



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 109**

51 Int. Cl.:  
**C07K 5/00** (2006.01)  
**C07K 5/09** (2006.01)  
**C07K 5/093** (2006.01)  
**C07K 5/037** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07843067 .5**  
96 Fecha de presentación : **24.09.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2078033**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2009**

54 Título: **Agente de captación marcado isotópicamente y procedimiento para identificar metabolitos reactivos.**

30 Prioridad: **29.09.2006 US 827526 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2011**

73 Titular/es: **JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**  
**Turnhoutseweg 30**  
**2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es: **Huebert, Norman D. y**  
**Zhengyin, Yan**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 109 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

Agente de captación marcado isotópicamente y procedimiento para identificar metabolitos reactivos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un agente de captación marcado isotópicamente, a procedimientos para detectar metabolitos reactivos y a procedimientos para identificar candidatos a fármaco. Más específicamente, el agente de captación marcado isotópicamente y los procedimientos para detectar metabolitos reactivos pueden usarse para detectar metabolitos reactivos tanto "duros" como "blandos", eliminando de esta manera falsos positivos.

**Antecedentes de la invención**

10 Una causa de morbilidad y mortalidad de pacientes, es la toxicidad idiosincrásica de los fármacos, que sigue siendo una grave preocupación de seguridad tanto en el desarrollo clínico del fármaco como en el posterior lanzamiento en el mercado. Estas reacciones idiosincrásicas a fármacos pueden conducir a un uso restringido e incluso a la retirada del mercado, que en consecuencia da como resultado mayores costes de desarrollo para la industria farmacéutica. Por ejemplo, troglitazona, benoxaprofeno y zomepirac se retiraron del mercado poco después de su puesta en venta debido a perfiles de toxicidad inaceptables.

15 Las reacciones idiosincrásicas a fármacos son un acontecimiento poco frecuente que normalmente se muestra como un alto grado de susceptibilidad del individuo. Además, estas reacciones no son normalmente dependientes de la dosis. Actualmente, no hay modelos animales que puedan usarse para evaluar dichas reacciones que ocurren exclusivamente en seres humanos. Por lo tanto, las toxicidades idiosincrásicas del fármaco no pueden evaluarse eficazmente en estudios preclínicos, y a menudo pasan desapercibidas en los ensayos clínicos.

20 En este momento, los mecanismos de las reacciones idiosincrásicas al fármaco no se entienden bien. Hay una cantidad sustancial de evidencia que sugiere que hay metabolitos químicamente reactivos implicados en toxicidades idiosincrásicas, especialmente para toxicidad en el hígado. Todos los fármacos asociados con toxicidad idiosincrásica forman metabolitos reactivos por diversas rutas metabólicas mediadas predominantemente por enzimas de tipo citocromo P450 (CIP), así como por otras enzimas oxidativas tales como peroxidadas, ciclooxigenasas y mieloperoxidasas. Se plantea la hipótesis de que los fármacos asociados con dichas toxicidades experimentan en primer lugar una activación metabólica para generar metabolitos reactivos tóxicos que se unen covalentemente a proteínas celulares. Estas proteínas modificadas covalentemente son inmunógenas y, de esta manera, desencadenan una respuesta inmune, dando como resultado reacciones idiosincrásicas al fármaco. Una hipótesis alternativa establece que las modificaciones covalentes de proteínas celulares por metabolitos reactivos afectan a las cascadas de transducción de señales y a las funciones vitales de las células, conduciendo a graves consecuencias observadas en la clínica. De esta manera, sigue habiendo una necesidad de procedimientos para identificar metabolitos reactivos.

30 Los metabolitos químicamente reactivos pueden clasificarse en dos categorías basándose en sus propiedades químicas - metabolitos reactivos "blandos" y "duros". Los metabolitos reactivos "blandos" comprenden una mayoría de metabolitos electrófilos que incluyen quinonas, quinona iminas, iminoquinona metiuros, epóxidos, óxidos de areno e iones nitrenio, y reaccionan fácilmente con electrófilos "blandos", tales como el grupo sulfhidrilo en cisteína. En contraste, los metabolitos reactivos "duros", vistos más habitualmente como aldehídos, reaccionan preferentemente con electrófilos "duros", tales como aminas de lisina, arginina y ácidos nucleicos. Debido a su inestabilidad, la detección y caracterización directa de metabolitos reactivos ha resultado ser extremadamente difícil. Un procedimiento utilizado habitualmente es atrapar los metabolitos reactivos con una molécula de captura, que da como resultado la formación de un aducto estable que puede caracterizarse posteriormente por procedimientos de detección conocidos, por ejemplo por espectrometría de masas en tándem.

45 Recientemente, Avery, Michael, J., en la Publicación de Patente Europea EP 1.150.120 desvelaron un procedimiento de selección con alta capacidad de producción para identificar compuestos de ensayo que producen metabolitos reactivos. El procedimiento comprende incubar un compuesto de ensayo con un sistema de enzima microsómica de metabolización de fármaco en presencia de glutatión, y detectar aductos de glutatión formados a partir de los mismos usando espectrometría de masas en tándem.

50 Sin embargo, este procedimiento, identificará metabolitos reactivos así como componentes no reactivos, (incluyendo tanto metabolitos no reactivos como componentes de la mezcla de reacción), formados como resultado de una respuesta común en la detección por espectroscopía de masas, dando como resultado, de esta manera, falsos positivos.

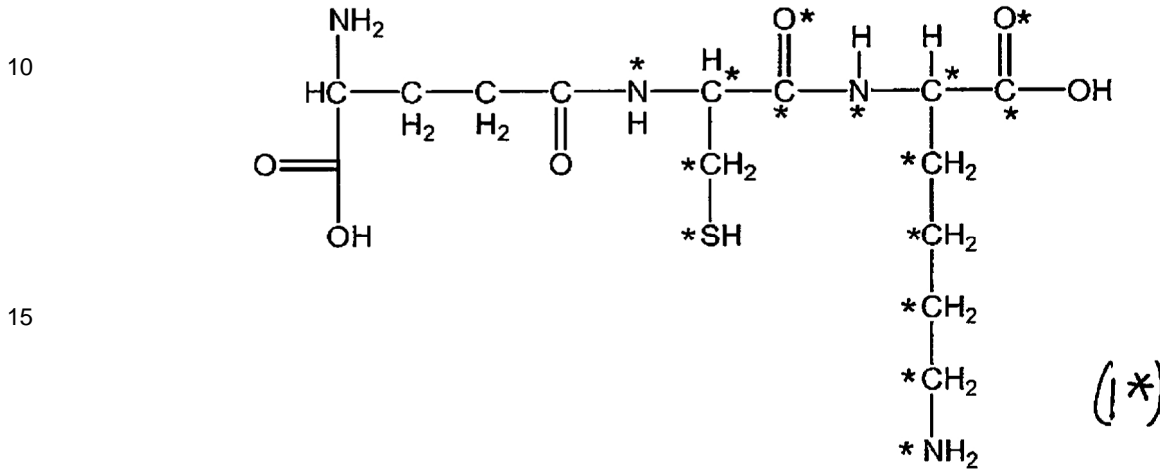
Yan et al., en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2005 0287623 A1 desvelan un procedimiento para detectar metabolitos reactivos usando captación de isótopo estable y espectroscopía de masas. Sin embargo, el procedimiento como se describe en Yan et al., solo detecta metabolitos "blandos", no detecta, simultáneamente, metabolitos reactivos tanto "duros" como "blandos".

Yan et al. describen también en Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19, 3322-3330 el uso del isótopo estable marcado  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly para la captación de metabolitos y detección de aductos usando técnicas de espectrometría de masas.

5 Adang et al. desvelan en Biochem. J. 1990, 269, 47-54  $\gamma$ -Glu-Cys-Lys no marcado como análogos de glutatión para estudiar el sitio de unión a glutatión en glutatión-S-transferasa.

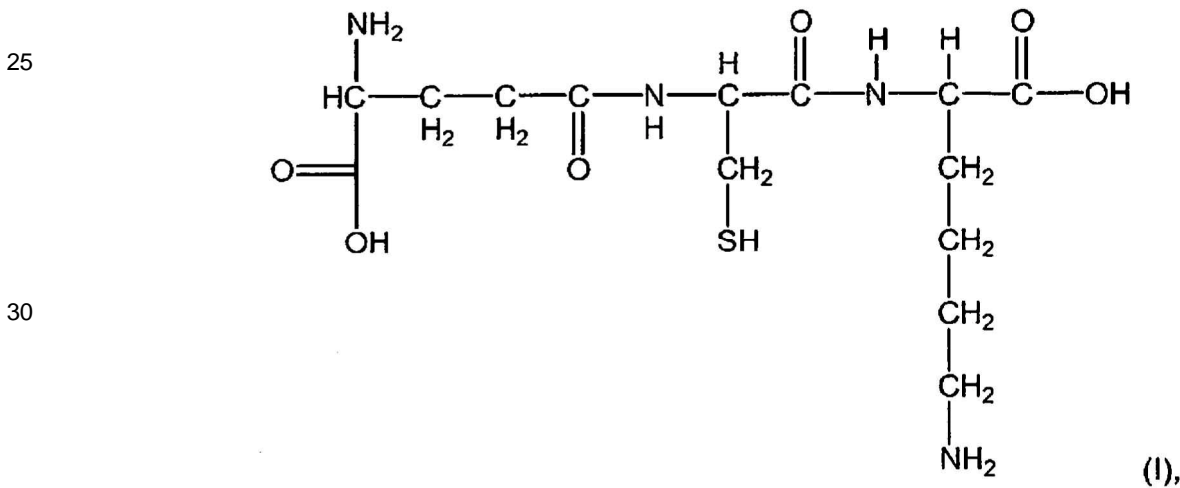
**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un agente de captación marcado isotópicamente para identificar metabolitos reactivos, un compuesto de fórmula (I\*)



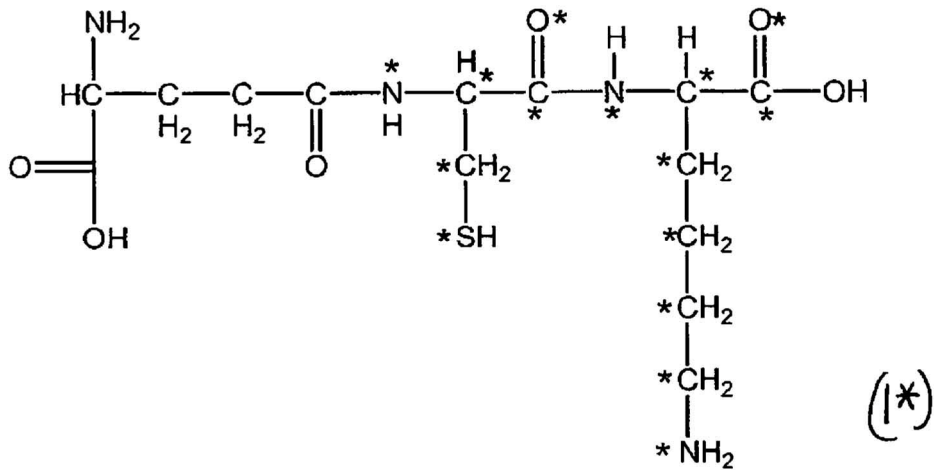
20 conocido también como ácido 6-amino-2-[2-(4-amino-4-carboxi-butilamino)-3-mercapto-propionilamino]-hexanoico, en el que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de identificación de metabolitos reactivos que comprende (a) incubar un compuesto de fórmula (I)



y / o un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)

35



en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente;

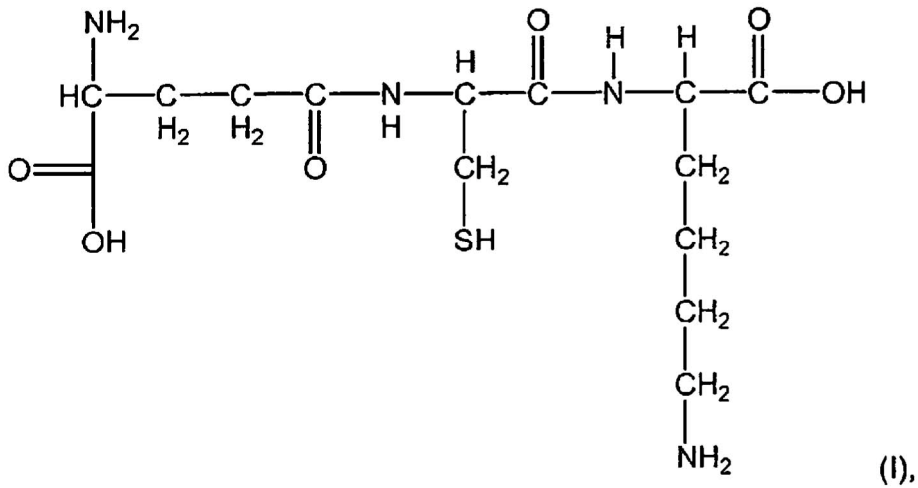
con un compuesto de ensayo y una enzima de metabolización de fármaco;

para dar una mezcla de producto que comprende uno o más aductos; y

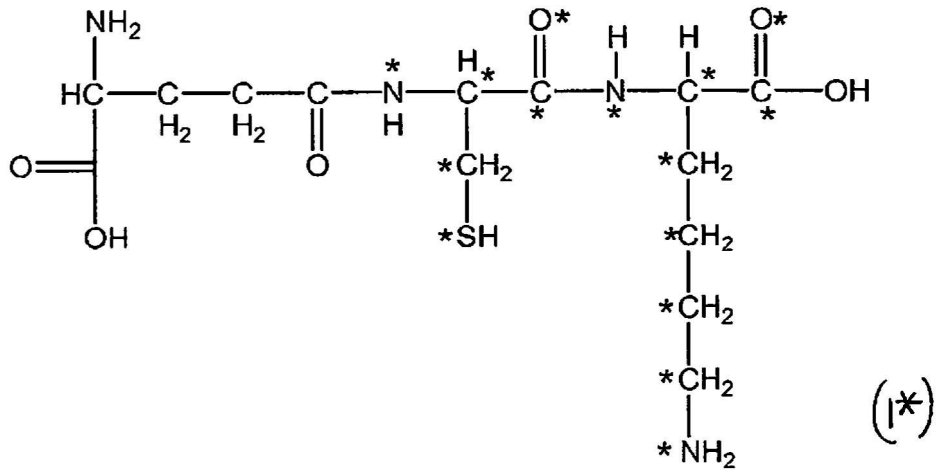
- 15 (b) detectar dicho uno o más aductos, de acuerdo con procedimientos conocidos y / o de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo mediante espectroscopía de masas con pérdida neutra.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

- 20 (a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto de fórmula (I)



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)



en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente; y una enzima de metabolización de fármaco;

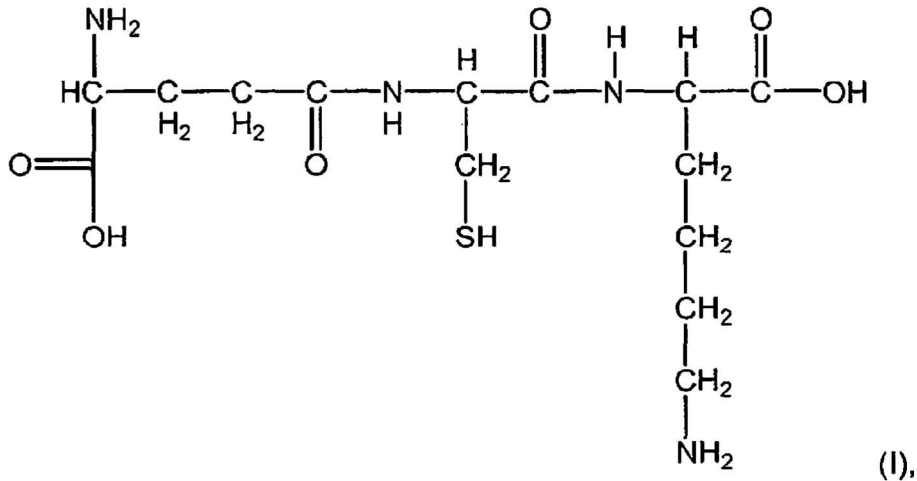
para producir una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

15 (b) detectar uno o más dobletes isotópicos en un espectro de masas con pérdida neutra del uno o más aductos producidos en la Etapa (a), en el que el doblete difiere en masa por la diferencia en masa entre el compuesto de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

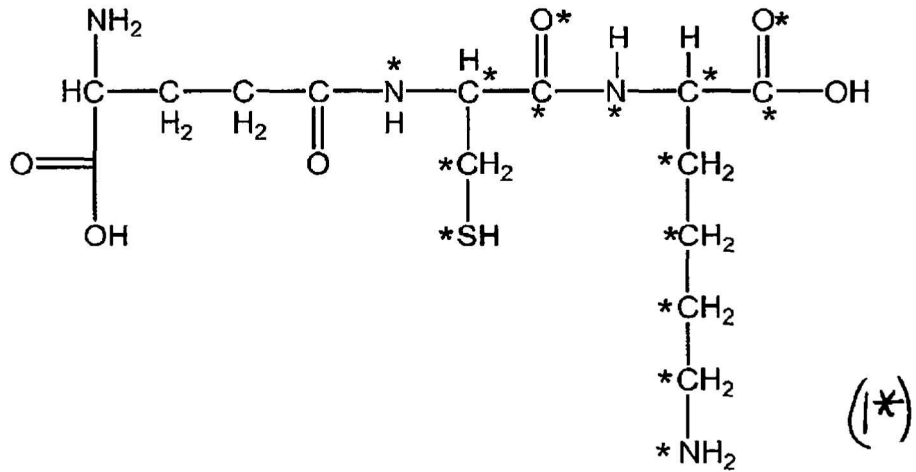
20 La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento de identificación de metabolitos reactivos (incluyendo metabolitos reactivos tanto "blandos" como "duros"), usando una mezcla de un compuesto de fórmula (I) y un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

25 (a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I)



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)



en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, y una enzima de metabolización de fármaco, para producir una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

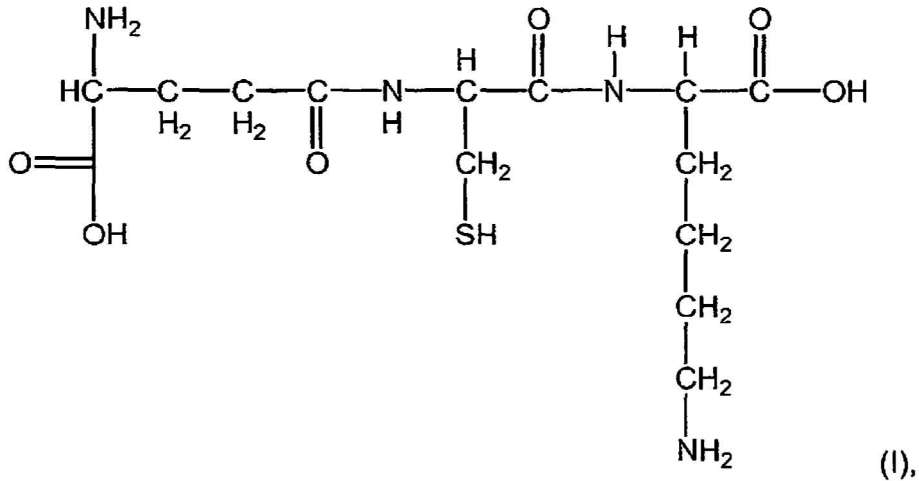
(b) medir un espectro de masas con pérdida neutra del uno o más aductos producidos en la etapa (a); y

15 (c) detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la etapa (b), en el que el doblete o dobletes isotópicos difieren en masa por la diferencia en masa entre el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

La presente invención se refiere adicionalmente a una mezcla que comprende (a) un complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y (b) un complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

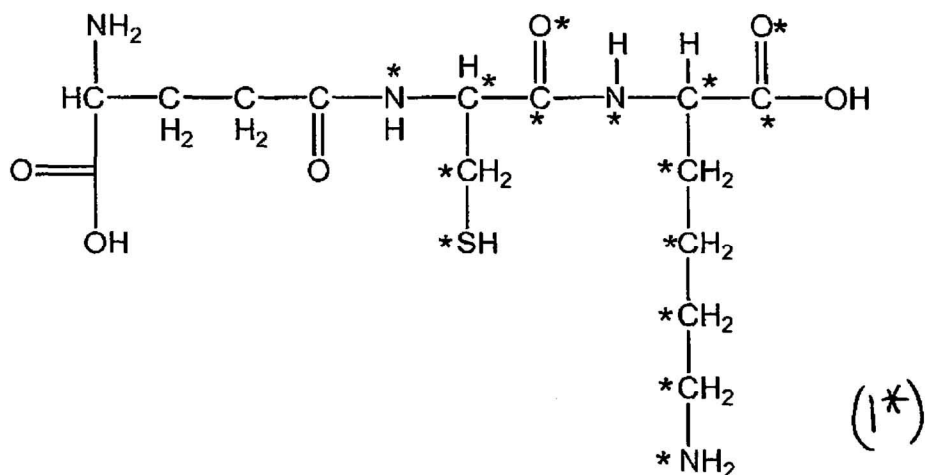
La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para identificar un candidato a fármaco que comprende

(a) incubar un compuesto de ensayo con un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I)



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)

35



en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, y una enzima de metabolización de fármaco, para producir una mezcla de producto;

(b) medir un espectro de masas con pérdida neutra de la mezcla de producto producida en la etapa (a); y

15 (c) detectar la ausencia de dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la etapa (b) (en el que el doblete o dobletes isotópicos difieren en masa por la diferencia en masa entre el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para diclofenaco.

20 La Figura 1 B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de diclofenaco.

La Figura 1C ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto II derivado de diclofenaco.

La Figura 2A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para clozapina.

La Figura 2B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de clozapina.

La Figura 3A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para p-cresol.

25 La Figura 3B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de p-cresol.

La Figura 3C ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto II derivado de p-cresol.

La Figura 4A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para omeprazol.

La Figura 4B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de omeprazol.

La Figura 5A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para furano.

30 La Figura 5B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de furano.

La Figura 6A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para 2-metilfurano.

La Figura 6B: espectro de masas en tándem NL de aductos isoméricos derivados de 2-metilfurano.

La Figura 7A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para mentofurano.

La Figura 7B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de mentofurano.

35 La Figura 8A ilustra el cromatograma de iones totales de exploración con pérdida neutra de 129 Da para 2-[2-tienil]-furano.

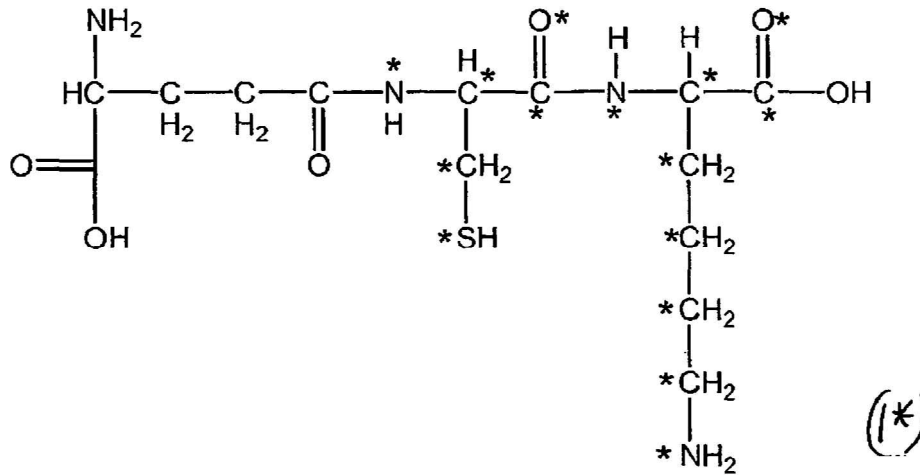
La Figura 8B ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto I derivado de 2-[2-tienil]-furano.

La Figura 8C ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto II derivado de 2-[2-tienil]-furano.

La Figura 8D ilustra el espectro de masas en tándem con pérdida neutra del aducto III derivado de 2-[2-tienil]-furanio.

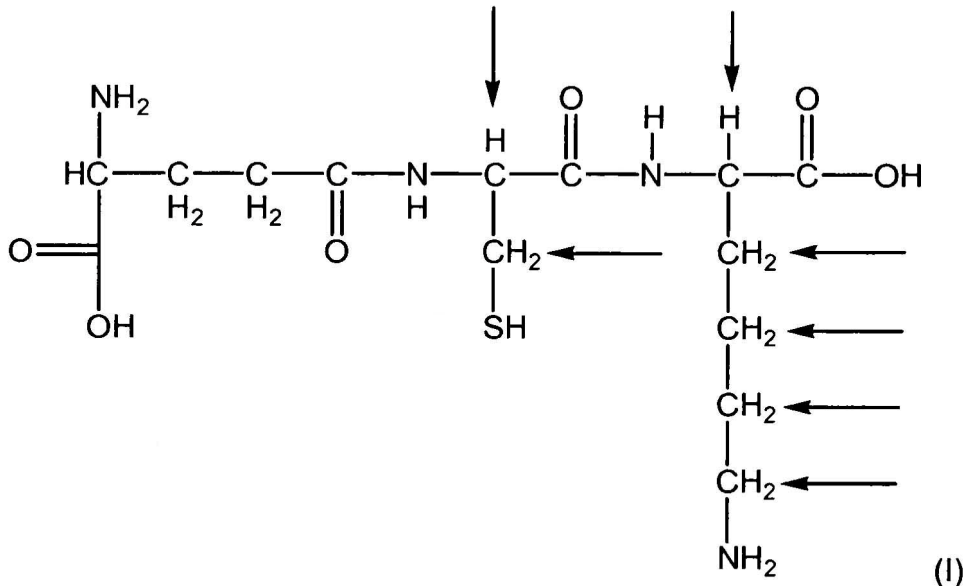
**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un agente de captación marcado isotópicamente, en el que el agente de captación es capaz de unirse a metabolitos reactivos, un compuesto de fórmula (I\*)



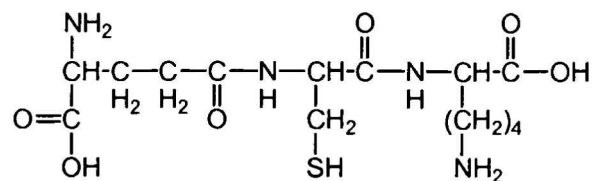
15 conocido también como ácido 6-amino-2-[2-(4-amino-4-carboxi-butilamino)-3-mercapto-propionilamino]-hexanoico, en el que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable de los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, preferentemente con uno o más <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O, <sup>2</sup>H y / o <sup>34</sup>S isótopos.

20 Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "**hidrógeno no intercambiable**" significará cualquier átomo de hidrógeno que no se intercambie en solución acuosa. Para el compuesto de fórmula (I), los átomos de hidrógeno no intercambiable que pueden estar marcados isotópicamente se designan mediante las flechas en la estructura mostrada a continuación



35 El compuesto de fórmula (I) tiene dos "**zonas de captación**", que captan individualmente metabolitos reactivos "duros" y "blandos". Más específicamente, el grupo sulfhidrilo (-SH) en el compuesto de fórmula (I) reacciona con y capta los denominados metabolitos reactivos "blandos", mientras que el grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> en el compuesto de fórmula (I) reacciona con y capta los denominados metabolitos reactivos "duros". De esta manera, el compuesto de fórmula (I) y los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I) son capaces de captar simultáneamente metabolitos reactivos tanto "duros" como "blandos". Esto se muestra también esquemáticamente a continuación.

40

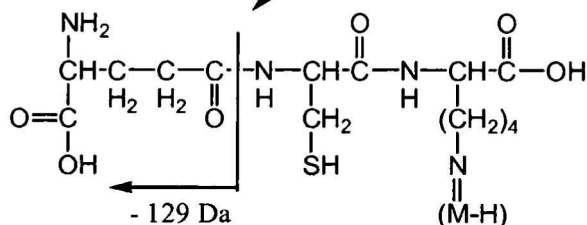


5

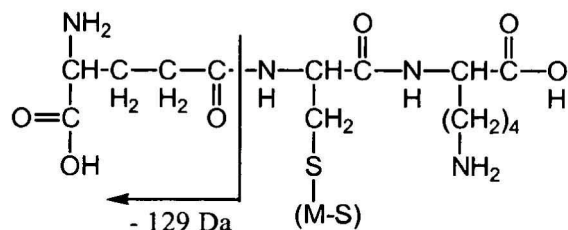
Compuesto de Fórmula (I)

Metabolito Duro  
(M-H)Metabolito Blando  
(M-S)

10



15



20

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "**metabolitos reactivos**" incluirá metabolitos reactivos "blandos" y "duros".

25

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "**metabolito blando**" significará cualquier metabolito electrófilo que comprenda al menos un grupo sustituyente que reacciona fácilmente con electrófilos "blando", tal como el grupo sulfhidrilo en cisteína y el grupo -SH en el compuesto de fórmula (I). Los ejemplos adecuados de dichos grupos sustituyentes incluyen, aunque sin limitación quinonas, quinona iminas, iminoquinona, metiuros, epóxidos, óxidos de areno, iones nitrenio, y similares.

30

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "**metabolito duro**" significará un metabolito electrófilo que comprende al menos un grupo sustituyente que reacciona fácilmente con electrófilos "duros", tales como las aminas de lisina, arginina o el  $-(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$  del compuesto de fórmula (I). Los ejemplos adecuados de dichos grupos sustituyentes incluyen, aunque sin limitación, aldehídos y similares.

35

Puesto que los metabolitos reactivos están implicados en muchos acontecimientos negativos asociados con compuestos de ensayo, particularmente acontecimientos negativos graves y / o tóxicos, es muy deseable poder detectar todos los metabolitos reactivos producidos por un compuesto de ensayo. También es muy deseable determinar si un compuesto de ensayo producirá metabolitos reactivos antes de la administración del compuesto de ensayo a seres humanos.

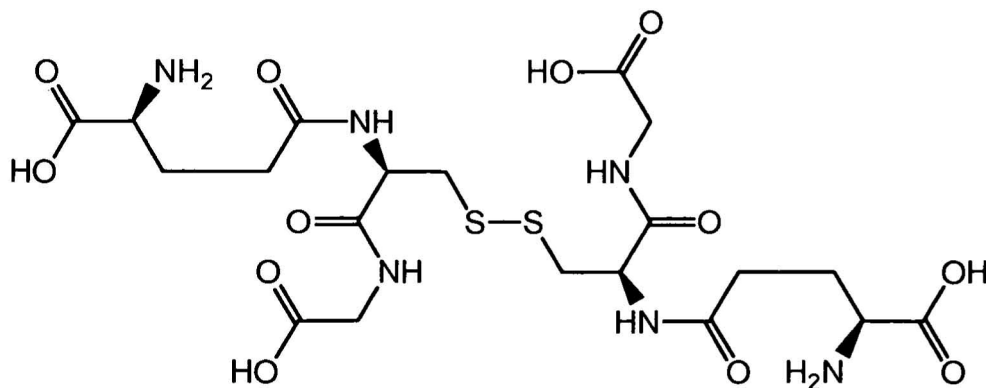
40

Un especialista en la técnica reconocerá que no todos los compuestos de ensayo producen metabolitos reactivos y, adicionalmente, que no todos los compuestos de ensayo producen metabolitos reactivos tanto "blandos" como "duros". Algunos compuestos de ensayo producirán metabolitos no reactivos, algunos compuestos de ensayo producirán solo metabolitos reactivos duros, algunos compuestos de ensayo producirán solo metabolitos reactivos blandos, y algunos compuestos de ensayo producirán metabolitos reactivos tanto duros como blandos. De esta manera, el agente de captación y los procedimientos de la presente invención detectarán cualquier tipo de metabolito reactivo que se produzca por un compuesto de ensayo.

Un especialista en la técnica reconocerá adicionalmente que los procedimientos de la presente invención, aunque se

dirigen a identificar metabolitos reactivos, abarcan también el procedimiento de determinar si un compuesto de ensayo produce o no metabolitos reactivos. En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar candidatos a fármaco (por ejemplo, compuestos de ensayo que no producen metabolitos reactivos). De esta manera, los procedimientos de la presente invención incluyen procedimientos en los que la incubación (como se describe con más detalle en el presente documento) da como resultado metabolitos no reactivos y, de esta manera, no aductos, y los espectros de masas no muestran dobletes, indicando así que el compuesto de ensayo no produce ningún metabolito reactivo detectable.

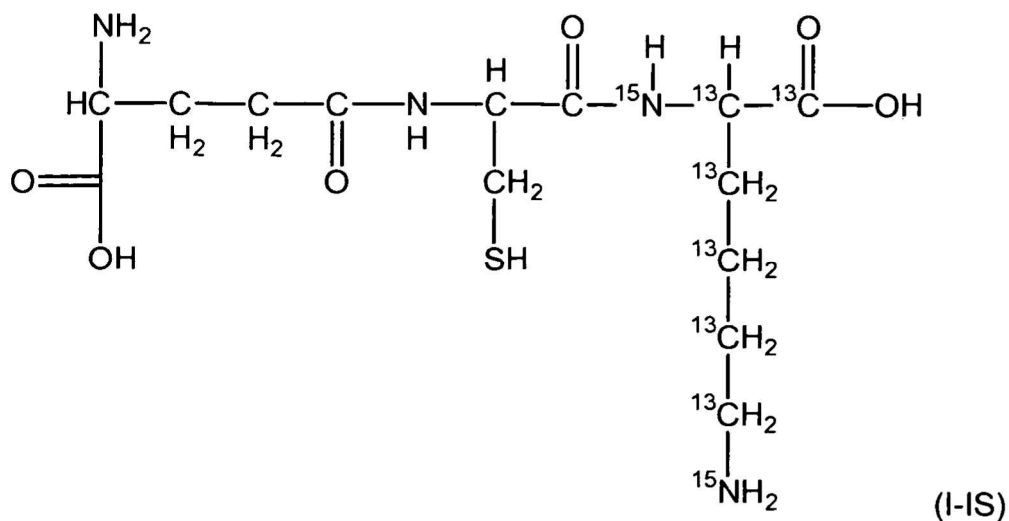
Para los metabolitos "blandos", el glutatión, un compuesto de la siguiente estructura química



es el agente de captación más habitual usado en incubaciones microsómicas, para detectar metabolitos reactivos "blandos". Sin embargo, para metabolitos reactivos "duros", el glutatión no es un agente de captación adecuado debido a su baja eficacia de captación. No obstante, para detectar metabolitos reactivos "duros" se usan agentes de captación alternativos, tales como semicarbazida, metoxilamina y  $\alpha$ -acetilisina. Esto requiere dos experimentos individuales con diferentes agentes de captación para la detección de metabolitos reactivos tanto "duros" como "blandos". En contraste, el compuesto de fórmula (I), los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I\*) y / o una mezcla de compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) puede usarse para detectar metabolitos reactivos tanto "blandos" como "duros" en un solo experimento.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "**compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I)**" significará un compuesto de fórmula (I) que está marcado con al menos un isótopo, por ejemplo,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{34}\text{S}$ , y similares. Preferentemente, el isótopo es  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  o  $^2\text{H}$ . Los ejemplos adecuados de compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) incluyen, aunque sin limitación, compuestos de fórmula (I) marcados con  $^{13}\text{C}$  y/o  $^{15}\text{N}$  en su cisteína; compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente en sus grupos tanto cisteína como lisina; compuestos de fórmula (I) marcados en una sola o en múltiples posiciones, que varían de 1 a 28, preferentemente de 1 a 10 posiciones, más preferentemente de 3 a 8 posiciones, aún más preferentemente 8 posiciones; y similares. Preferentemente, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con al menos un isótopo seleccionado entre el grupo que consiste en  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  y  $^2\text{H}$ . Más preferentemente, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) (I) está marcado con dos isótopos  $^{15}\text{N}$  y seis  $^{13}\text{C}$ .

En una realización, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado isotópicamente como se indica en la estructura química (I-IS) mostrada a continuación



Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa "enzima de metabolización de fármaco" significará cualquier enzima o mezcla de las mismas, derivada de tejidos humanos o animales, preferentemente derivada de tejidos humanos, más preferentemente derivada de tejido de hígado humano, que puede metabolizar un compuesto de ensayo. (Véase, por ejemplo, Drug Metabolizing Enzymes, Editado por Jae S. Lee, R. Scott Obach y Michael B. Fisher, Marcel Dekker, Inc. (2003)). Los ejemplos adecuados incluyen, aunque sin limitación, microsomas hepáticos, enzimas de tipo citocromo P450 o mezclas de diferentes isoformas de enzimas de tipo citocromo P450, peroxidasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasas, y similares. Preferentemente, las enzimas de metabolización de fármaco son microsomas hepáticos humanos, más preferentemente, enzimas de tipo citocromo P450. Un especialista en la técnica reconocerá que cuando se incubaba un compuesto de ensayo con enzimas de tipo citocromo P450 o mezclas de diferentes isoformas de enzimas de tipo citocromo P450, las enzimas de tipo citocromo P450 o mezclas de diferentes isoformas de enzimas de tipo citocromo P450 se incubaban en combinación con el co-factor NADPH o el sistema de regeneración de NADPH.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "compuesto de ensayo" significará cualquier compuesto químico que se ensaye para la formación del metabolito o metabolitos reactivos. Preferentemente, el compuesto de ensayo es un agente farmacéutico o sal, éster o profármaco del mismo.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, la expresión "candidato a fármaco" significará cualquier compuesto químico o compuesto de ensayo que no produzca un metabolito o metabolitos reactivos. Preferentemente, el candidato a fármaco es un agente farmacéutico o sal, éster o pro-fármaco del mismo.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, el término "aducto" significará cualquier complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo con un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) o con un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I).

Las abreviaturas usadas en la memoria descriptiva, particularmente en los Esquemas y Ejemplos, son las siguientes:

IQPA-EM/EM = Ionización química a presión atmosférica- espectrometría de masas en tándem

35 CIP= Enzimas de tipo citocromo P450

Da = Dalton

IEN-EM/EM = Ionización por electronebulización-espectrometría de masas en tándem

HPLC = Cromatografía líquida a alta presión

EM = Espectroscopía de masas

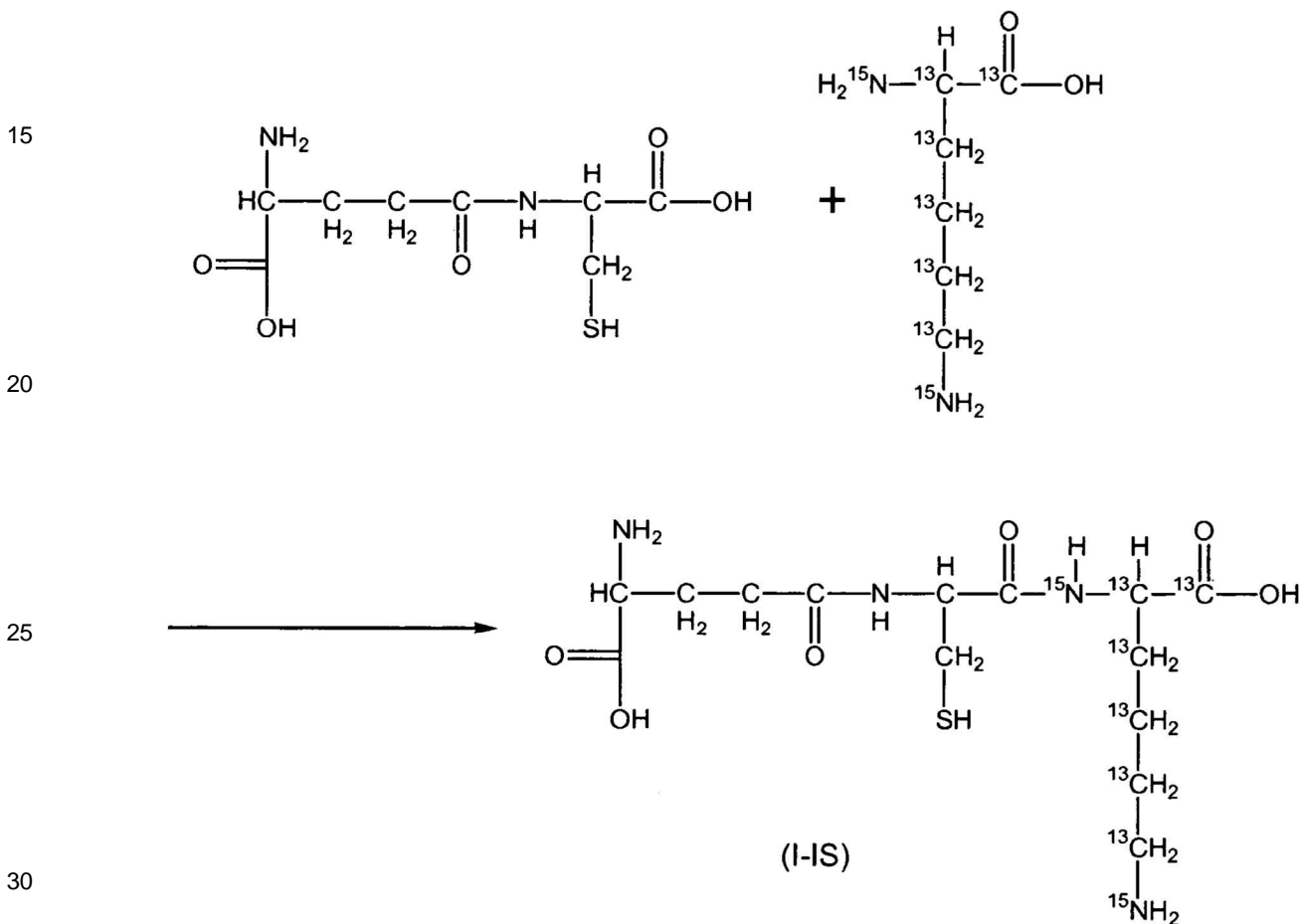
40 NADPH = p-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)

EFS Extracción en fase sólida

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable de los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, preferentemente con uno o más isótopos  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$  y / o  $^{34}\text{S}$ . El

compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) puede prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo por intercambio de isótopo o por síntesis de acoplamiento peptídico usando un reactivo marcado isotópicamente/material de partida. (Véase, por ejemplo, Ott, Donald G., Syntheses with Stable Isotopes of Carbon, Nitrogen, and Oxygen, (1981), Wiley, Nueva York, N. Y.; Keliher, Edmund J.; Burrell, Ricduro C.; Chobanian, Harry R.; Conkrite, Karina L; Shukla, Rajesh; Baldwin, John E., Efficient syntheses of four stable - isotope labelled (1R)-menthyl (1S,2S)-(+)-2-phenylcyclopropanecarboxylates, Organic & Biomolecular Chemistry, (2006), 4(14), pág. 2777-2784; Schippers, Nicole; Schwack, Wolfgang, Synthesis of the 15N-labelled insecticide imide-clopidr, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, (2006), 49(3), pág. 305-310; y Bretz, Michael; Beyer, Marita; Cramer, Benedikt; Humpf, Hans-Ulrich, Synthesis of stable isotope labelled 3-acetyldeoxynivalenol, Molecular Nutrition & Food Research, (2005), 49(12), pág. 1151-1153).

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS). El compuesto de fórmula (I-IS) puede prepararse como se indica en el Esquema 1 a continuación.



Esquema 1

Por consiguiente, se hace reaccionar el ácido 2-amino-4-(1-carboxi-2-mercapto-etilcarbamoi)-butírico con lisina marcada isotópicamente, de acuerdo con la química conocida (por ejemplo por condensación ácido-amina con pérdida de agua; véase, por ejemplo, Wade, L.G., Organic Chemistry, Cuarta Edición, Prentice Hall, 1999, pág.. 136-137), para producir el compuesto de fórmula (I-IS).

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I)



5 pérdida neutra como una exploración de inspección. Usando este sistema, pueden obtenerse espectros de EM en tándem de los aductos en un solo ensayo, y la identificación estructural puede conseguirse examinando los iones producidos característicos. Sin embargo, debido a la menor proporción de señal a ruido conseguida típicamente con exploraciones EM completas respecto a exploraciones EM con pérdida neutra, puede ser difícil detectar un metabolito reactivo minoritario usando los sistemas de exploración EM completa. Además, las exploraciones EM completas tardan relativamente mucho tiempo y son laboriosas.

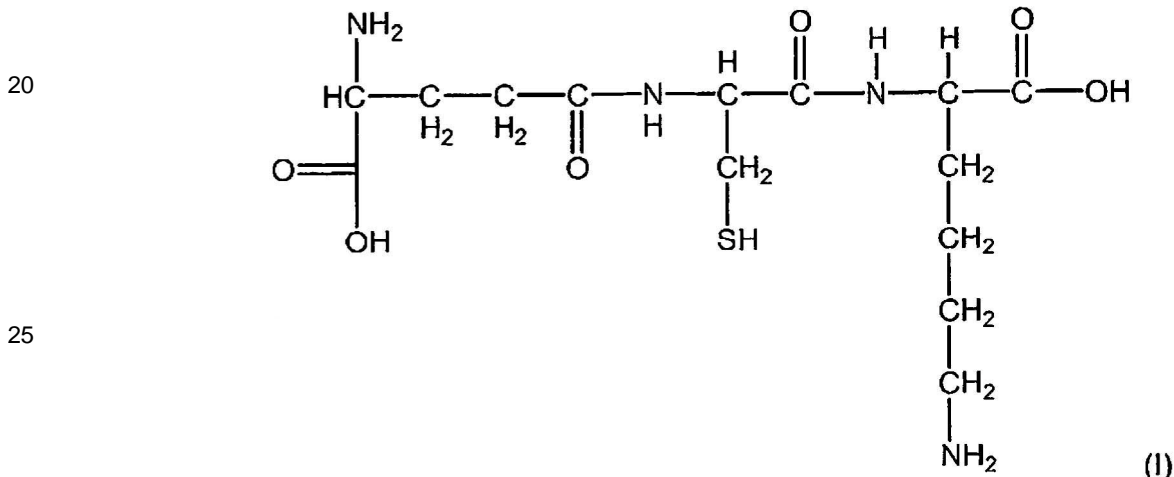
La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

10 (a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I), un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, y una enzima de metabolización de fármaco para producir una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

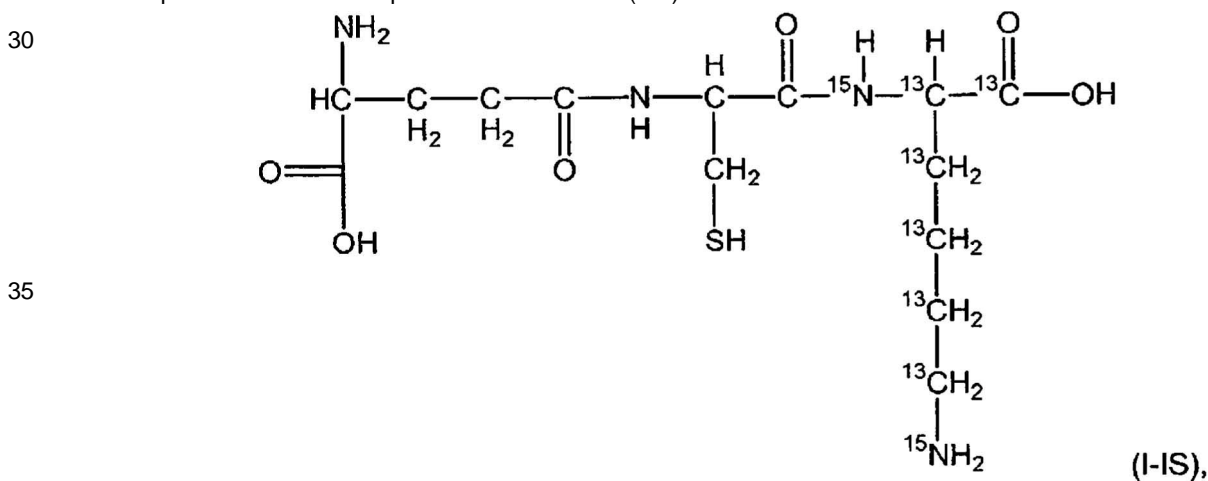
15 (b) detectar uno o más dobletes isotópicos en un espectro de masas con pérdida neutra de los aductos de la etapa (a), en el que el doblete difiere en masa por la diferencia en masa entre el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

(a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto de fórmula (I),



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS)



40 y una enzima de metabolización de fármaco;  
para producir una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

- (b) medir un espectro de masas con pérdida neutra del uno o más aductos producidos en la etapa (a); y
- (c) detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la etapa (b), en el que los dobletes isotópicos difieren en masa de 8 Da.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

(a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I), un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente, y una enzima de metabolización de fármaco para producir una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

10 (b) separar el uno o más aductos de la etapa (a); (de acuerdo con procedimientos conocidos, preferentemente, por centrifugación)

(c) medir un espectro de masas con pérdida neutra de dichos aductos separados

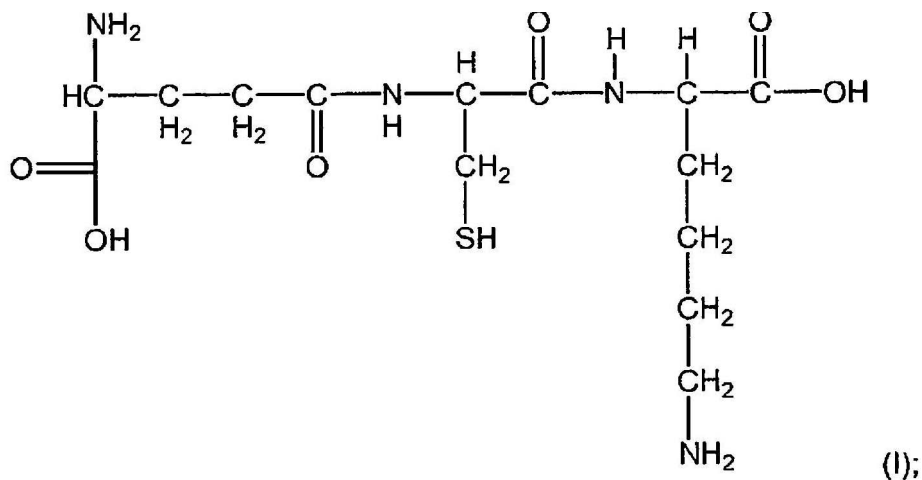
15 (d) detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de dichos aductos separados, en el que el doblete difiere en masa por la diferencia en masa entre el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

Etapa A: incubar una mezcla que comprende

(a) un compuesto de ensayo;

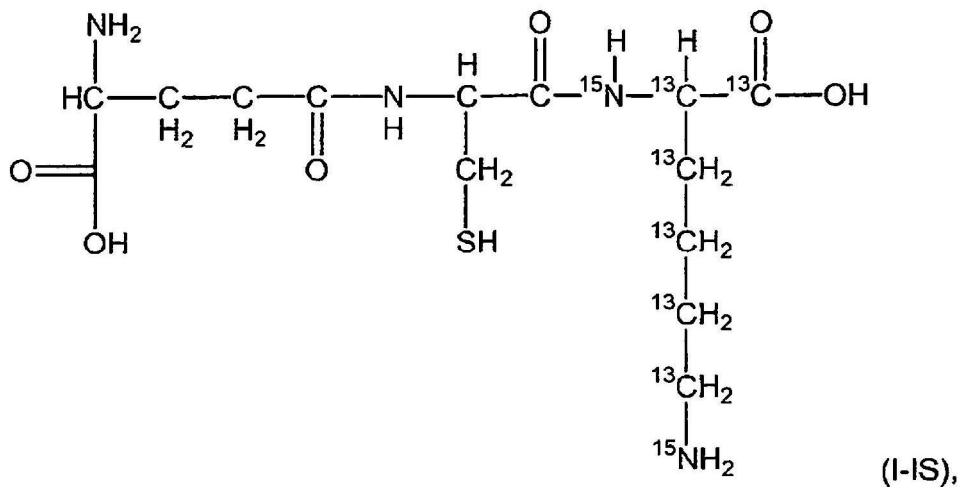
20 (b) un compuesto de fórmula (I)



(c) un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS)

35

40



en la que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) es de aproximadamente 1:1; y

15 (c) una enzima de metabolización de fármaco seleccionada entre el grupo que consiste en microsomas hepáticos humanos, enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el co-factor NADPH y enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el sistema de regeneración NADPH;

para producir una mezcla de producto que comprende uno o más productos de incubación seleccionados ente el grupo que consiste en un metabolito no reactivo;

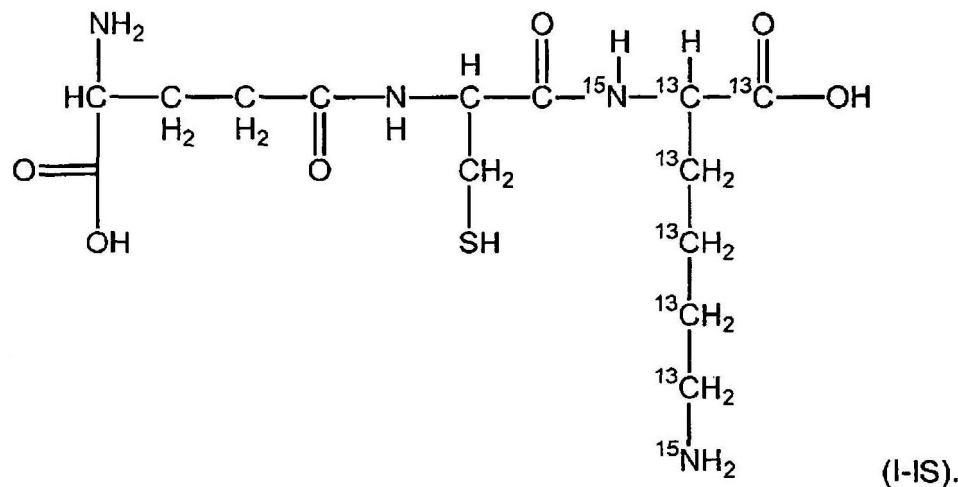
(a) un aducto formado entre el compuesto de fórmula (I) y un metabolito reactivo; y

20 (b) un aducto formado entre el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) y un metabolito reactivo;

Etapla B: medir un espectro de masas con pérdida neutra de la mezcla de producto producida en la Etapa (A); y

Etapla C: detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la Etapa (B), en el que los dobletes isotópicos difieren en masa de 8 Da.

25 En una realización de la presente invención, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I) está marcado con al menos un isótopo seleccionado entre el grupo que consiste en <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O y <sup>2</sup>H. En otra realización de la presente invención, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con 1 a 28 isótopos, preferentemente 1 a 10 isótopos. En otra realización de la presente invención, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con seis átomos <sup>13</sup>C y dos <sup>15</sup>N. En otra realización de la presente invención, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) es el compuesto de fórmula (I-IS)



40 En una realización de la presente invención, el espectro de masas con pérdida neutra se usa para detectar la pérdida de

129 Da (correspondiente a la pérdida de la parte  $-C(O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-CO_2H$  del compuesto no marcado isotópicamente o marcado isotópicamente de fórmula (I\*)).

5 En una realización de la presente invención, el doblete o dobletes isotópicos se detectan siguiendo IQPA-EM/EM, IEN-EM/EM, y similares; preferentemente IEN-EM/EM. En otra realización de la presente invención, el doblete o dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra difiere en una masa de entre 1 y 28 unidades de masa, preferentemente entre 2 y 10 unidades de masa, más preferentemente en 8 unidades de masa.

En una realización de la presente invención, la enzima de metabolización de fármaco se selecciona entre el grupo que consiste en microsomas hepáticos humanos, enzimas de tipo citocromo P450, peroxidasas, ciclooxigenasas y mieloperoxidasas. Preferentemente, la enzima de metabolización de fármaco son enzimas de tipo citocromo P450.

10 En una realización, la presente invención se aplica a la detección de metabolitos reactivos formados incubando un compuesto de ensayo con cualquier fracción de células que contienen enzimas de metabolización de fármacos, por ejemplo, S9, enzimas recombinantes o enzimas microsómicas. En una realización, los procedimientos de la presente invención se aplican a la predicción de si un compuesto de ensayo formará o no metabolitos reactivos en sujetos humanos (es decir, después de la administración del compuesto de ensayo a un ser humano).

15 Un especialista en la técnica entenderá que la abreviatura "S9" se refiere a la fracción S9 (fracción de sobrenadante post-mitocondrial) que es una mezcla de microsomas y citosol. Por consiguiente, contiene una gran diversidad de enzimas de fase I y fase II, incluyendo enzimas P450, flavina-monooxigenasas, carboxilesterasas, epóxido hidrolasa, UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, metiltransferasas, acetiltransferasas, glutatión S-transferasas y otras enzimas de metabolización de fármacos.

20 La presente invención se refiere adicionalmente a una mezcla que comprende (a) un complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y (b) un complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre y / o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente.

25 En una realización de la presente invención, la proporción molar del compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,5, más preferentemente aproximadamente 1:1.

30 En una realización de la presente invención, la proporción molar del complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el complejo unido covalentemente de un metabolito reactivo y un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,5, más preferentemente aproximadamente 1:1.

35 La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para detectar metabolitos reactivos. Más específicamente, en el procedimiento de la presente invención, un compuesto de ensayo se incuba con una mezcla que comprende

(a) un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I);

(b) un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), en el que el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) contiene seis átomos  $^{13}C$  y dos  $^{15}N$ ;

40 en el que la proporción molar de compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) a compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) es de aproximadamente 1:1 (para producir dobletes en el espectro de masas que tienen aproximadamente la misma intensidad); y

(c) una enzima de metabolización de fármaco tal como, microsomas hepáticos humanos, enzimas de tipo citocromo P450 (CIP) (purificadas, recombinantes, en microsomas, en células hepáticas, y similares) en combinación con el co-  
45 factor NADPH, enzimas de tipo citocromo P450 (CIP) (purificadas, recombinantes, en microsomas, en células hepáticas, y similares) en combinación con el sistema de regeneración de NADPH, peroxidasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasas, y similares; preferentemente microsomas hepáticos humanos;

de acuerdo con procedimientos conocidos;

50 para producir una mezcla de producto que comprende uno o más productos de incubación seleccionados entre el grupo que consiste en

(a) un metabolito no reactivo;

- (b) un aducto formado entre un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y un metabolito reactivo; y
- (c) un aducto formado entre un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) y un metabolito reactivo.

Un especialista en la técnica reconocerá que los metabolitos no reactivos (estables), producidos como resultado de la incubación descrita anteriormente, no reaccionarán ni con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) ni con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), sino que en lugar de ello permanecerán en la mezcla de producto sin alterarse.

Preferentemente, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con uno o más isótopos que se seleccionan para que sean estables. Los isótopos adecuados incluyen, aunque sin limitación,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ , y similares. Preferentemente, los isótopos se seleccionan entre el grupo que consiste en  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  y  $^2\text{H}$ , más preferentemente  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . Preferentemente, el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) difiere en masa del compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) por entre 1 y 28 unidades de masa, más preferentemente entre 2 y 10 unidades de masa, aún más preferentemente 8 unidades de masa.

La mezcla del producto que contiene uno o más de los productos de incubación (metabolito o metabolitos no reactivos, aductos formados entre el metabolito o metabolitos reactivos y el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y / o aductos formados entre el metabolito o metabolitos reactivos y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)) se limpia y concentra, preferentemente, de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo por centrifugación, EFS o extracciones líquido-líquido, para producir un concentrado de producto. El concentrado de producto se disuelve después en un disolvente adecuado para su uso en espectroscopía de masas (es decir, es adecuado para inyección en un espectrómetro de masas), por ejemplo, 5% de acetonitrilo en agua, 5% de metanol en agua, y similares.

Preferentemente, la mezcla de producto se separa en los componentes individuales del aducto, de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo por cromatografía líquida, HPLC, electroforesis capilar, u otra técnica de separación. Un espectro de masas con pérdida neutra se mide después para cada aducto o componente del aducto. El espectro de masas con pérdida neutra puede medirse de acuerdo con procedimientos conocidos, usando cualquier fuente de ionización, por ejemplo por IQPA-EM/EM, IEN-EM/EM, y similares, preferentemente por IEN-EM/EM. Como alternativa, la medición de la separación y el espectro de masas puede completarse en una etapa usando un sistema de bucle, tal como CL/EM, y similares.

Si se producen metabolitos reactivos a partir del compuesto de ensayo y están presentes (como aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*), el espectro de masas correspondiente presentará uno o más dobletes espaciados por la diferencia en masa entre el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*). Un especialista en la técnica reconocerá que el doblete o dobletes pueden identificarse por reconocimiento visual o usando un programa informático que evalúe los patrones de EM.

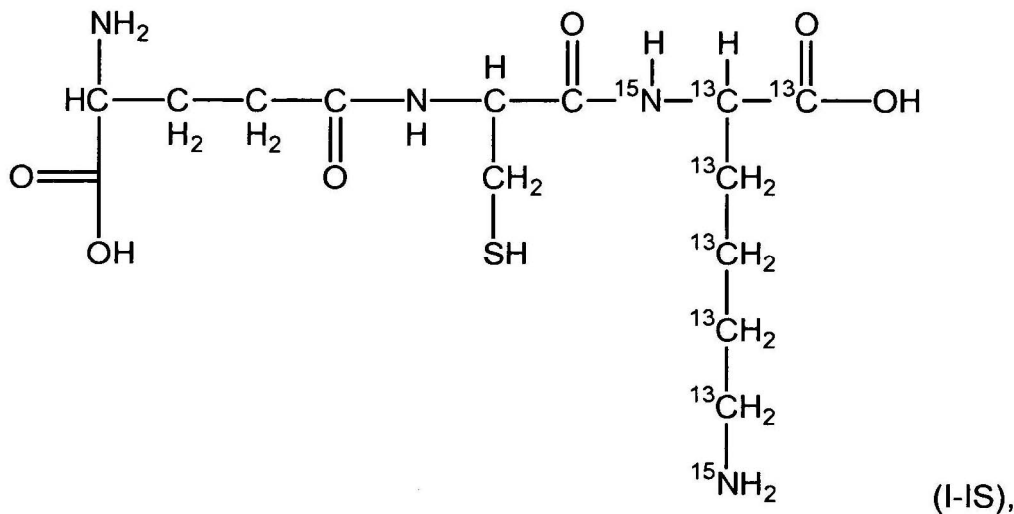
Como un ejemplo, en el que el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con seis átomos  $^{13}\text{C}$  y dos  $^{15}\text{N}$ , como en el compuesto de fórmula (I-IS), y el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) están presentes a una proporción molar de preferentemente aproximadamente 1:1, en disociación inducida por colisión, ambos aductos no marcado isotópicamente y marcado isotópicamente experimentarán una pérdida neutra de piroglutamato (129 Da). Como resultado de ello, el espectro de masas de los aductos formados entre metabolitos reactivos y el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) presentará dos iones moleculares isotópicos que difieren en masa de 8 Da, y el doblete isotópico mostrará intensidades aproximadamente iguales. Una diferencia en masa consistente de 8 Da y una intensidad aproximadamente igual de dichos picos del doblete proporcionarán, por lo tanto, una firma de EM única que identificaría al aducto del metabolito reactivo.

En los procedimientos de la presente invención, los falsos positivos se eliminan fácilmente puesto que no presentan un doblete característico en el espectro de masas con pérdida neutra medido.

La automatización de los procedimientos de la presente invención puede realizarse, por ejemplo, usando reconocimiento de patrones de EM asistida por ordenador. Como un ejemplo, se concibió un diagrama lógico para programar un ordenador para realizar la detección automática de los metabolitos reactivos. Más específicamente, el procedimiento de reconocimiento de patrones consistía en las siguientes etapas:

1. definir la tolerancia del error para el valor de m/z;
2. definir el intervalo de error de la proporción de intensidad de pico para un doblete isotópico potencial;
3. determinar los picos cromatográficos en el cromatograma de iones totales con un ajuste seleccionado de ruido a señal;
4. detectar los valores de m/z de iones moleculares principales de picos cromatográficos individuales;





en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente;

y una enzima de metabolización de fármaco; para producir una mezcla de producto;

15 (b) medir un espectro de masas con pérdida neutra de la mezcla de producto producida en la Etapa (a); y

(c) detectar la ausencia de dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la Etapa (b) (en el que el doblete o dobletes isotópicos difieren en masa por la diferencia en masa de 8 Da).

Los siguientes Ejemplos se exponen para ayudar a comprender la invención, y no pretenden ni deben considerarse limitantes de ninguna manera de la invención expuesta en las reivindicaciones que siguen más adelante.

## 20 **Ejemplo 1 - Procedimientos Convencionales**

### A. Incubación y Captación de Isótopos Estables:

25 Todas las incubaciones microsómicas descritas en el presente documento se realizaron a 37°C en un baño de agua. El compuesto de ensayo se mezcló con preparaciones microsómicas de hígado humano (preparaciones de enzima de tipo citocromo P450) en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,4) complementado con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-S) que se pre-mezclaron a una proporción molar equitativa de 1:1. Las mezclas resultantes se pre-calentaron a 37°C durante 5 min. A las mezclas de reacción se les añadió después el sistema generador del co-factor - NADPH - (para iniciar la reacción) para producir un volumen final de 1000 µl.

30 Las mezclas de reacción resultantes contenían compuestos de ensayo 10 µM, 1 mg/ml de proteínas microsómicas, una mezcla 1 mM del compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-S), NADP+ 1,3 mM, glucosa-6-fosfato 3,3 mM, 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cloruro de magnesio 3,3 mM.

35 Después de una incubación de 60 min, las reacciones se terminaron mediante la adición de 150 µl de tricloroacético ácido (10%). Las mezclas resultantes se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min a 4°C para sedimentar la proteína precipitada, y los sobrenadantes se sometieron a extracciones en fase sólida. Como alternativa, las mezclas de reacción se sometieron a extracciones líquido-líquido para recuperar los metabolitos de los sobrenadantes.

### B. Espectrometría de Masas:

40 Los análisis de EM se realizaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass (Manchester, RU) Quattro Micro. La fuente de iones de IEN se hizo funcionar en el modo ión positivo, y los parámetros experimentales se establecieron de la siguiente manera:

tensión capilar 3,2 kV, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de desolvatación 300°C, tensión de cono de muestra 26 V. Los espectros de masas recogidos en el modo de exploración con pérdida neutra se obtuvieron por exploración en un intervalo m/z 400-800 en 2,0 s.

### C. Análisis CL-EM/EM:

5 Para hacer un perfil completo de los metabolitos reactivos, las muestras se sometieron en primer lugar a separaciones cromatográficas con un sistema Agilent 1100 HPLC con un tomamuestras automático (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), y los eluyentes se introdujeron en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro que funcionaba en el modo de exploración con pérdida neutra. Se usó una columna Agilent Zorbax SB C18 (2,1 x 50 mm) para la separación cromatográfica. La fase móvil inicial consistía en 95% de agua (0,5% ácido acético), y los metabolitos se eluyeron usando un solo gradiente de 95% agua a 95% de acetonitrilo en 7 min a un caudal de 0,3 ml/min. A los 7 min, la columna se lavó abundantemente con 95% de acetonitrilo durante 2 min antes de re-equilibrarla a las condiciones iniciales. Se realizaron análisis CL-EM/EM en alícuotas de 10 µl de muestras limpias. Los datos se procesaron usando el hardware Masslynx, versión 4,0 de Micromass. Después se detectó un pico positivo, los espectros EM/EM se obtuvieron posteriormente para confirmar adicionalmente la estructura del aducto o aductos. Para adquirir los espectros DIC (Disociación Inducida por Colisión), el espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo de control de múltiples reacciones (CMR).

### **Ejemplo 2-9: Detección de Metabolitos Reactivos Blandos y/o Duros**

15 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 anterior, el procedimiento de la presente invención se aplicó a la detección de metabolitos reactivos de compuestos de ensayo conocidos, más particularmente a compuestos de ensayo que se conocen para producir metabolitos "blandos" y / o "duros", explorar el espectro de masas con pérdida neutra a una pérdida de 129 Da, y usar el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS), que difiere del compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) correspondiente en 8 unidades de Da.

### **Ejemplo 2: Diclofenaco**

20 El diclofenaco se seleccionó como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención a la detección de metabolito o metabolitos reactivos blandos.

25 La formación de dos metabolitos reactivos de diclofenaco y los aductos correspondientes, es como se indica en el Esquema E1, a continuación. En la reacción descrita a continuación, los metabolitos reactivos de diclofenaco forman aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto -SH. Por claridad, a continuación solo se muestran los aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo solo en el marcaje isotópico.

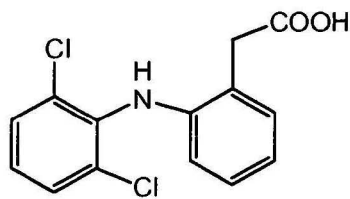
30

35

40

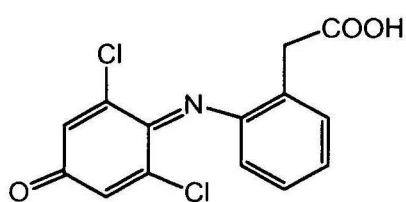
45

5



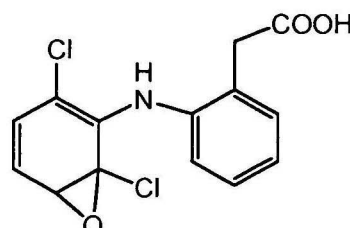
Diclofenaco

10



Metabolito reactivo I

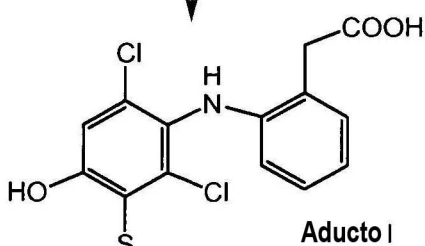
+



Metabolito reactivo II

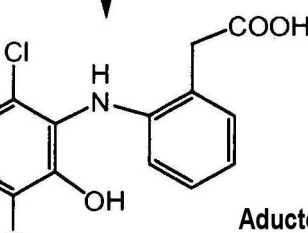
15

20



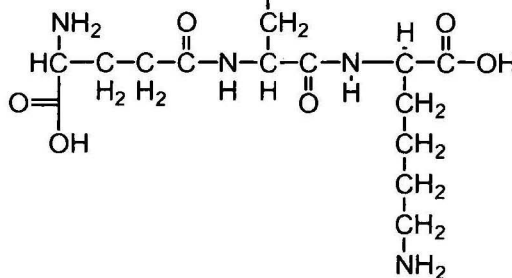
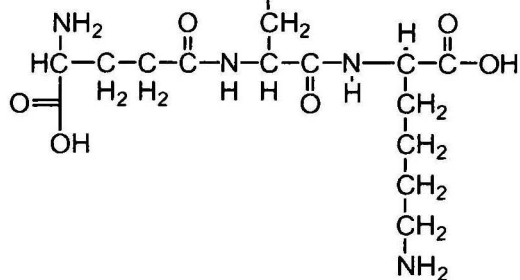
Aducto I

+



Aducto II

25



30

Esquema E1

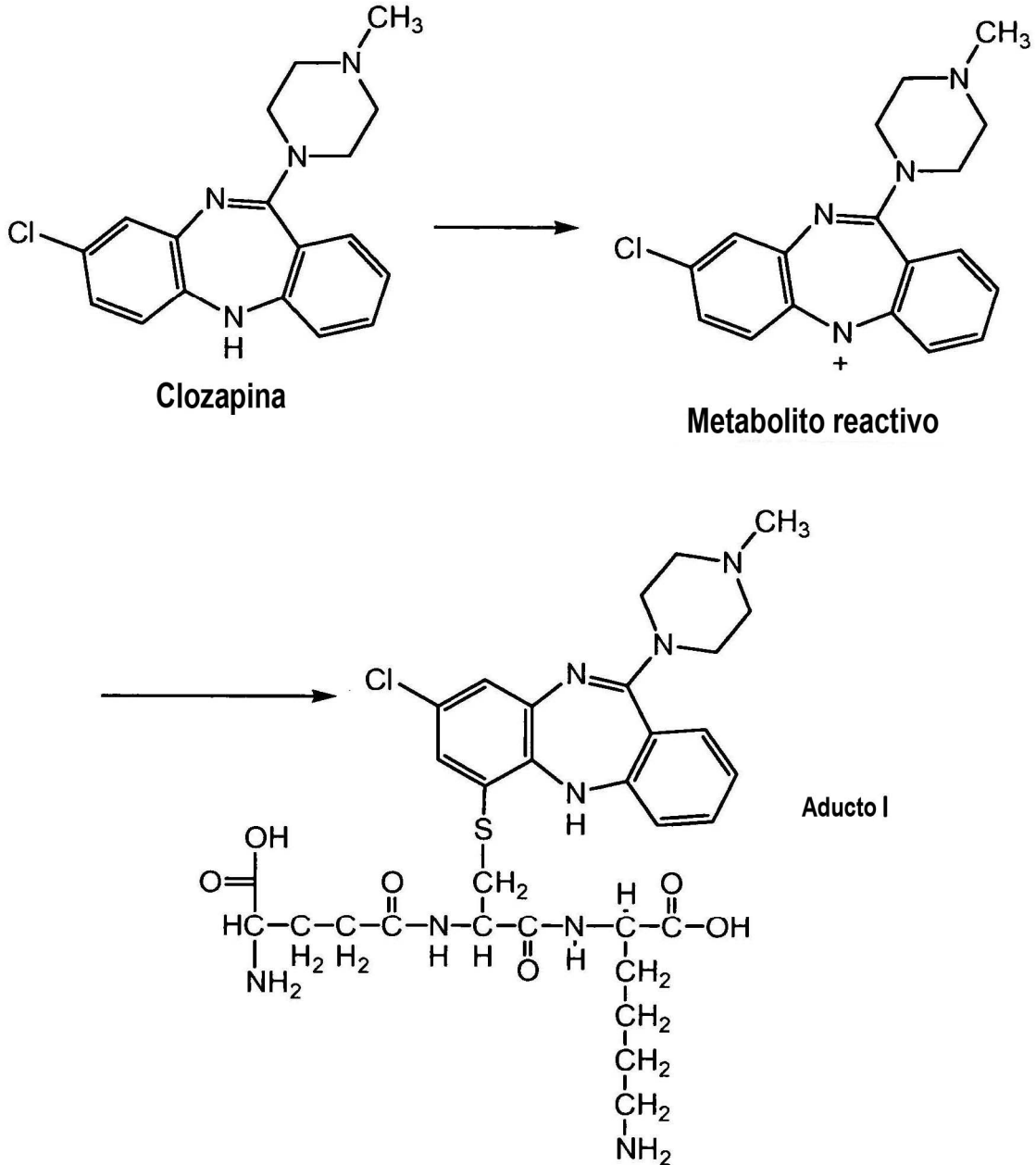
35

La Figura 1A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. Varios componentes mostraron una respuesta positiva a la exploración neutra, y dos de los componentes mostraron el doblete isotópico esperado (con una diferencia de masa de 8 Da). El aducto I se eluyó a un tiempo de retención de 5,9 min y presentó el doblete isotópico característico a m/z 688 y 696, como se muestra en la Figura 1B, mientras que el Aducto II aparecía a un tiempo de retención de 5,8 min y presentaba el doblete isotópico característico a m/z 654 y 662 Da, como se muestra en la Figura 1C.

**Ejemplo 3: Clozapina**

La clozapina se seleccionó como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención para la detección de un metabolito o metabolitos reactivos blandos.

La formación de un solo metabolito reactivo de clozapina y el aducto correspondiente, es como se indica en el Esquema E2, a continuación. En la reacción descrita a continuación, el metabolito reactivo de clozapina forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto -SH. Por claridad, a continuación solo se muestran los aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico.



Esquema E2

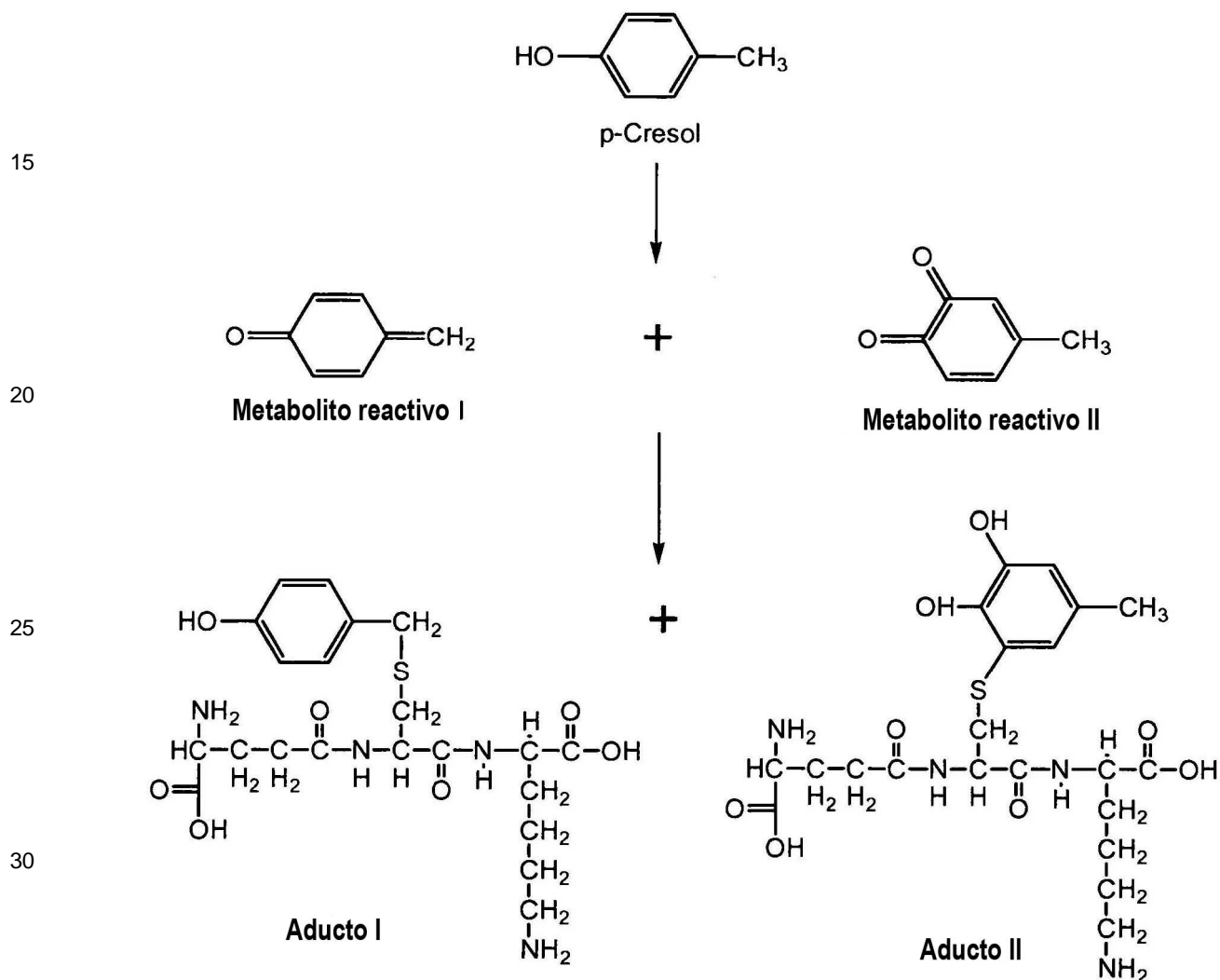
La Figura 2A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. Varios componentes mostraron una respuesta positiva a la exploración neutra, pero solo un

componente, a un tiempo de retención de 5,4 min, presentó el doblete isotópico característico a  $m/z$  703 y 711 Da, como se muestra en la Figura 2B.

#### Ejemplo 4: p-Cresol

Se seleccionó p-cresol como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención para la detección de un metabolito o metabolitos reactivos blandos.

La formación de dos metabolitos reactivos de p-cresol y los aductos correspondientes, es como se indica en el Esquema E3, a continuación. En la reacción descrita a continuación, los metabolitos reactivos de p-cresol forman aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto -SH. Por claridad, a continuación solo se muestran aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico.



Esquema E3

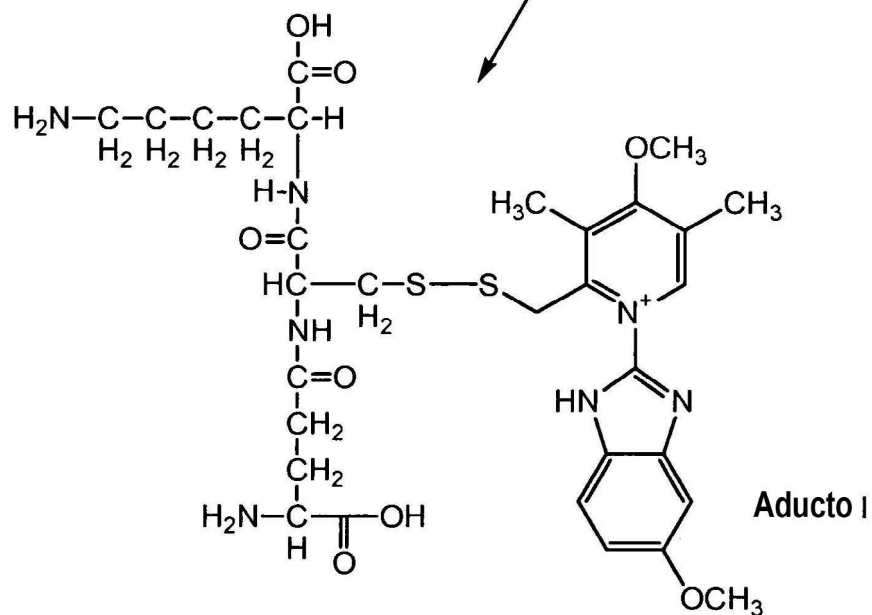
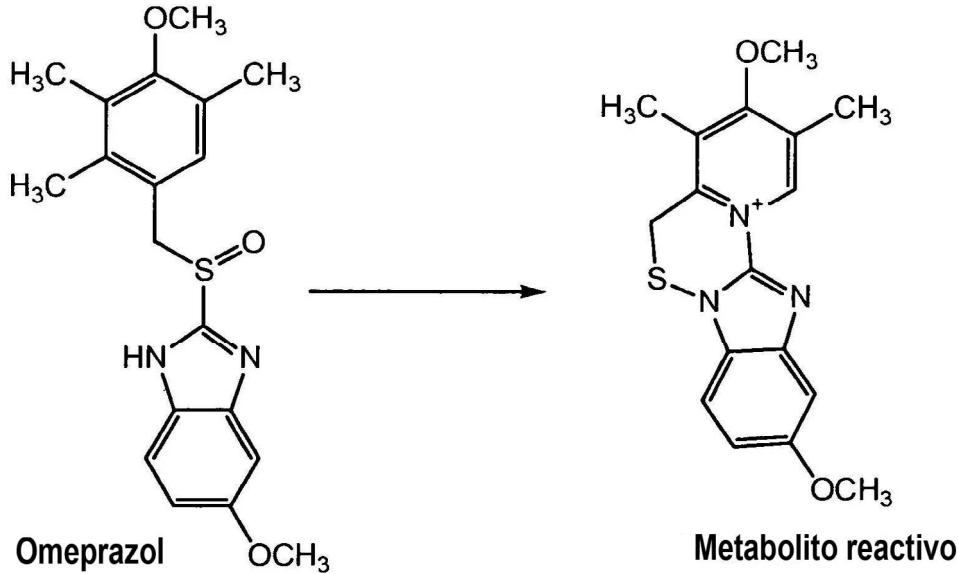
35 La Figura 3A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. Dos componentes mostraron el doblete isotópico característico. El Aducto I, con un tiempo de retención de 0,64 min, mostró el doblete isotópico a  $m/z$  485 y 493 Da, como se muestra en la Figura 3B. El Aducto II, con un tiempo de retención de 0,71 min, mostró el doblete isotópico a  $m/z$  501 y 509 Da, como se muestra en la Figura 3C.

40

**Ejemplo 5: Omeprazol**

El omeprazol se seleccionó como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención para la detección de un metabolito o metabolitos reactivos blandos.

La formación de un solo metabolito reactivo de omeprazol y el aducto correspondiente, es como se indica en el Esquema E4, a continuación. En la reacción descrita a continuación, el metabolito reactivo de omeprazol forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto -SH. Por claridad, a continuación solo se muestran aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I - IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico.



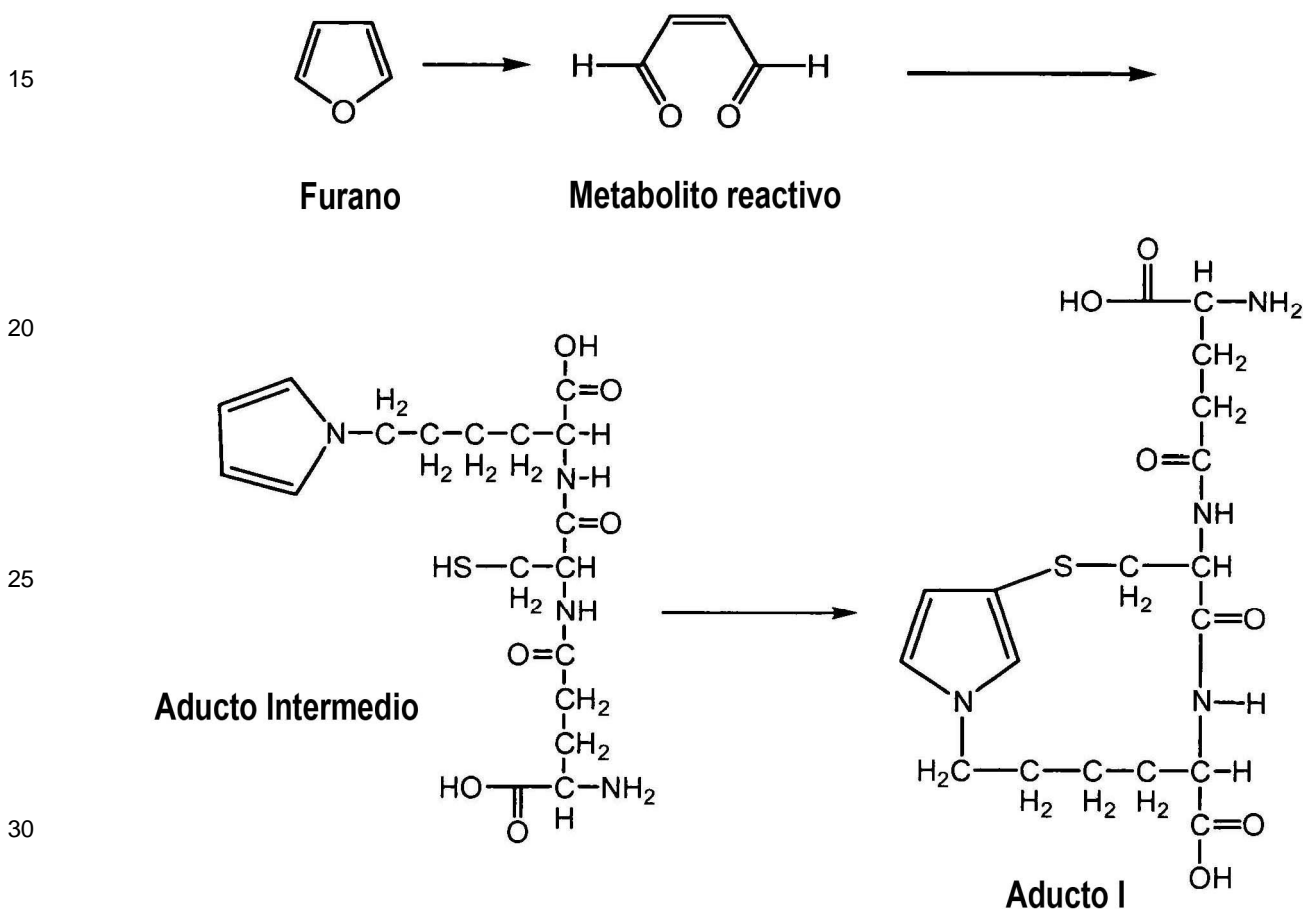
Esquema E4

La Figura 4A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. Solo un componente a un tiempo de retención de 5,3 min presentaba el doblete isotópico característico a  $m/z$  723 y 731 Da, como se muestra en la Figura 4B.

**Ejemplo 6: Furano**

El furano se seleccionó como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención para la detección de un metabolito o metabolitos reactivos duros.

La formación de un solo metabolito reactivo de furano y el aducto correspondiente, es como se indica en el Esquema E5, a continuación. En la reacción descrita a continuación, el metabolito reactivo de furano forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través tanto del resto -SH como del resto terminal -NH<sub>2</sub>. Por claridad, a continuación solo se muestran aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico.



Esquema E5

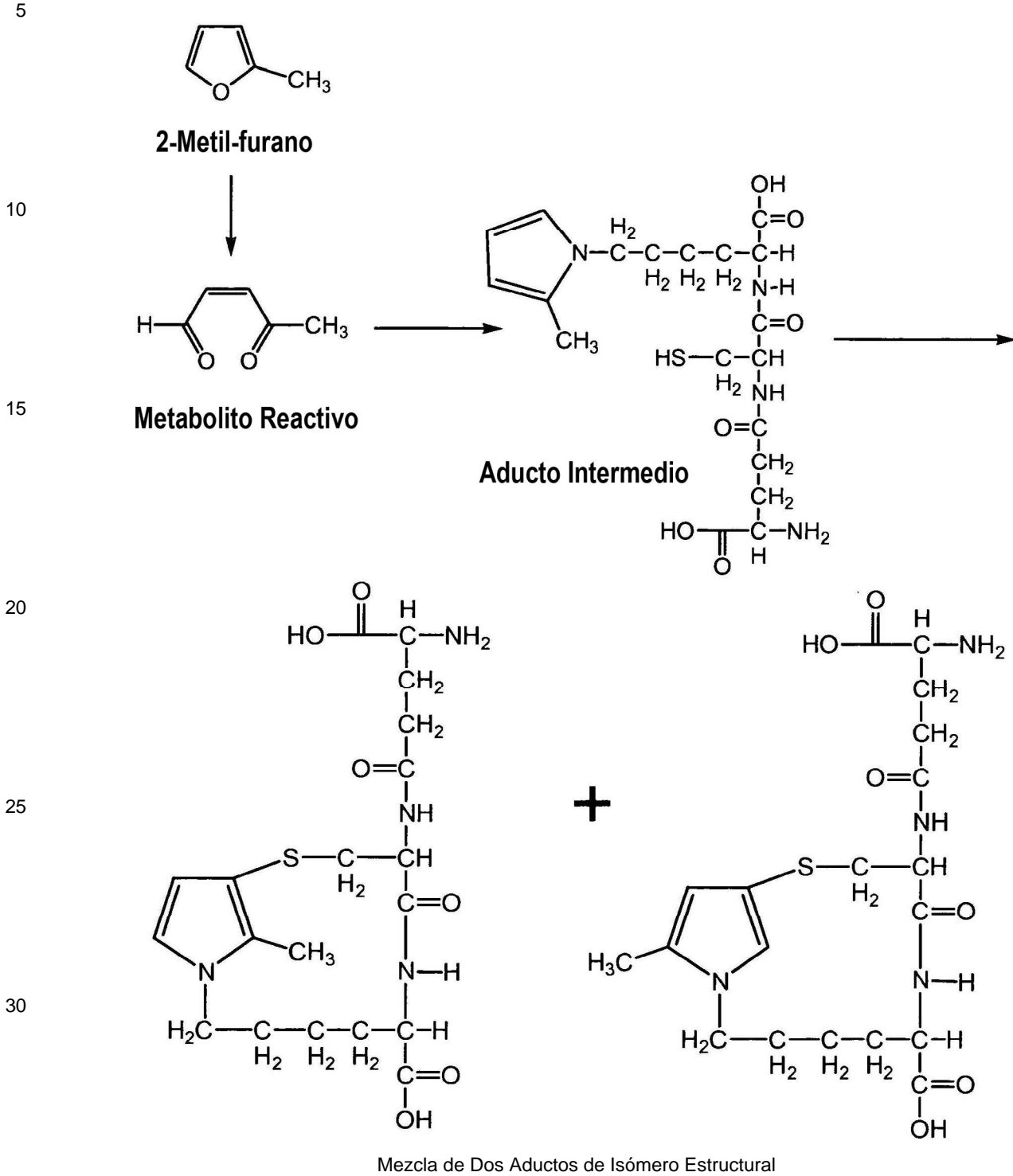
La Figura 5A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. El componente eluido a un tiempo de retención de 8,9 min presentaba el doblete isotópico característico a  $m/z$  427 y 435 Da, como se muestra en la Figura 5B.

**Ejemplo 7: 2-Metilfurano**

Se seleccionó 2-metilfurano como un compuesto de ensayo para demostrar la aplicabilidad del procedimiento de la presente invención para la detección de un metabolito o metabolitos reactivos duros.

La formación de un solo metabolito reactivo de 2-metilfurano y los dos aductos de isómero estructural correspondientes, es como se indica en el Esquema E6, a continuación. En la reacción descrita a continuación, el metabolito reactivo de 2-metilfurano forma dos aductos de isómero estructural con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través tanto del resto -SH como del resto terminal -NH<sub>2</sub>. Por claridad, a continuación solo se muestran aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un

especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico. Un especialista en la técnica reconocerá adicionalmente que los dos aductos de isómero estructural formados en este experimento producirán espectros de masas aproximadamente idénticos.

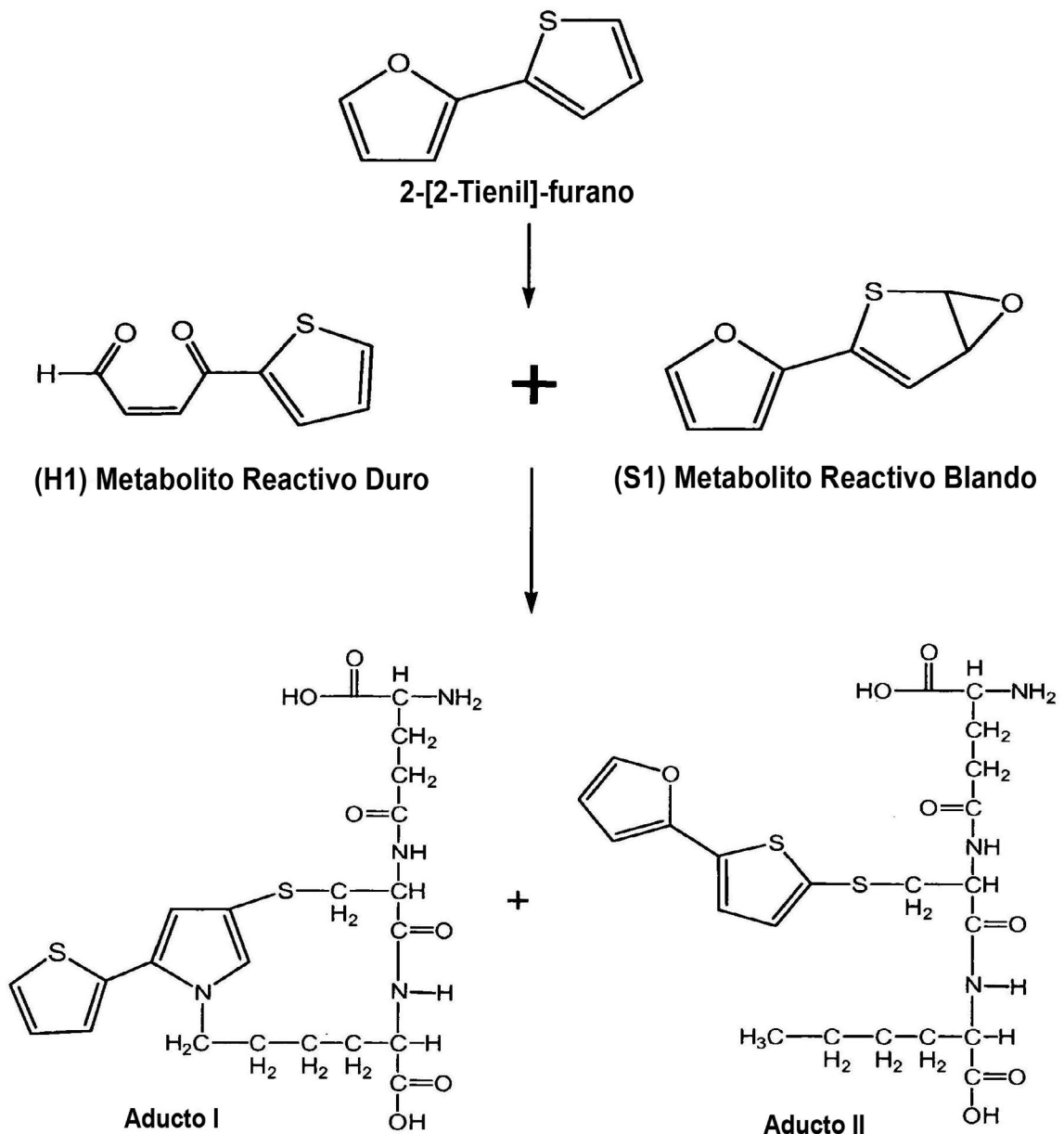


Esquema E6

La Figura 6A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. Dos aductos isoméricos (isómeros estructurales) con tiempos de retención de 5,6 min y 5,9 min presentaron cada uno un doblete isotópico característico a m/z 441 y 449 Da, como se muestra en la Figura 6B.

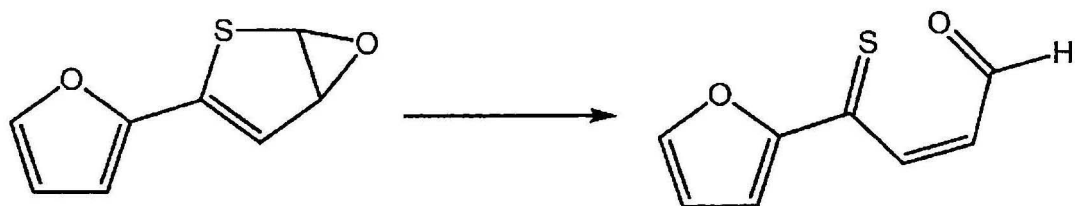


fórmula (I) y un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS), denominado posteriormente en el presente documento como "agente de captación GSK" es como se indica en los Esquemas E8 y E9, a continuación. Más específicamente, el Esquema 8 muestra la apertura del anillo de furano que genera un metabolito reactivo duro (H1), la epoxidación del anillo de tiofeno que genera un metabolito reactivo blando (S1), y la formación de los aductos correspondientes. Además, el Esquema 9 muestra la isomerización del metabolito reactivo (S1) para formar un segundo metabolito reactivo duro (H2), y la formación de su aducto correspondiente. El metabolito reactivo (H1) forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través tanto del resto -SH como del resto terminal -NH<sub>2</sub>; el metabolito reactivo (S1) forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto -SH; y el metabolito reactivo (H3) forma un aducto con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) a través del resto terminal -NH<sub>2</sub>. Por claridad, a continuación solo se muestran aductos con el compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I). Un especialista en la técnica reconocerá que los aductos con el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) tendrían la misma estructura, difiriendo únicamente en el marcaje isotópico.



Esquema E8

5

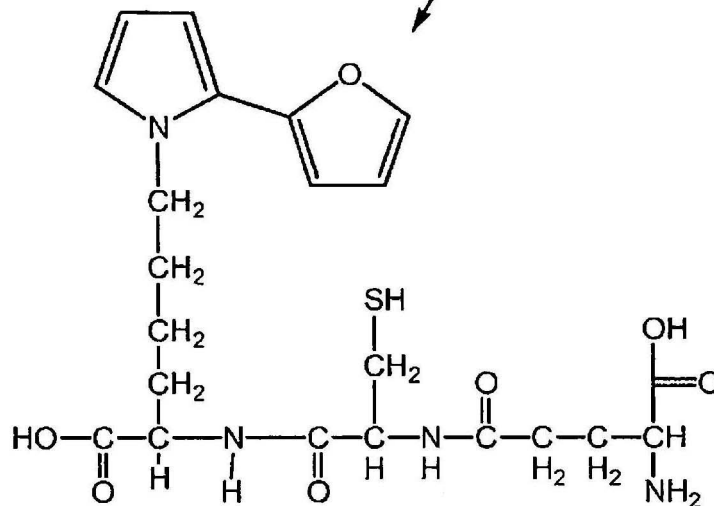


(S1) Metabolito reactivo blando

(H2) Metabolito Reactivo Duro

10

15



20

Adueto III

25

Esquema E9

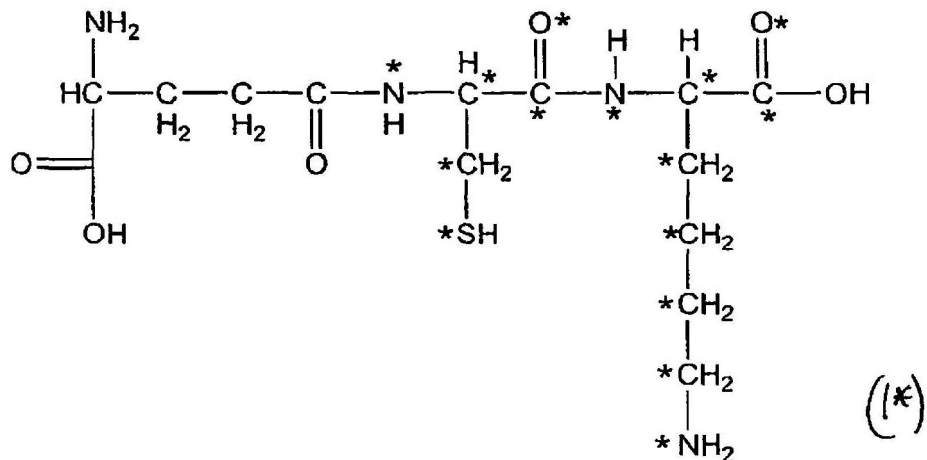
30

La Figura 8A muestra el cromatograma de iones totales (EM) de la exploración con pérdida neutra de 129 Da obtenido para la mezcla de reacción. El Adueto I, con un tiempo de retención de 6,5 min, mostraba el doblete isotópico característico a m/z 509 y 517 Da, como se muestra en la Figura 8B; el Adueto II mostraba el doblete isotópico característico a m/z 527 y 535 Da, como se muestra en la Figura 8C; y el Adueto III mostraba el doblete isotópico característico a m/z 495 y 503 Da, como se muestra en la Figura 8D.

La memoria descriptiva anterior muestra los principios de la presente invención, proporcionándose ejemplos con el fin de ilustración.



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)



en la que uno o más de los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre o hidrógeno no intercambiable en los grupos con asterisco está marcado isotópicamente; y una enzima de metabolización de fármaco;

para dar una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

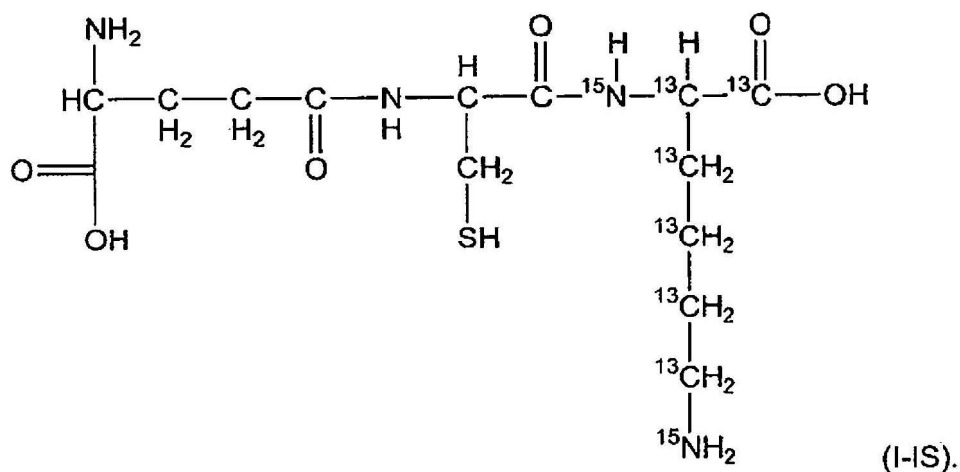
- 15 (b) detectar uno o más dobletes isotópicos en un espectro de masas con pérdida neutra del uno o más aductos producidos en la Etapa (a), en el que el doblete difiere en masa por la diferencia en masa entre el compuesto de fórmula (I) y el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*).

- 20 4. El compuesto de la reivindicación 1 o el procedimiento de la reivindicación 3, en el que el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con al menos un isótopo seleccionado entre el grupo que consiste en <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O y <sup>2</sup>H.

5. El compuesto o el procedimiento de la reivindicación 4, en el que el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) está marcado con de uno a diez isótopos seleccionados entre el grupo que consiste en <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N.

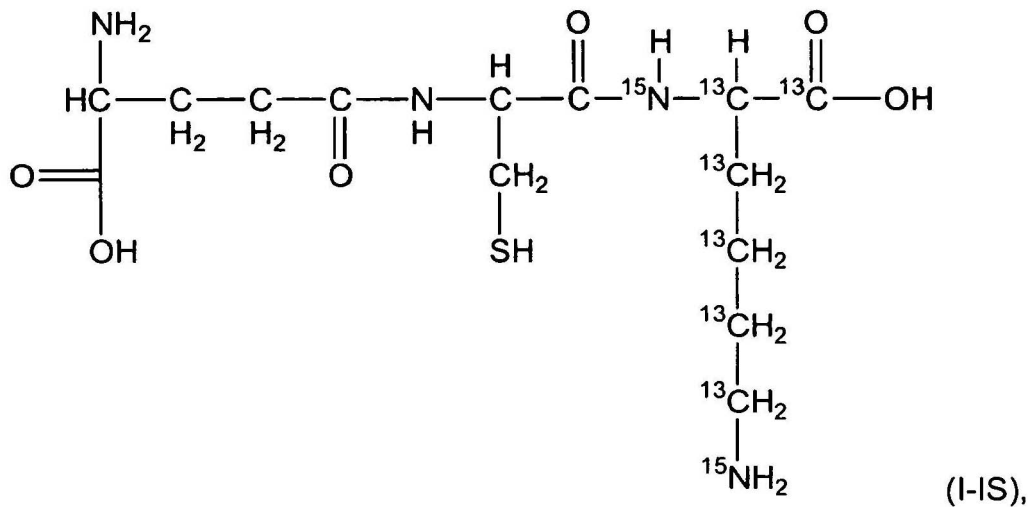
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) es 1:1 y en el que el doblete isotópico difiere en una masa de 8 unidades de masa.

7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (I-IS)





un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS)



y una enzima de metabolización de fármaco;

para dar una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

15 (b) medir un espectro de masas con pérdida neutra del uno o más aductos producidos en la etapa (a); y

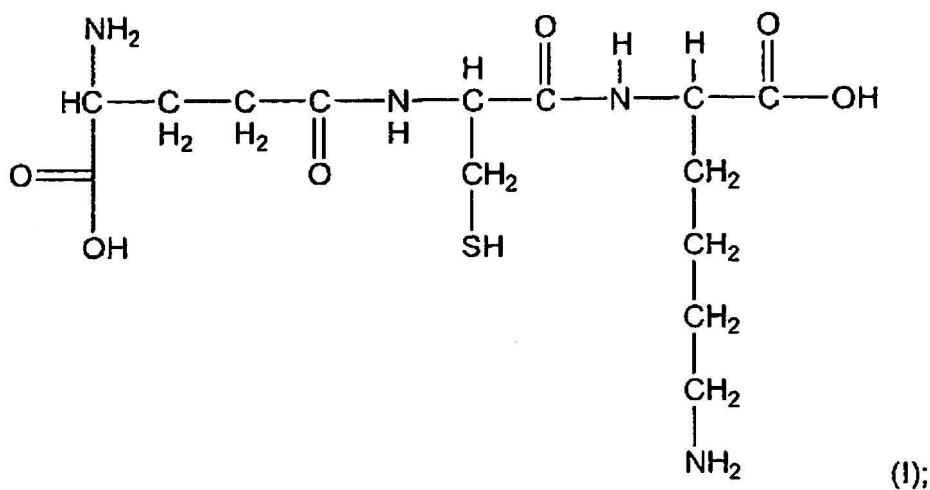
(c) detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la etapa (b), en el que los dobletes isotópicos difieren en masa de 8 Da.

12. Un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

Etapas A: incubar una mezcla que comprende

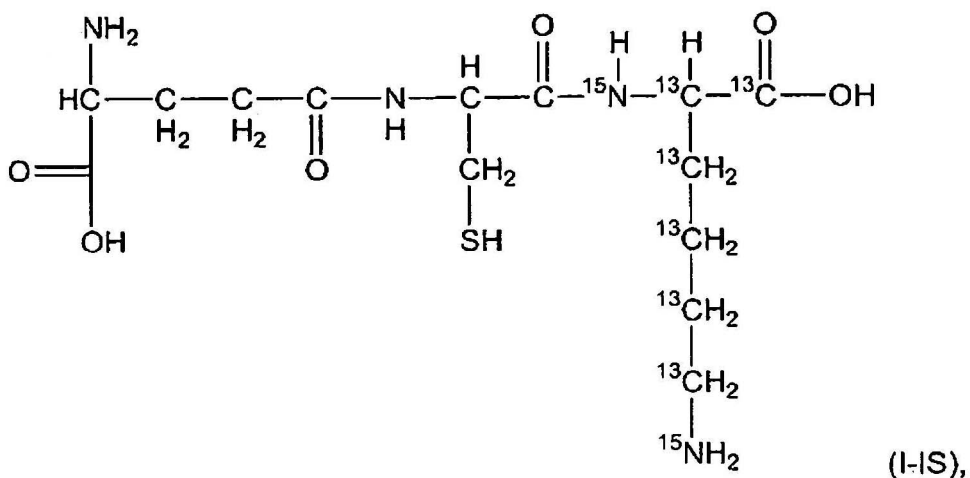
20 (a) un compuesto de ensayo;

(b) un compuesto de fórmula (I)



(c) un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS)

35



en la que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) es 1:1; y

15 (c) una enzima de metabolización de fármaco seleccionada ente el grupo que consiste en microsomas hepáticos humanos, enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el co-factor NADPH y enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el sistema de regeneración de NADPH;

para dar una mezcla de producto que comprende uno o más productos de incubación seleccionados ente el grupo que consiste en

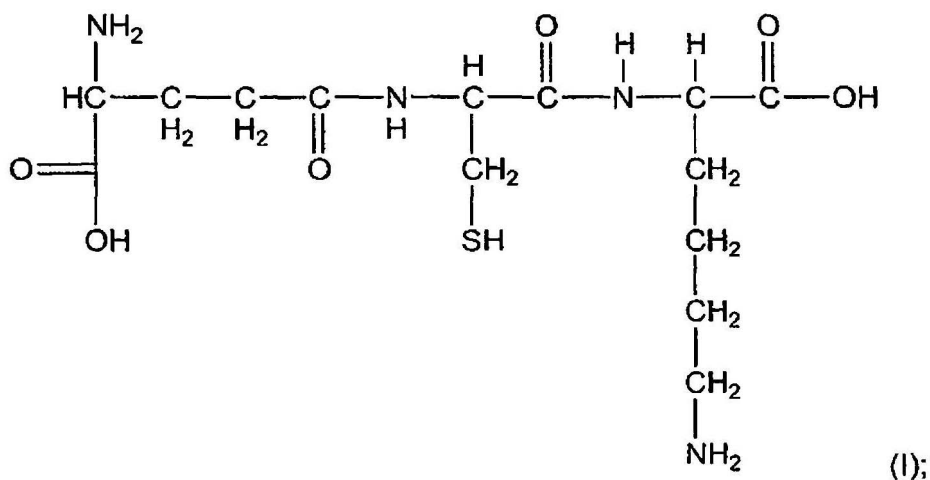
- 20 (a) un metabolito no reactivo;
- (b) un aducto formado entre el compuesto de fórmula (I) y un metabolito reactivo; y
- (c) un aducto formado entre el compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) y un metabolito reactivo;

Etapa B: medir un espectro de masas con pérdida neutra de la mezcla de producto producida en la Etapa (A); y

Etapa C: detectar uno o más dobletes isotópicos en un espectro de masas con pérdida neutra de la Etapa (B), en el que los dobletes isotópicos difieren en masa de 8 Da.

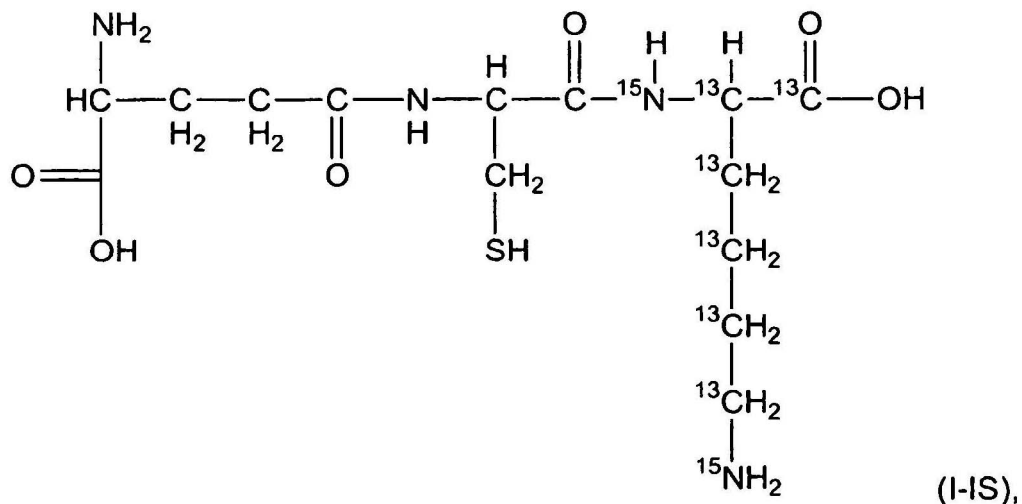
25 13. Un procedimiento para detectar metabolitos reactivos de un compuesto de ensayo que comprende

(a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I)



un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)





en la que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I-IS) es 1:1; y una enzima de metabolización de fármaco para dar una mezcla de producto que comprende uno o más aductos;

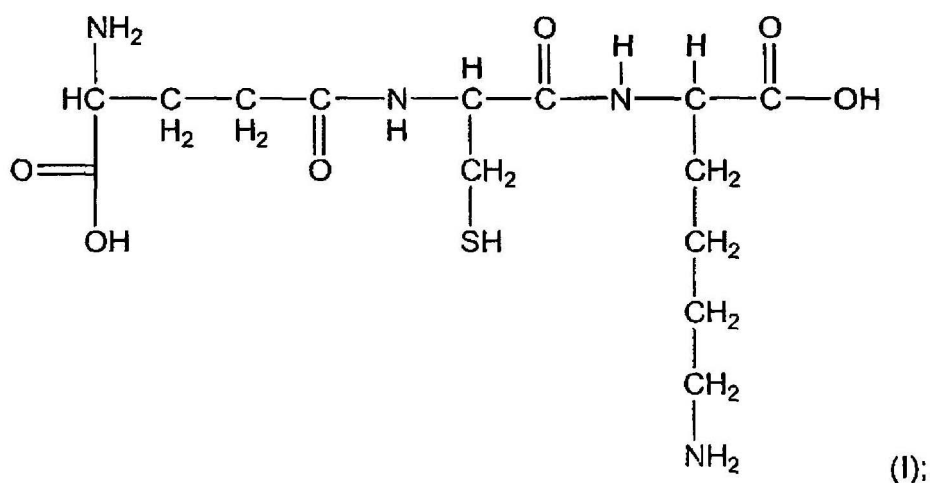
15 (b) separar el uno o más aductos de la etapa (a);

(c) medir un espectro de masas con pérdida neutra de dichos aductos separados;

(d) detectar uno o más dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de dichos aductos separados, en el que el doblete difiere en masa de 8 Da.

15. Un procedimiento para identificar un candidato a fármaco que comprende

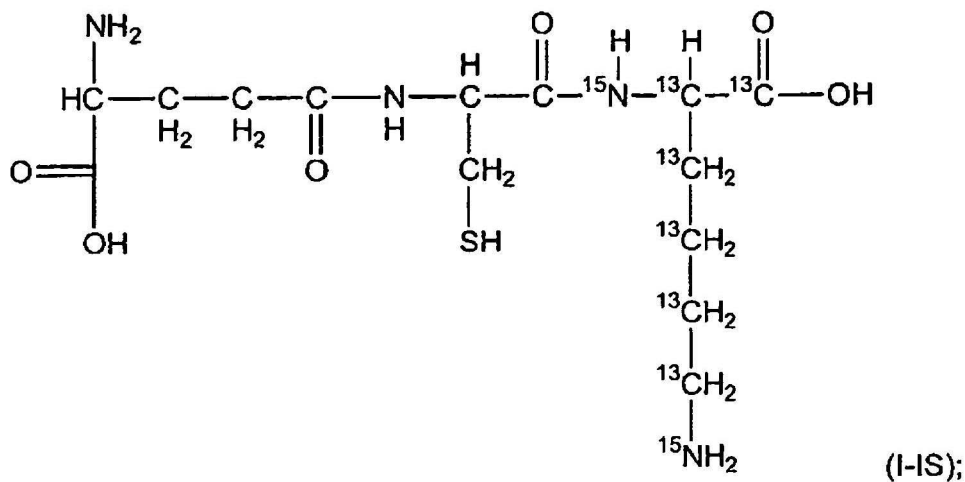
20 (a) incubar un compuesto de ensayo con una mezcla que comprende un compuesto no marcado isotópicamente de fórmula (I)



35

un compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*)





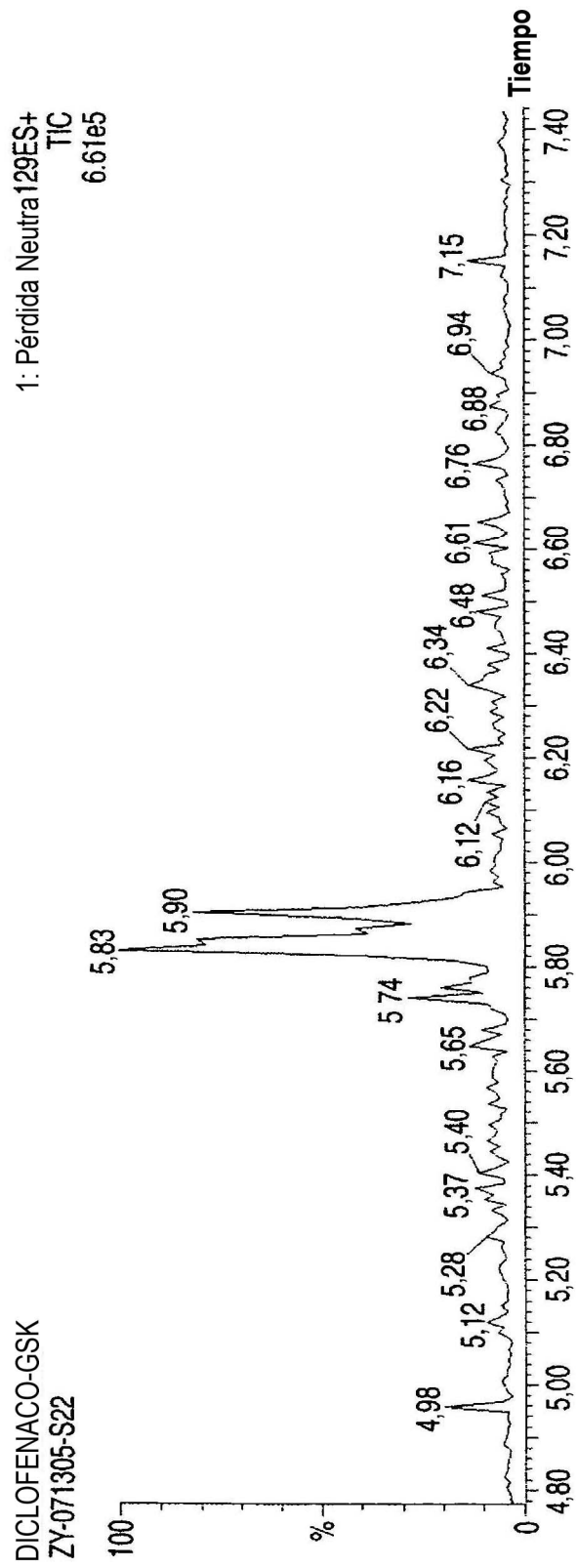
y una enzima de metabolización de fármaco; para dar una mezcla de producto;

(b) medir un espectro de masas con pérdida neutra de la mezcla de producto producida en la Etapa (a); y

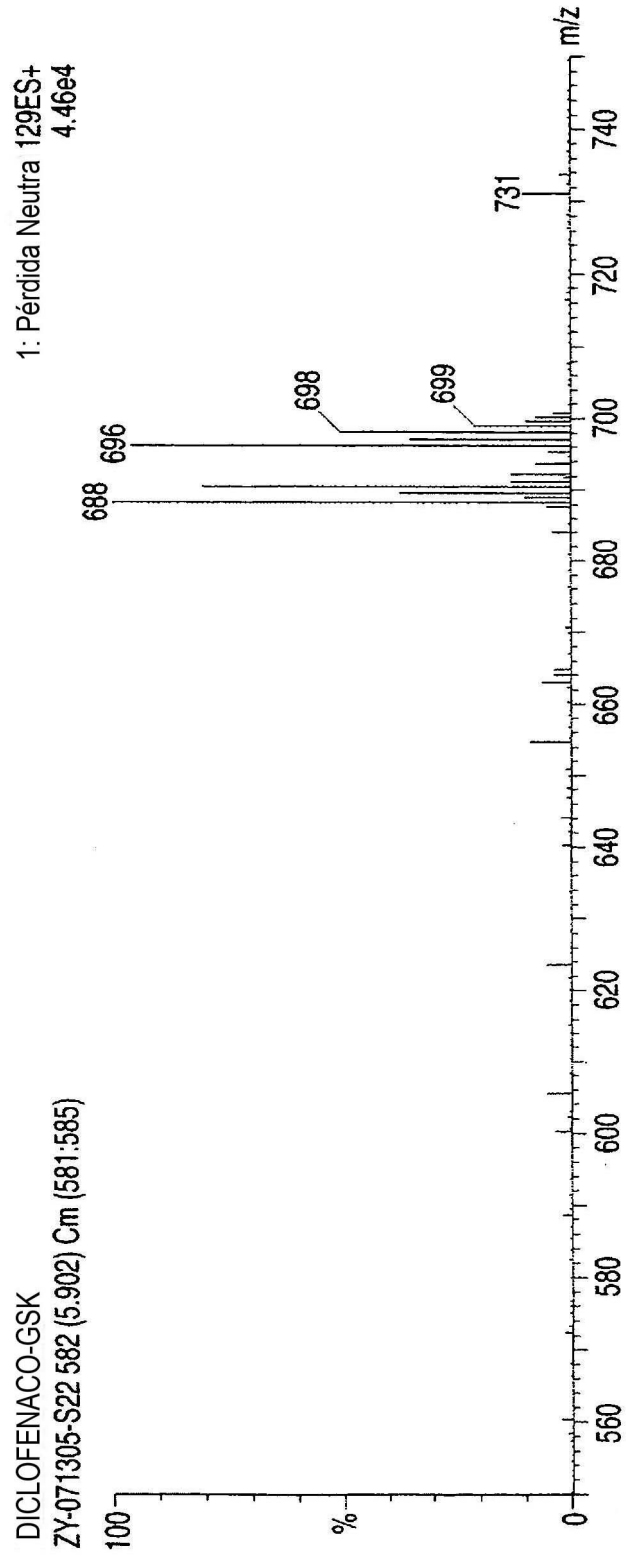
(c) detectar la ausencia de dobletes isotópicos en el espectro de masas con pérdida neutra de la Etapa (b).

- 15 20. El procedimiento de la reivindicación 3, la mezcla de la reivindicación 10 o el procedimiento de la reivindicación 19, en el que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) es 1:1.
21. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la enzima de metabolización de fármaco son enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el co-factor NADPH o enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el sistema de regeneración de NADPH.
- 20 22. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la proporción molar del compuesto de fórmula (I) al compuesto marcado isotópicamente de fórmula (I\*) es 1:1 y en el que la enzima de metabolización de fármaco son enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el co-factor NADPH o enzimas de tipo citocromo P450 en combinación con el sistema de regeneración de NADPH.
- 25 23. El procedimiento de la reivindicación 3, el procedimiento de la reivindicación 9 o el procedimiento de la reivindicación 21, en el que el espectro de masas con pérdida neutra se mide usando IEN-EM/EM o EM/EM.

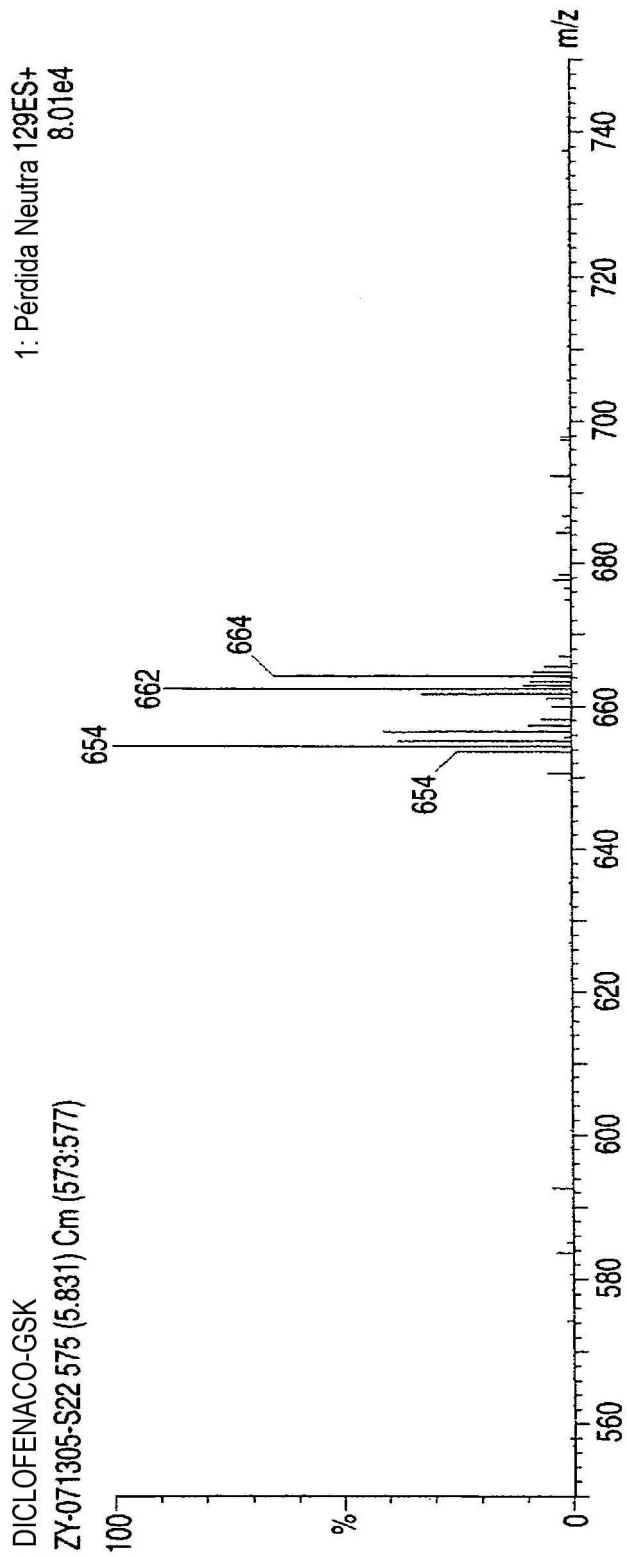
**FIG. 1A**



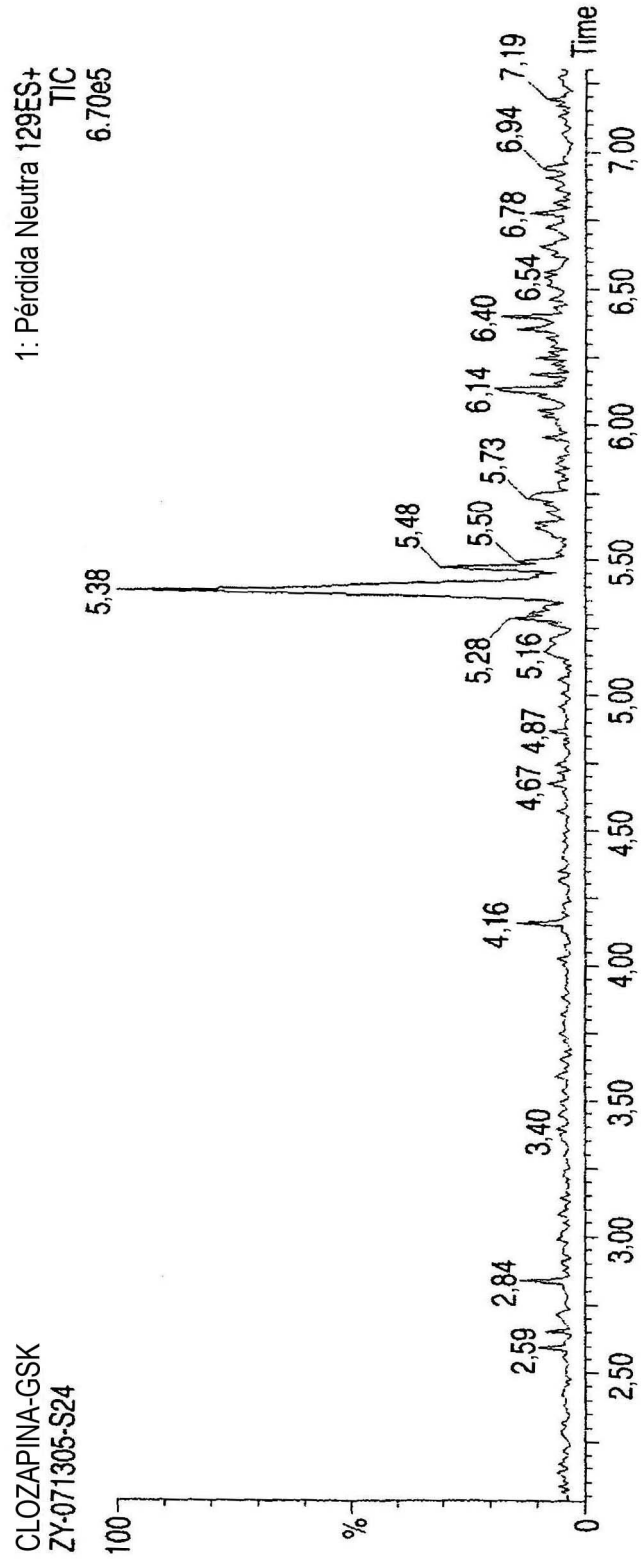
**FIG. 1B**



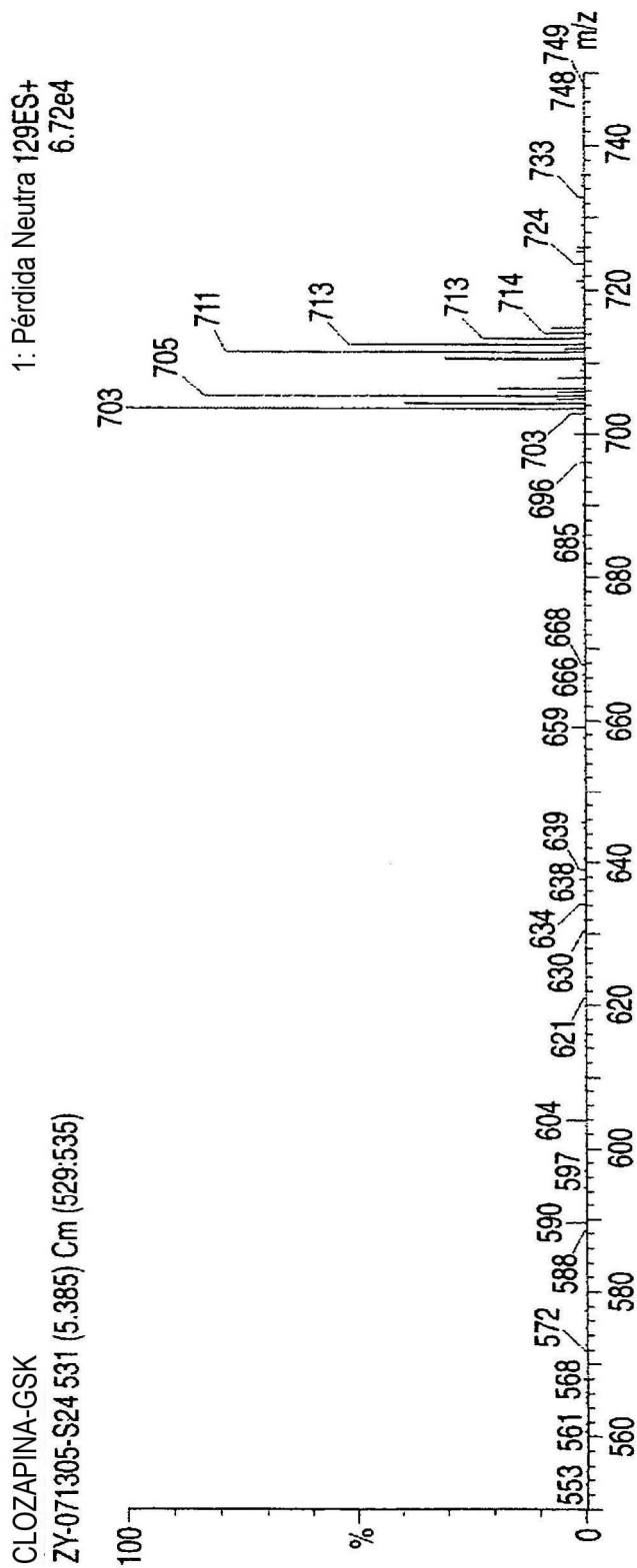
**FIG. 1C**



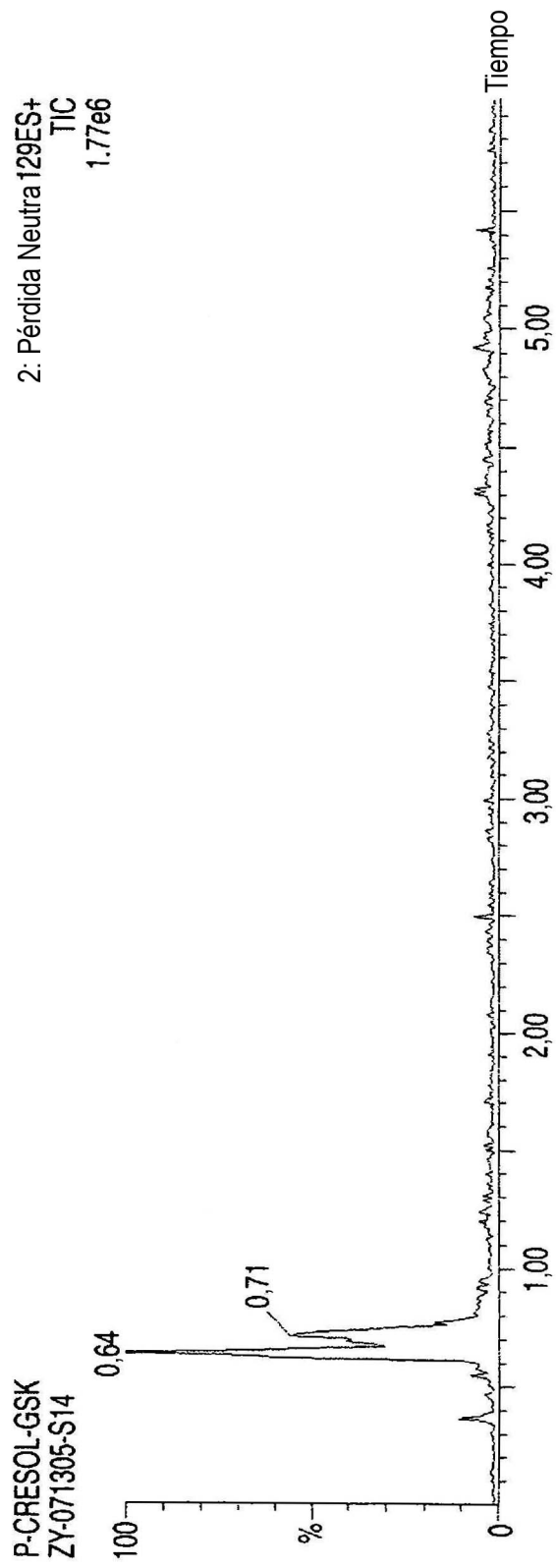
**FIG. 2A**



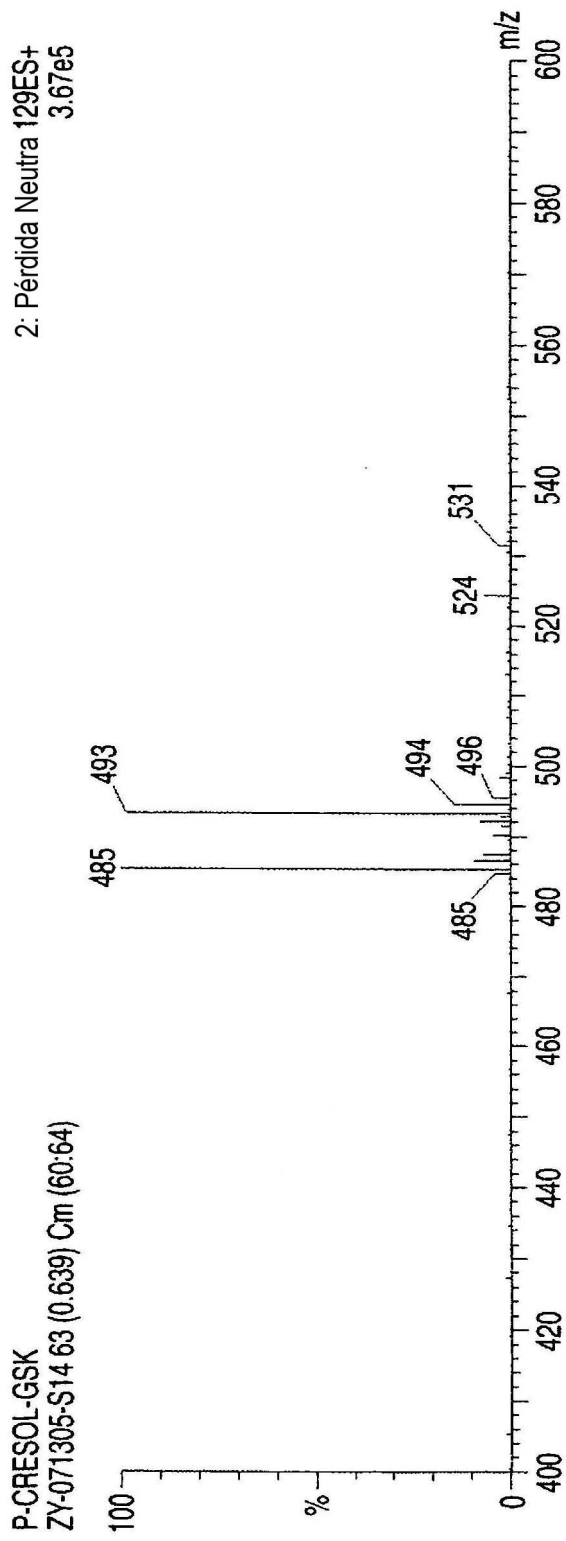
**FIG. 2B**



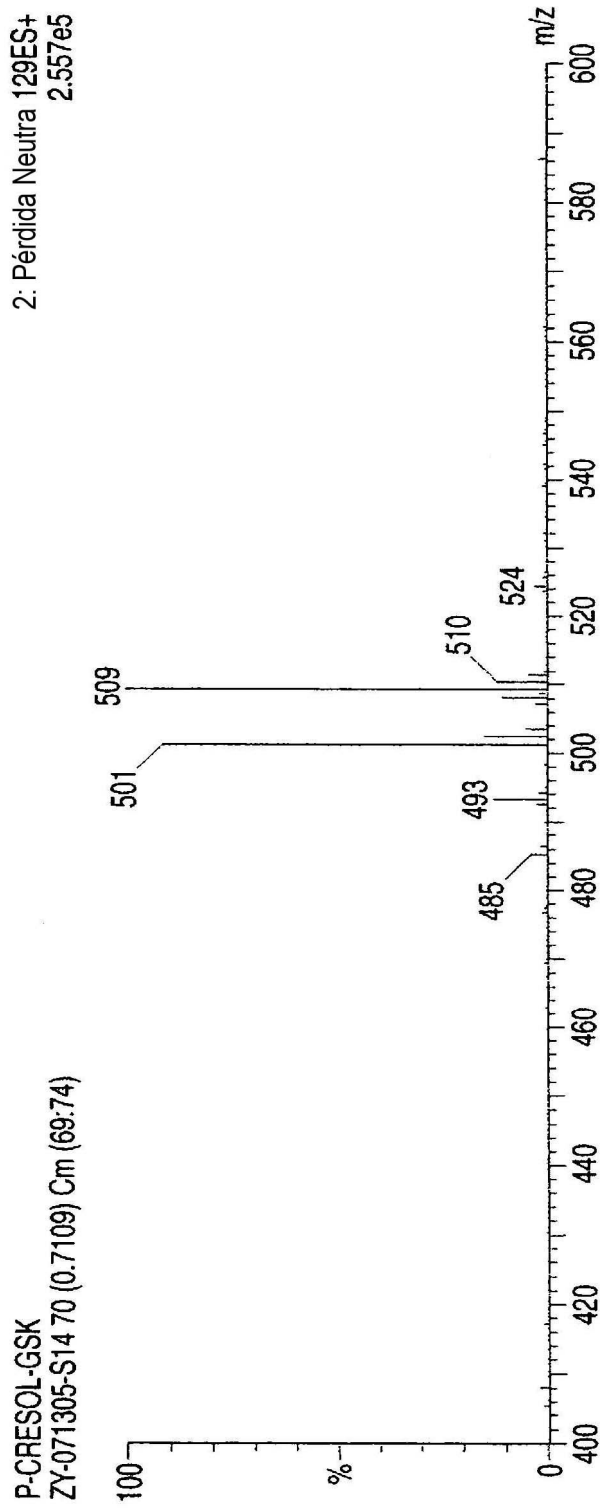
**FIG. 3A**



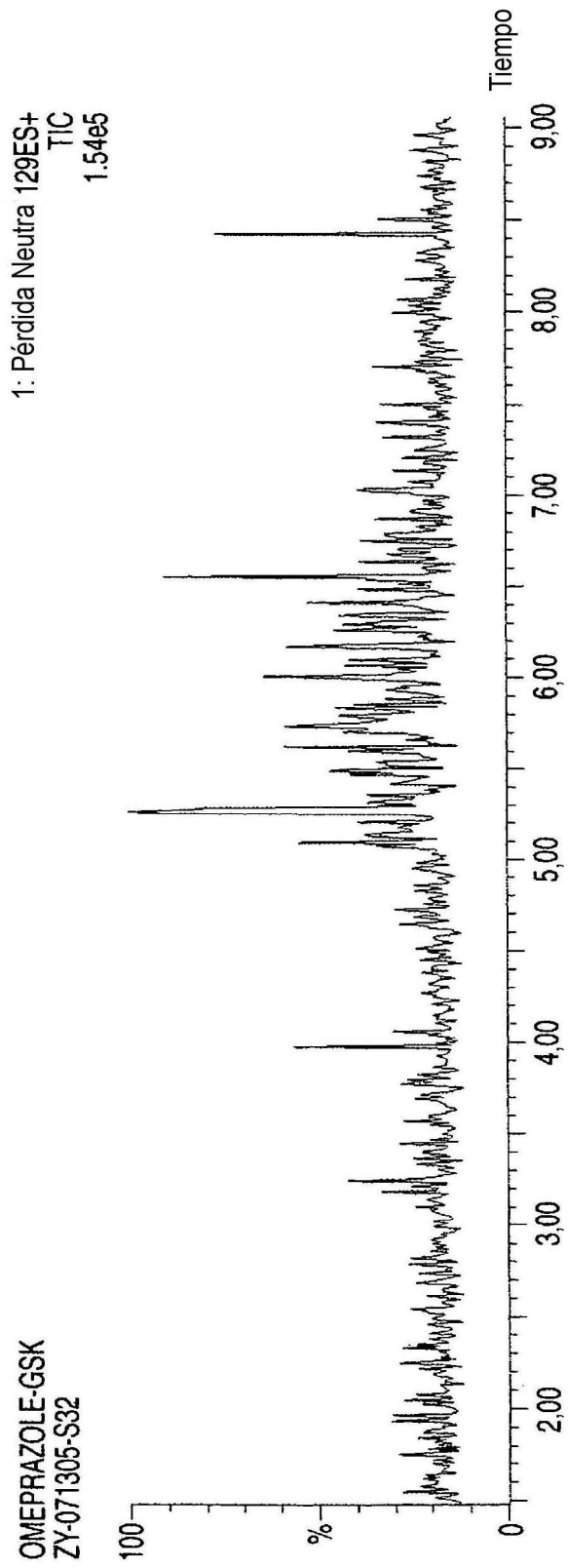
**FIG. 3B**



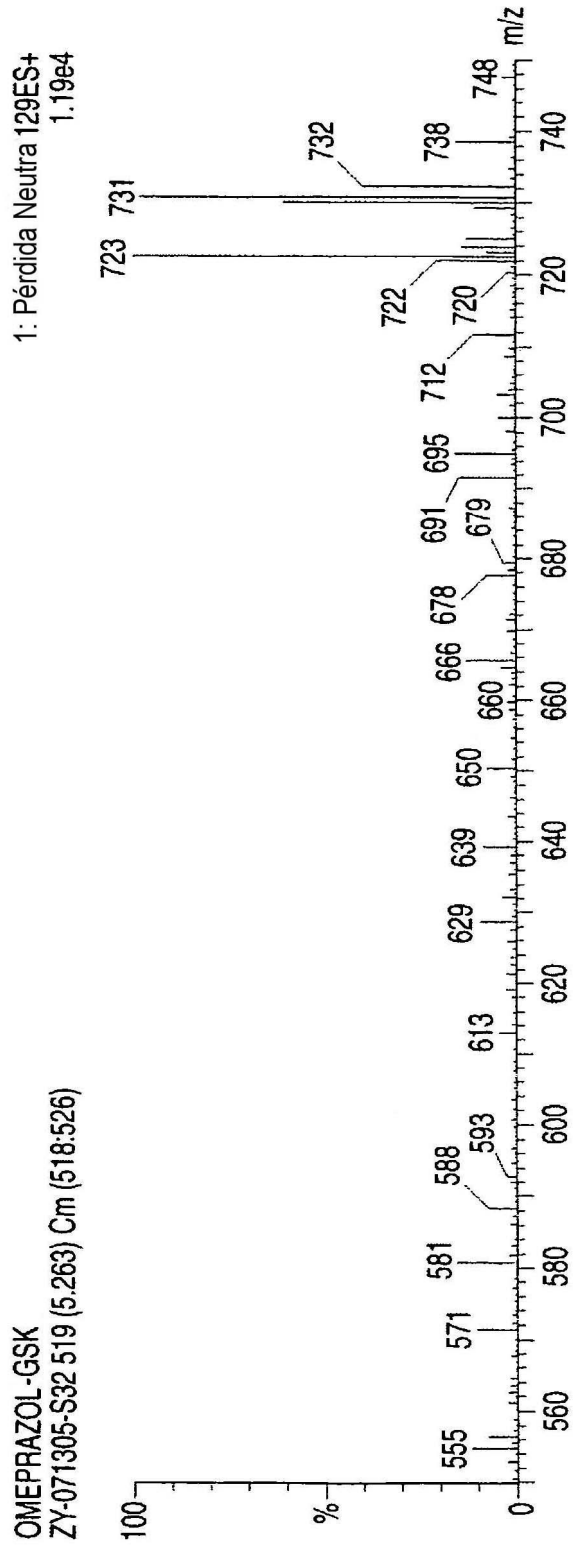
**FIG. 3C**



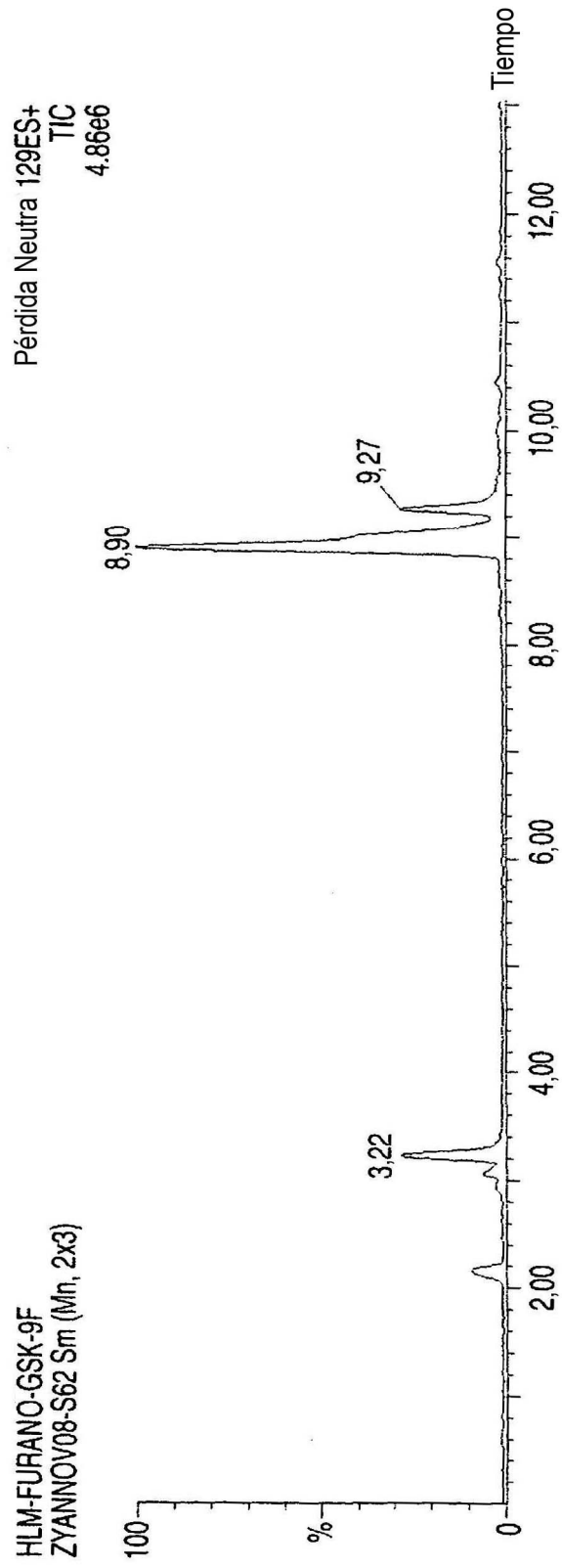
**FIG. 4A**



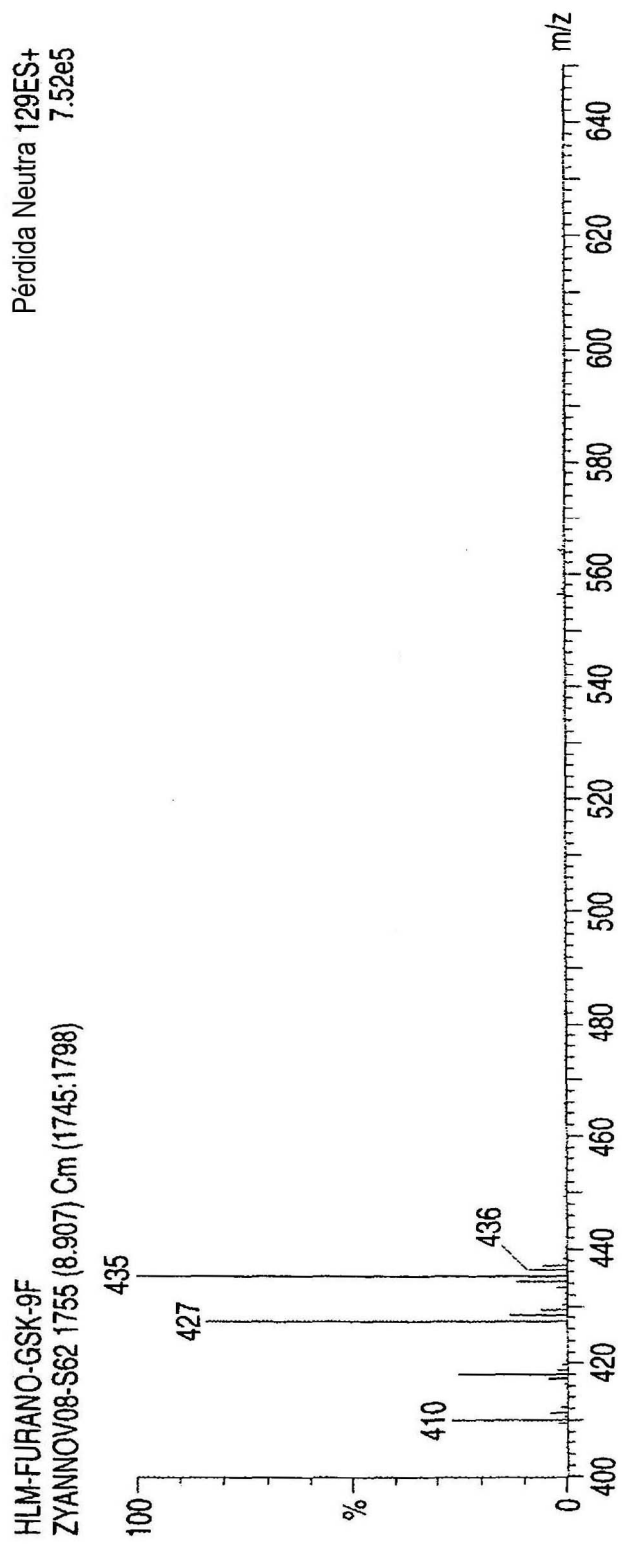
**FIG. 4B**



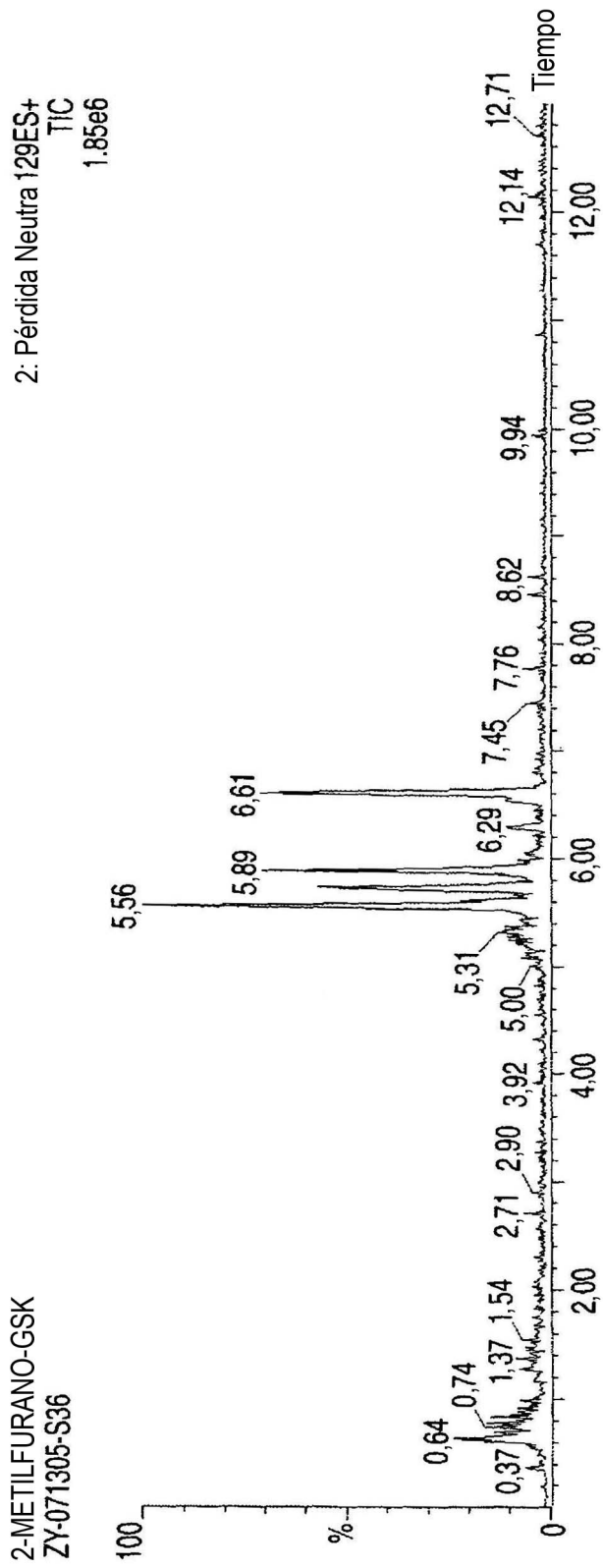
**FIG. 5A**



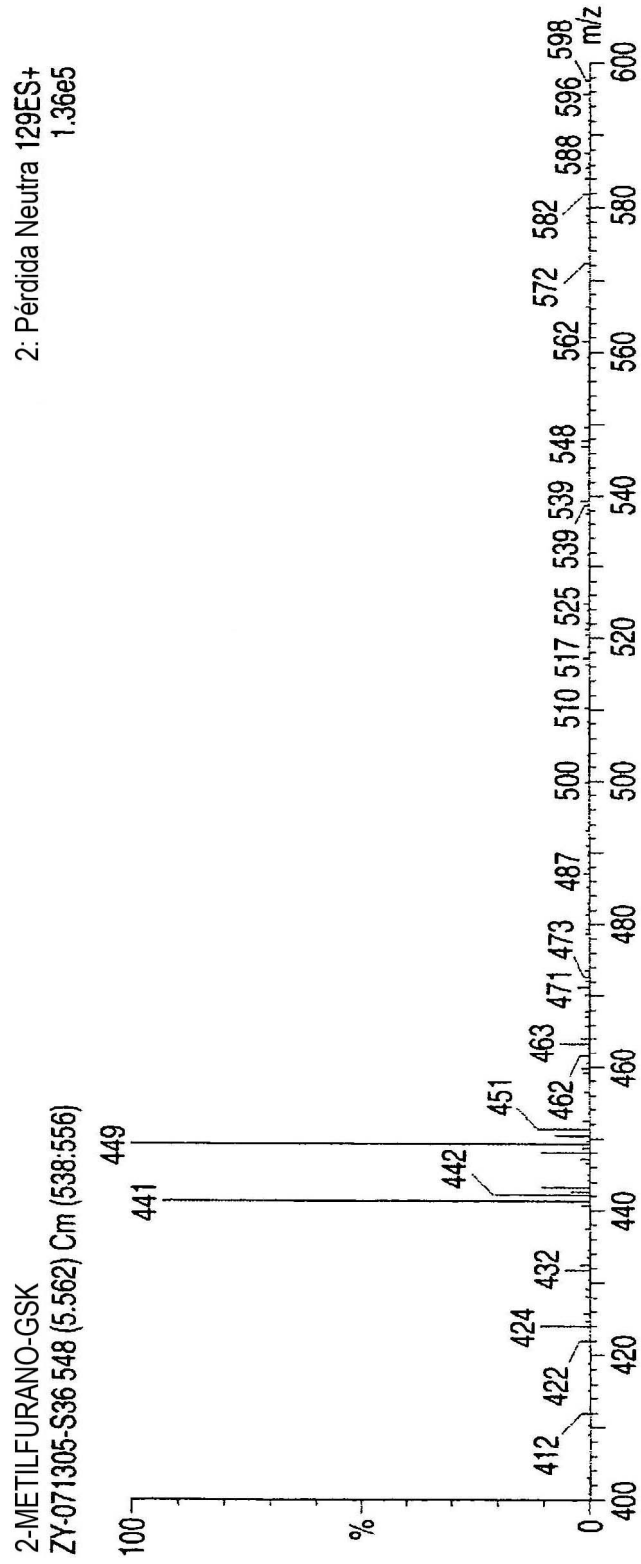
**FIG. 5B**



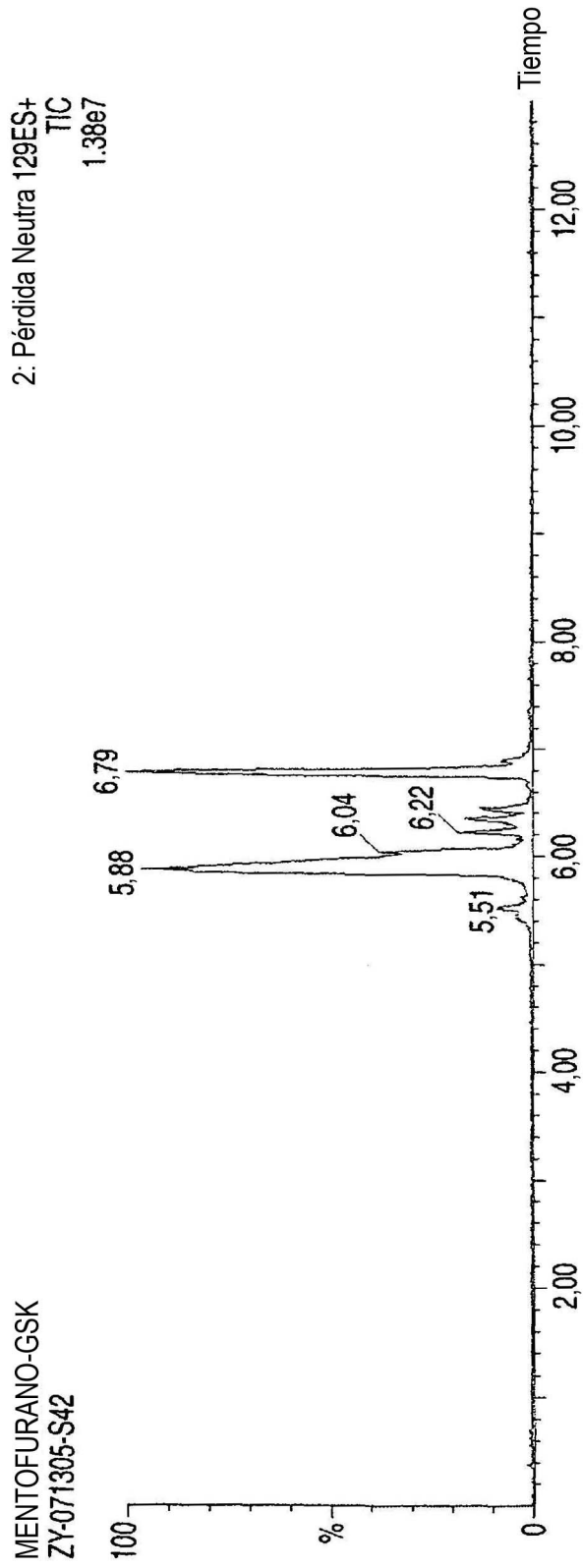
**FIG. 6A**



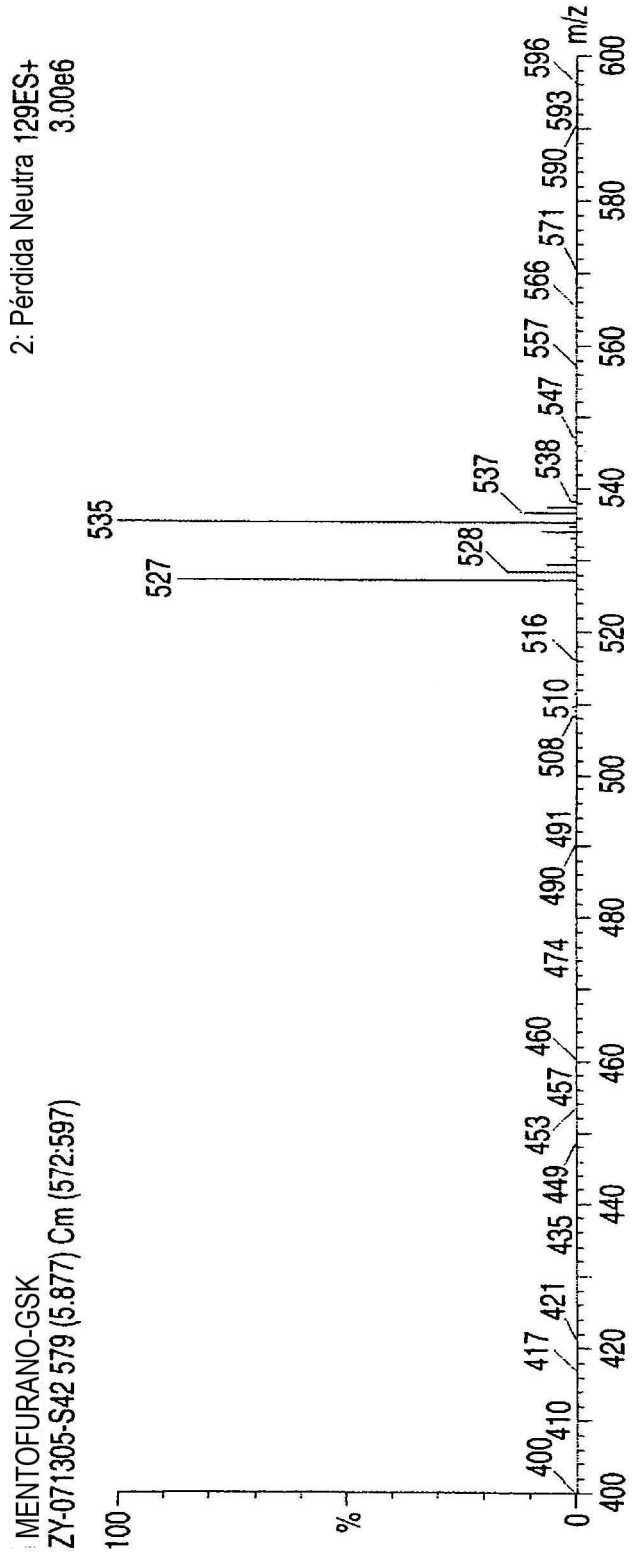
**FIG. 6B**



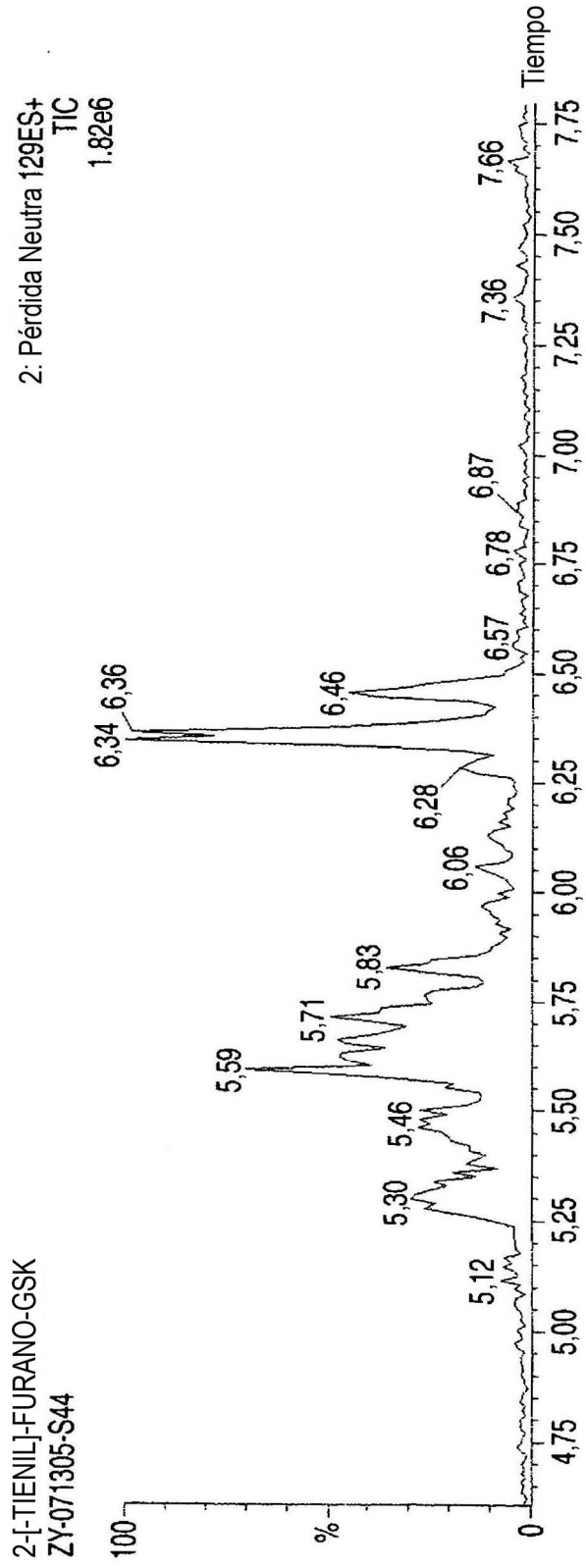
**FIG. 7A**



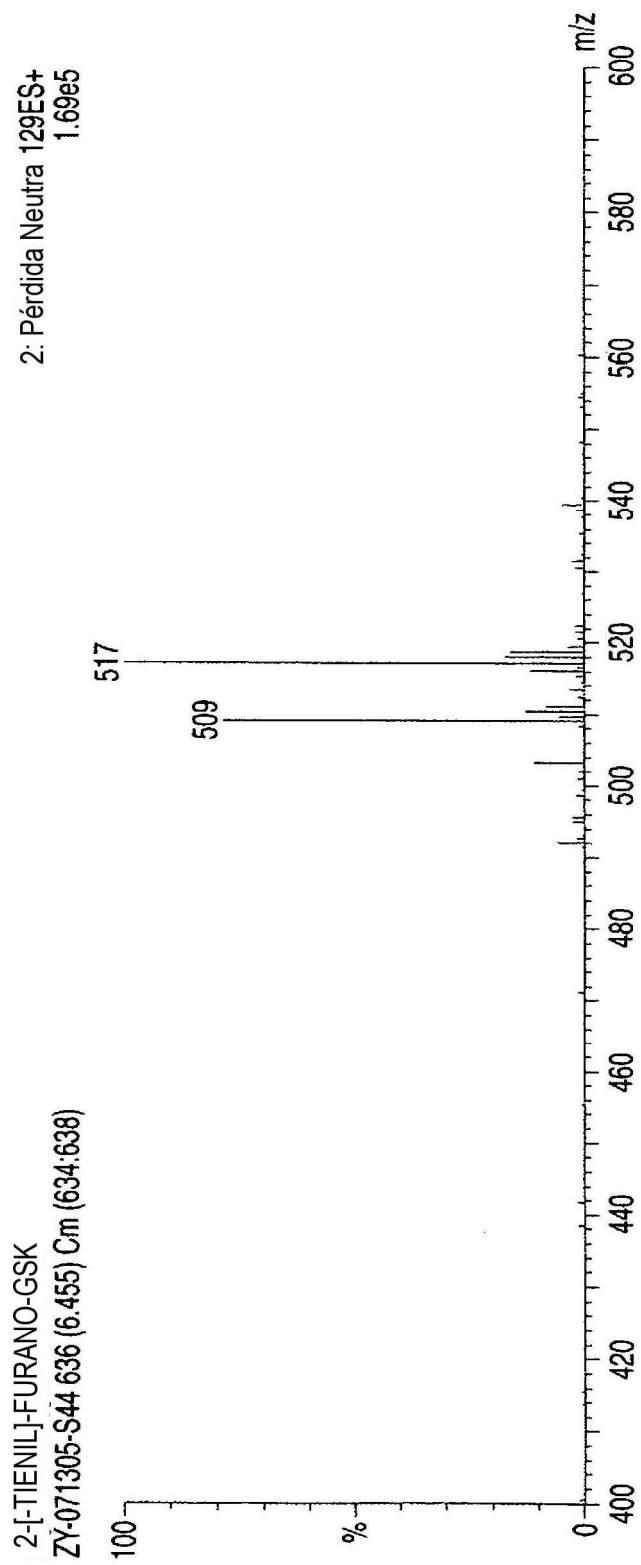
**FIG. 7B**



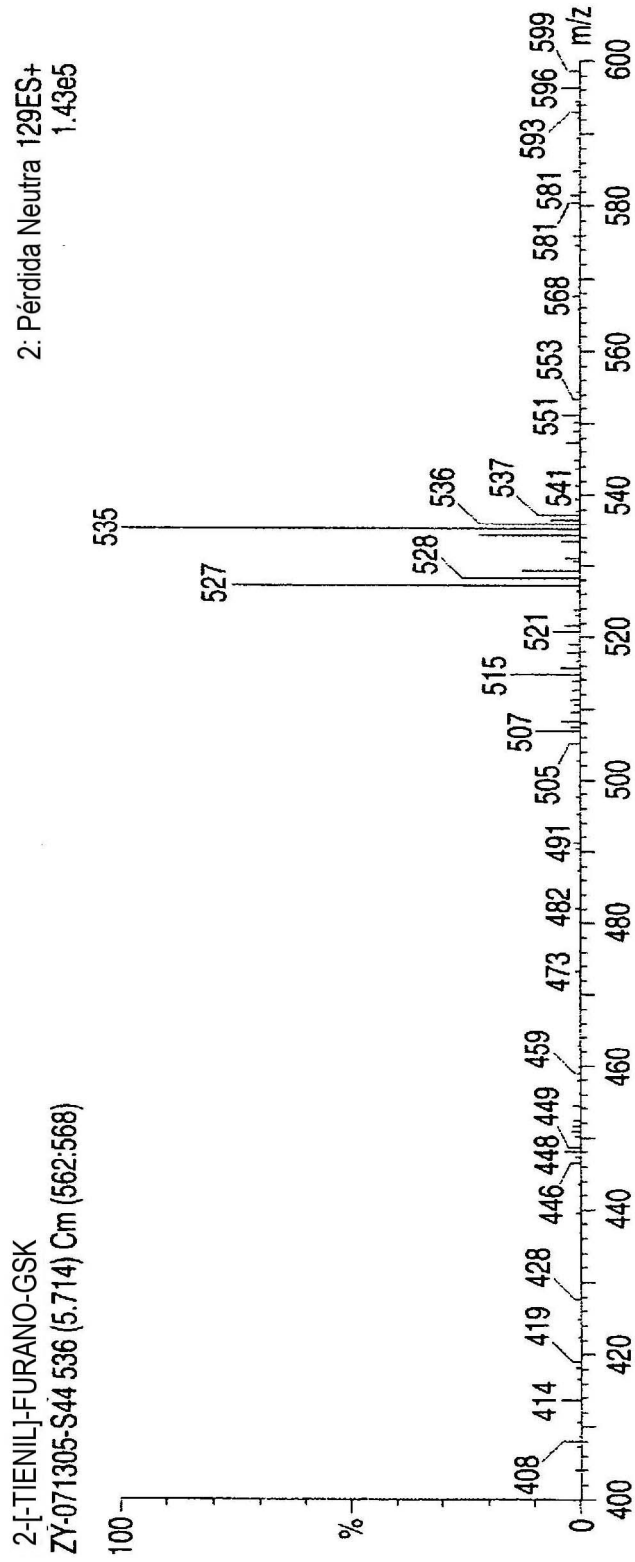
**FIG. 8A**



**FIG. 8B**



**FIG. 8C**



**FIG. 8D**

