajo tres veces con hexano caliente. Tras la evaporación del disolvente bajo presión reducida, el producto se aisló como un aceite amarillo (0.63 g, 61 % de rendimiento) por cromatografía en columna (gel de sílice; fase móvil: primero CH₂Cl₂ y luego CH₂Cl₂/CH₃OH = 7:3). Mp 184-187 ° C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ): 7.83-7.79 (m, 2H, protones aromáticos); 7.49-7.41 (m, 2H, protones aromáticos); 7.35 (t, 1H, *j* = 7.83 Hz, protón aromático); 7.23 (d, 1H, *J* = 9.68 Hz, protón aromático); 6.61 (d, 1H, *J* = 7.34 Hz, protón aromático); 3.80-3.72 (m, 1H, NH: intercambiado con D₂O); 3.31 (t, 2H, *J* = 7.10 Hz, CH₂NH₂); 2.81 (t, 2H, *J* = 7.10 Hz, CH₂NH₂); 1.89-1.81 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂); 1.69-1.63 (m, 2H, NHCH₂CH₂); 1.88-1.40 (bs, 2H, NH₂: intercambiado con D₂O). ESI-MS *m/z* (%): C₁₄H₁₈N₂ (M+H)⁺: 215; ESI-MS-MS (215): 198 (78), 72 (100).

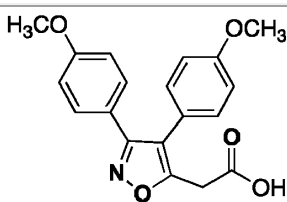
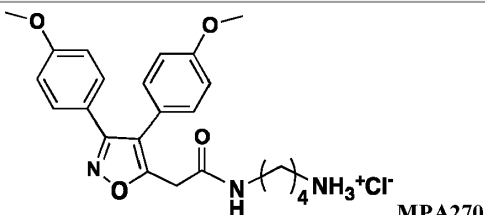
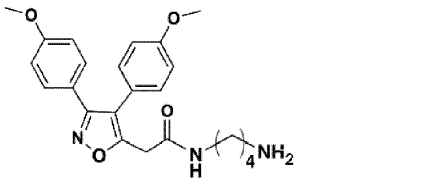
Cloruro de N-(4-aminobutil)-9-dimetilimino-9H-benzo[a]fenoxazin-5-amonio. Se añadió a una solución fría en baño de hielo de N-(4-aminobutil)naftalen-1-amina (630 mg, 2.94 mmol) en etanol (20 ml) 5-(dimetilamino)-2-nitrosfenol (503 mg, 3.0 mmol) y HCl conc. (0.92 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0 ° C durante 10 minutos, luego se calentó a 90 ° C durante 2.5 horas. Luego, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó bajo presión reducida para dar un sólido violeta (677 mg, 64 % de rendimiento). Mp 184-187 ° C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ): 8.63 (d, 1H, *J* = 7.83 Hz, protón aromático); 8.37 (d, 1H, *J* = 5.90 Hz, protón aromático); 7.83 (t, 1H, *J* = 6.25 Hz, protón aromático); 7.74 (t, 1H, *J* = 6.25 Hz, protón aromático); 7.67-7.62 (m, 1H, protón aromático); 7.15-7.10 (m, 1H, protón aromático); 6.88 (s, 1H, protón aromático); 6.65 (s, 1H, protón aromático); 3.70 (t, 3H, *J* = 7.10 Hz, NHCH₂); 3.25 (s, 6H, (CH₃)₂N⁺); 3.08 (t, 2H, *J* = 7.30 Hz, CH₂NH₂); 1.88-2.05 (m, 4H, NHCH₂(CH₂)₂CH₂NH₂); 1.88-1.40 (bs, 2H, NH₂: intercambiado con D₂O). RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃, δ): 157.87, 155.78, 151.56, 147.60,

133.44, 132.25, 131.62, 130.85, 130.03, 129.56, 124.06, 123.18, 122.87, 115.24, 95.65, 93.27, 48.22, 48.10, 48.05, 47.93, 47.88, 47.76, 47.71, 47.60, 47.53, 47.47, 47.42, 47.25, 47.08, 43.67, 39.81, 38.97, 25.25, 24.65; ESI-MS m/z (%): $C_{22}H_{24}ClN_4O$ ($M+H$)⁺: 361; ESI-MS-MS (361): 290 (100).

- 5 Cloruro de N-[4-(9-dimetilimino-9H-benzo[a]fenoxazin-5-ilamino)butil]-2-(3,4-bis(4-metoxifenil)isoxazol-5-il)acetamida. Se añadieron a una solución de cloruro de N-(4-aminobutil)-9-dimetilimino-9H-benzo[a]fenoxazin-5-amonio (56 mg, 0.155 mmol) en DMF anhidro (5 ml), mofezolac (53 mg, 0.155 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (39 mg, 0.20 mg), HOBT·H₂O (35 mg, 0.20 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (25 mg, 0.20 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 24 horas. Luego, se eliminó el disolvente bajo presión reducida y se aisló un sólido violeta (34 mg, 31 % de rendimiento) por cromatografía (gel de sílice; CH₂Cl₂/CH₃OH = 9:1). Mp 142-144 ° C. FT-IR (KBr): 3427, 3235, 3063, 2921, 2851, 1641, 1588, 1328, 835, 717cm⁻¹. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ): 9.00-8.85 (bs, 1H, NH: intercambio con D₂O); 8.80 (d, 1H, J = 8.30 Hz, protón aromático); 8.31 (d, 1H, J = 8.30 Hz, protón aromático); 7.90 (t, 1H, J = 7.60 Hz, protón aromático); 7.80 (t, 1H, J = 7.80 Hz, protón aromático); 7.70 (d, 1H, J = 9.30 Hz, protón aromático); 7.14-7.04 (m, 5H, protones aromáticos); 6.92 (s, 1H, protón aromático); 6.80 (d, 2H, J = 8.80 Hz, protones aromáticos); 6.70 (d, 2H, J = 9.30 Hz, protones aromáticos); 6.60 (s, 1H, protón aromático); 3.80-3.74 (m, 6H, OCH₃ y ArNHCH₂); 3.72 (s, 3H OCH₃); 3.69 (s, 2H, CH₂CONH); 3.40 (t, 2H, J = 6.40 Hz, CH₂NHCO); 3.20 (s, 6H, (CH₃)₂N⁺); 1.92-1.88 (m, 2H, ArNHCH₂CH₂); 1.79-1.76 (m, 2H, CONHCH₂CH₂). ESI-EM m/z (%): $C_{41}H_{39}ClN_5O_5$ [$M+H - Cl$]⁺: 682.5; ESI-MS-MS: 682.5: 361 (100), 290.

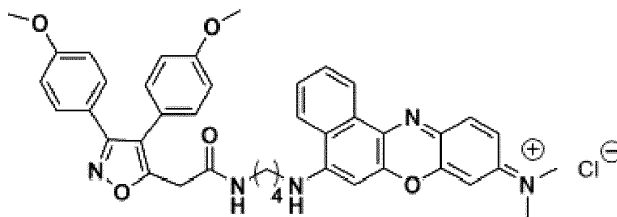
20 Inhibición de la actividad catalítica de COX-1 y COX-2 ovina

- Se evaluó la capacidad de los compuestos de referencia para inhibir la actividad catalítica de las enzimas COX-1 y COX-2 ovinas (porcentaje de inhibición a 50 mm, a menos que se indique lo contrario). Los valores IC₅₀ se determinaron solo para compuestos que mostraron una actividad inhibidora de COX-1 razonable (>50 %) a 50 mm. Cada valor de IC₅₀ reportado y el porcentaje de inhibición (medido a 50 mm como la concentración del compuesto probado) es el promedio de los resultados de tres ensayos separados (por triplicado). La inhibición enzimática se determinó utilizando un kit de ensayo de cribado de inhibidores de COX (ovino) colorimétrico (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las soluciones madre de los compuestos de prueba se disolvieron en un volumen mínimo de DMSO.

Compuesto	IC ₅₀ COX-1 [% de inhibición a 50 μM]	IC ₅₀ COX-2 (μM) [% de inhibición a 50 μM]
 mofezolac	0.0079 [100]	> 50 [38]
 MPA270	1.1 [94]	n.d.
 MPA 290	0.95 [100]	3.5 [51]
nd = no determinado		

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 radiomarcado isotópicamente, en particular radiomarcado isotópicamente con un isótopo seleccionado de ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F .

3. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso *in vivo* o *ex vivo* en un método de generación de imágenes de un cáncer, en particular cáncer de ovario.

4. Una composición de generación de imágenes de diagnóstico que comprende como agente de generación de imágenes un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un portador.

5. La composición de generación de imágenes de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 4 para uso *in vivo* o *ex-vivo* en el diagnóstico de un cáncer, en particular cáncer de ovario.

6. Un método de diagnóstico de cáncer *in vitro* que comprende una etapa de poner en contacto una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 con una muestra de células.

7. El método de diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende una etapa adicional de análisis de fluorescencia de dicha muestra de células.