



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 390**

51 Int. Cl.:
A61K 51/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04714794 .7**

86 Fecha de presentación : **26.02.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1608412**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Sustratos radiomarcados.**

30 Prioridad: **28.02.2003 GB 0304681**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Gee, Antony David**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 297 390 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

Sustratos radiomarcados.

5 La presente invención se refiere a sustratos de la glicoproteína P (P-gp), que son útiles para el marcaje y la formación de imágenes para el diagnóstico de la funcionalidad P-gp.

10 Se pueden usar técnicas nucleares no invasivas de formación de imágenes, para obtener información básica y de diagnóstico sobre la fisiología y bioquímica de sujetos vivos, incluyendo animales experimentales, seres humanos normales y pacientes. Estas técnicas se basan en el uso de instrumentos de formación de imágenes que pueden detectar la radiación emitida de trazadores radiactivos administrados a sujetos vivos. La información obtenida se puede reconstruir para proporcionar imágenes planas y tomográficas que ponen de manifiesto la distribución y/o concentración del trazador radiactivo en función del tiempo.

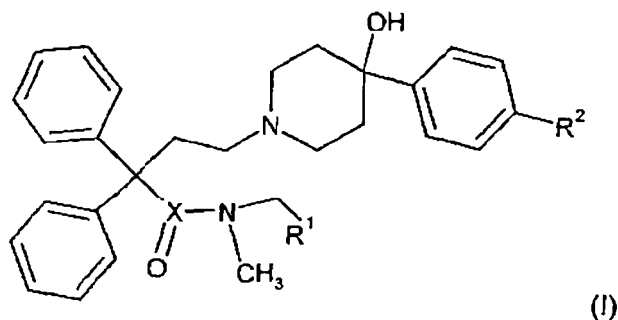
15 La tomografía de emisión de positrones (PET) es una técnica de formación de imágenes no invasiva que ofrece la mayor resolución espacial y temporal de todas las modalidades de formación de imágenes en medicina nuclear y tiene la ventaja añadida de que puede permitir la cuantificación real de concentraciones del trazador en tejidos. La técnica implica el uso de trazadores radiactivos, marcados con radionucleidos emisores de positrones, que se diseñan para tener propiedades *in vivo* que permiten medir parámetros relacionados con la fisiología o bioquímica de una variedad de procesos en los tejidos vivos.

20 Los compuestos se pueden marcar con radionucleidos emisores de positrones o gamma. Los radionucleidos emisores de positrones usados más habitualmente son ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F , los cuales se producen en aceleradores y tienen semividas de 2, 10, 20 y 110 minutos respectivamente. Los radionucleidos emisores gamma más ampliamente usados son ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Tl y ^{123}I .

25 La glicoproteína P (P-gp) es una bomba de eflujo de transmembrana dirigida por ATP localizada, entre otros tejidos, en la barrera hematoencefálica (Bradbury, 1993), los riñones y los testículos (Sugawara, 1990). En seres humanos, esta proteína es codificada por el gen MDR1. A lo largo de la última década, se ha mostrado que un gran número de compuestos estructuralmente diferentes son transportados fuera de las células por la P-gp, conduciendo a una disponibilidad mucho menor de estos compuestos en los tejidos a los que van dirigidos, de lo que se esperaría por las propiedades físicas de los compuestos (Schinkel, Wagenaar *et al.*, 1996), los cuales sólo comparten las propiedades de ser moléculas anfipáticas, hidrófobas pequeñas (normalmente <2 kDa) que normalmente no están cargadas negativamente. Las clases de productos terapéuticos moléculas pequeñas que son sustratos de la P-gp incluyen anticancerígenos, inmunosupresores, agentes cardíacos, antihistamínicos y una serie de agentes antiinfecciosos que incluyen agentes eficaces contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La actividad de la P-gp disminuye la disponibilidad intracelular de una variedad de fármacos anticancerígenos, conduciendo al desarrollo de resistencia a estos; parece que lo mismo es cierto para los inhibidores de proteasa del VIH y los inhibidores no nucleósidos de transcriptasa inversa (Fellay, J., Marolini, C., *et. al* 2002).

30 Se han desarrollado una serie de trazadores de PET y SPECT (tomografía por emisión de fotón único) para demostrar la presencia de P-gp en tejidos, pero ninguno de estos trazadores se aplican al desarrollo de fármacos o se usan actualmente como herramienta de diagnóstico clínico rutinaria (Del Vecchio, Ciarmiello *et al.*, 2000; Hendrikse and Vaalburg, 2002; Levchenko, Mehta *et al.*, 2000). Aunque estas herramientas de formación de imágenes tienen su utilidad, su sensibilidad y por lo tanto su alcance para propósitos de investigación son limitados. Se observa como mucho un aumento de 2-3 veces de la absorción en el tejido que expresa P-gp (cerebro/tumor) con la supuesta dosis de inhibición de 100%. Esto significa que si son suficientes cambios pequeños (p.ej. <20%) en la funcionalidad P-gp para el cotratamiento, por ejemplo en la terapia de tumores, las herramientas de formación de imágenes actuales pueden no ser suficientemente sensibles para establecer el cambio en la funcionalidad P-gp con suficiente seguridad, y por lo tanto pueden no ser adecuadas para establecer la dosis requerida de inhibidor de P-gp o de sustrato competitivo. El sistema de transporte de la P-gp es complejo y se entiende poco en el hombre *in vivo*, y serían especialmente beneficiosos los trazadores radiactivos muy sensibles que se pudieran usar *in vivo* para elucidar la función de la P-gp en la resistencia a fármacos y toxinas, inmunidad, apoptosis o diferenciación celular.

35 Según la presente invención en esta memoria se proporciona un compuesto radiomarcado de fórmula (I):



ES 2 297 390 T3

para usar como un sustrato de la glicoproteína P (P-gp), en la que:

X es ^{11}C o C;

5 R^1 es R^3 cuando X es C, o R^1 es hidrógeno cuando X es ^{11}C ;

R^2 es alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , $\text{N}(\text{Me})_2$ o halógeno cuando X es ^{11}C o cuando R^1 es R^3 o R^2 es R^3 , o alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} o $\text{N}(\text{Me})_2$ marcado con R^3 cuando X es C o cuando R^1 es hidrógeno;

10 R^3 es ^{11}C , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I , ^{76}Br , ^{77}Br o ciclopentadienil- $^{99\text{m}}\text{Tc}$;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Preferiblemente R^2 es metilo, metoxi, $\text{N}(\text{Me})_2$, F, Br, I o Cl.

15 Más preferiblemente, X es C, R^1 es ^{11}C y R^2 es Cl.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica radiactiva que comprende un compuesto de fórmula (I) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Uno de los compuestos de fórmula (I) es la 4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N,N-dimetil-alfa,alfa-difenil-1-piperidina-butiramida, conocida más habitualmente como loperamida (ImodiumTM), un agonista del receptor de opiáceos usado en el tratamiento de la diarrea (Galambos, Hersh *et al.*, 1976), que también es un compuesto que interacciona con y es transportado por la P-gp (Sadeque, Wandel *et al.*, 2000; Schinkel, Wagenaar, Mol, and van Deemter, 1996; Wandel, Kim *et al.*, 2002).

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar la [^{11}C -N-metil]-4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N,N-dimetil-alfa,alfa-difenil-1-piperidina-butiramida que comprende hacer reaccionar la 4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il]-N-metil-2,2-difenilbutiramida, el precursor desmetilado de loperamida con [^{11}C]MeI en presencia de una base, tal como hidróxido de potasio y un disolvente inerte, tal como dimetilsulfóxido, a una temperatura entre temperatura ambiente y la temperatura de reflujo del disolvente, preferiblemente aproximadamente a 80°C; y aislar el producto por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y separación de cualesquiera disolventes orgánicos restantes por cualquier medio convencional.

35 Los radionucleidos adecuados que se pueden incorporar en los compuestos de fórmula (I) incluyen: ^{11}C , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{76}Br y ^{77}Br . La elección del radionucleido que se va a incorporar en los compuestos de fórmula (I) dependerá de la aplicación analítica o farmacéutica específica. Por lo tanto, para el marcaje *in vitro* de P-gp y para los ensayos de competición, se preferirán los compuestos que incorporan ^{125}I o ^{77}Br . Para los agentes de formación de imágenes para diagnóstico e investigación, se prefieren los compuestos que incorporan un radionucleido seleccionado de ^{11}C , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I o ^{76}Br . En algunas aplicaciones puede ser útil la incorporación de un radionucleido quelante tal como $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

40 Se pueden usar análogos de la loperamida radiomarcados en estudios clínicos para evaluar la función de los inhibidores de P-gp en una variedad de áreas patológicas en las que se cree que la glicoproteína P tiene una función en el fracaso de la terapia, p. ej. en la expresión de P-gp en las superficies lumbales de las células epiteliales intestinales que conduce a disminuir la adsorción de los compuestos administrados por vía oral, en el flujo de inhibidores de la proteasa del VIH que da como resultado la menor biodisponibilidad y suministro en los tejidos, o en la terapia antitumoral en la que la presencia de glicoproteína P puede conducir a la desensibilización de tumores, por ejemplo, frente a antineoplásicos.

50 El Esquema 1 representa la ruta sintética de la loperamida desmetilada de tipo cGMP.

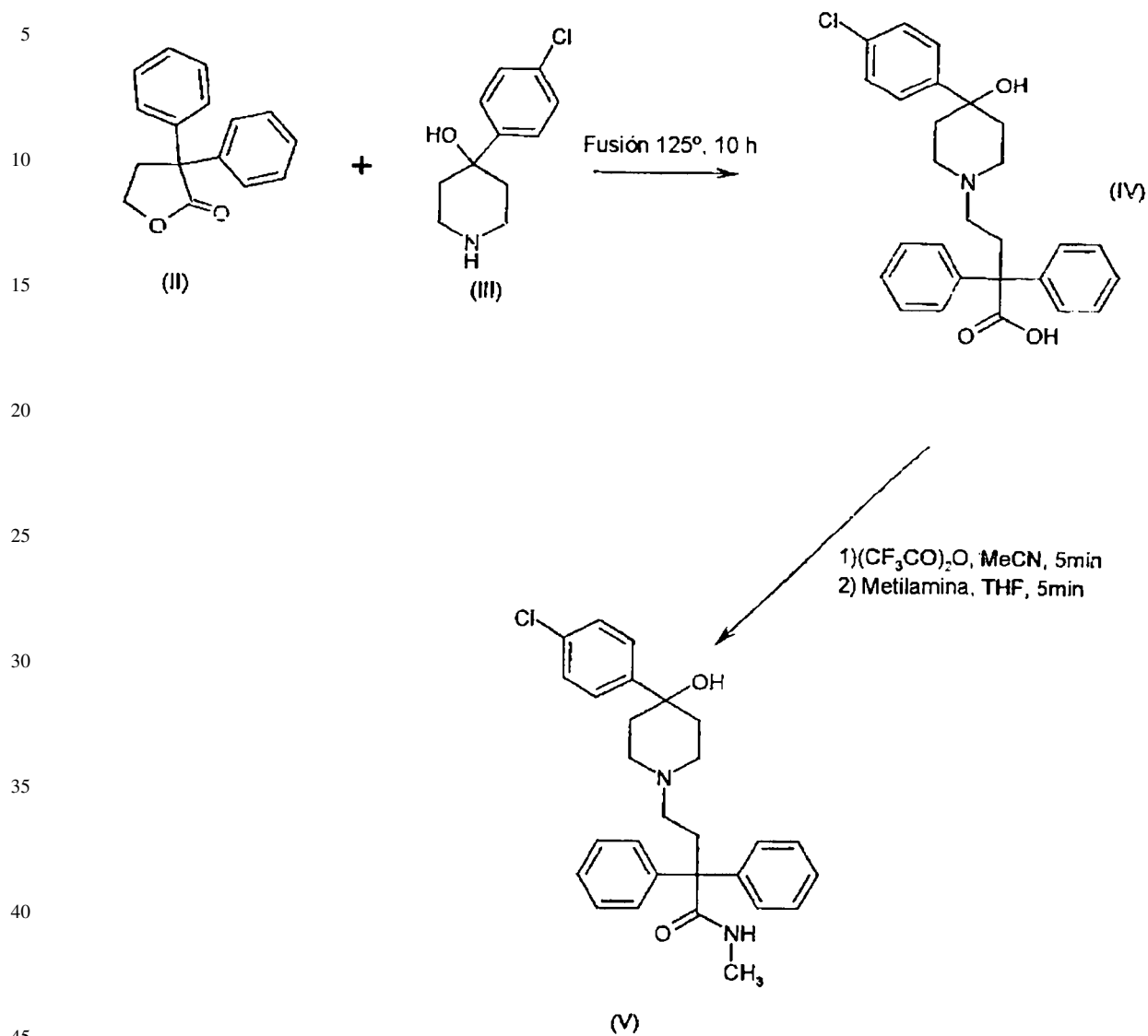
55

60

65

ES 2 297 390 T3

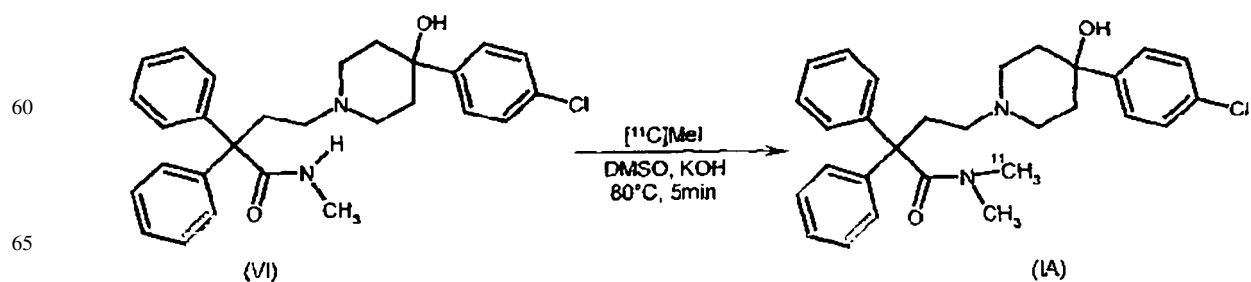
Esquema 1



50 En este esquema el ácido 3,3-difenildihidrofuran-2-ona (II) se fusiona con el 4-(4-clorofenil)piperidin-4-ol (III) dando el ácido 4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il]butírico (IV) que se convierte en su N-metilamida por la formación *in situ* del anhídrido mixto por reacción con anhídrido trifluoroacético, seguido de tratamiento con metilamina para dar la loperamida desmetilada (V).

55 En el Esquema 2 se muestra la ruta sintética de un compuesto de fórmula (I) marcado con [¹¹C].

Esquema 2

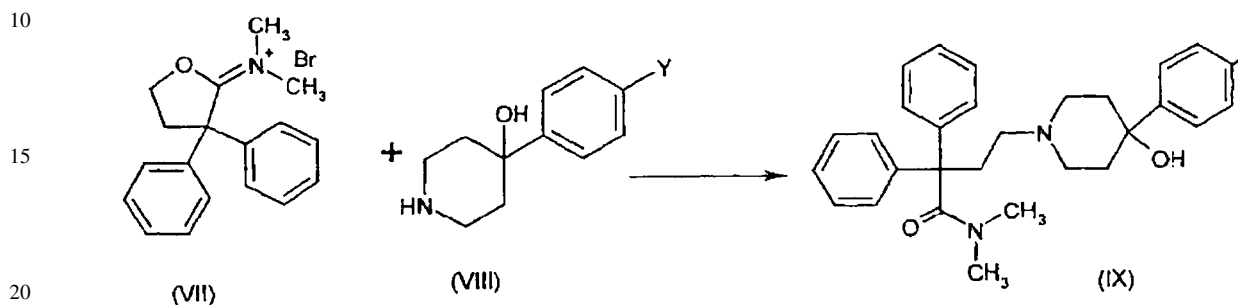


ES 2 297 390 T3

Normalmente, el precursor desmetilado de loperamida se hace reaccionar con $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ a 80°C durante 5 min usando DMSO como disolvente y KOH como base. El producto se obtiene por HPLC de fase inversa, y después de separar los disolventes orgánicos por evaporación a vacío, se formula en una solución salina estéril al 0,9%.

5 En el Esquema 3 se describe una ruta posible para los análogos radiofluorados y radioyodados de los compuestos de fórmula (I).

Esquema 3



25 Para producir los productos radiofluorados, Y es un resto sal de yodonio o un resto triazeno a partir del cual se puede hacer el producto final por reacción nucleófila directa con ^{18}F -fluoruro. Normalmente, esto se hará en un disolvente orgánico (DMF, DMSO, ACN) usando kryptofix[®] 222 como agente de transferencia de fase. Para producir los productos radioyodados, Y es un resto trialkilestanilo, un resto ácido borónico o un resto halógeno a partir del cual se puede producir el análogo radioyodado por una variedad de reacciones nucleófilas o electrófilas.

30 Alternativamente, los compuestos de fórmula (I) se pueden marcar en la posición del carbonilo (X) usando una reacción de acoplamiento mediada por Pd (0) entre el sustrato halogenado adecuado, $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ y la amina secundaria adecuada.

Los materiales de partida y otros reactivos están disponibles en el comercio o se pueden sintetizar mediante métodos conocidos y convencionales.

35 Datos biológicos

Los animales (cerdos, Yorkshire-landrace, 37,5 kg, n=2) se escanearon con anestesia terminal (anestesia con isoflurano inducida por ketamina) en diferentes días. Se insertó en ambos animales una cánula arterial en una de las arterias femorales. Se administró $[^{11}\text{C}\text{-}N\text{-metil}]\text{-4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N,N-dimetil-alfa,alfa-difenil-1-piperidina-butiramida}$ ($[^{11}\text{C}]\text{loperamida}$) por vía intravenosa en la vena femoral, contralateral a la cánula arterial, en forma de un bolo de 1 min. El escaneado de PET y la toma de muestra de sangre arterial se inició trans empezar la administración. Se usó ciclosporina A (SandimmuneTM) como sustrato competitivo de la glicoproteína P (Twentyman, 1992). En las condiciones de valor base, se observó poca penetración en el SNC de la $[^{11}\text{C}]\text{loperamida}$ con el % de dosis inyectada/litro permaneciendo por debajo de 1%. La administración intravenosa de diferentes dosis de ciclosporina A, 30 min antes de la inyección de (I), condujo a un aumento de la señal radiactiva dependiente de la dosis en el cerebro, cuando se midió con escaneado de PET. Se administraron $[^{15}\text{O}]\text{CO}$ y $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ por vía intravenosa en el cerdo en las condiciones del valor base y después de cada dosis intravenosa de ciclosporina A para corregir los cambios en el volumen sanguíneo y los cambios en el flujo sanguíneo. El aumento máximo de penetración de (I) en el SNC para el cerebro en conjunto fue de 7 veces y se observó con una dosis de ciclosporina A de 40-50 mg/kg (CsA). La comparación de la velocidad de suministro K_1 de (I) con la K_1 de $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ indicaba que con esta dosis se inhibía casi toda la P-glicoproteína. Con dosis de CsA > 10 mg/kg, la velocidad del metabolismo de $[^{11}\text{C}]\text{loperamida}$ disminuyó de aproximadamente 50% de progenitor a aproximadamente 80% de progenitor a los 60 min después de administración. El flujo sanguíneo cerebral aumentó ligeramente con dosis más altas de CsA. Estos cambios solo contribuyen en una pequeña medida a los cambios grandes que se observaron en la señal.

Referencias

1. Bradbury, M. W., 1993. The blood-brain barrier. *Exp. Physiol* 78, 453-472.
- 60 2. Del Vecchio, S., Ciarmiello, A., Salvatore, M., 2000. Scintigraphic detection of multidrug resistance in cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 15, 327-337.
3. Fellay, J., Marzolini, C., Meaden, E. R., Back, D. J., Buclin, T., Chave, J. P., Decosterd, L. A., Furrer, H., Opravil, M., Pantaleo, G., Retelska, D., Ruiz, L., Schinkel, A. H., Vernazza, P., Eap, C. B., Telenti, A., 2002. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 359, 30-36.

ES 2 297 390 T3

4. **Galambos, J. T., Hersh, T., Schroder, S., Wenger, J., 1976.** Loperamide: a new antidiarrheal agent in the treatment of chronic diarrhea. *Gastroenterology* 70, 1026-1029.

5 5. **Hendrikse, N., Vaalburg, W., 2002.** Dynamics of multidrug resistance: P-glycoprotein analyses with positron emission tomography. *Methods* 27, 228.

10 6. **Levchenko, A., Mehta, B. M., Lee, J. B., Humm, J. L., Augensen, F., Squire, O., Kothari, P. J., Finn, R. D., Leonard, E. F., Larson, S. M., 2000.** Evaluation of ¹¹C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance. *J. Nucl Med.* 41, 493-501.

15 7. **Sadeque, A. J., Wandel, C., He, H., Shah, S., Wood, A. J., 2000.** Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 231-237.

20 8. **Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L., 1996.** P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest* 97, 2517-2524.

25 9. **Sugawara, I., 1990.** Expression and functions of P-glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissues. *Acta Pathol. Jpn.* 40, 545-553.

30 10. **Twentyman, P. R., 1992.** Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem. Pharmacol.* 43, 109-117.

35 11. **Wandel, C., Kim, R., Wood, M., Wood, A., 2002.** Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. *Anesthesiology* 96, 913-920.

40

45

50

55

60

65

70

75

80

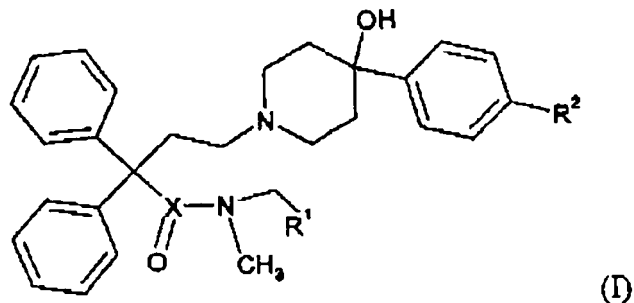
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto radiomarcado para usar como un sustrato de la glicoproteína P (P-gp), según la fórmula (I):

5

10

15



20 en la que:

X es ^{11}C o C;

25

R^1 es R^3 cuando X es C, o R^1 es hidrógeno cuando X es ^{11}C ;

R^2 es alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , $\text{N}(\text{Me})_2$ o halógeno cuando X es ^{11}C o cuando R^1 es R^3 , o R^2 es R^3 o alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} o $\text{N}(\text{Me})_2$ marcado con R^3 cuando X es C o cuando R^1 es hidrógeno;

30

R^3 es ^{11}C , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I , ^{76}Br , ^{77}Br o ciclopentadienil- $^{99\text{m}}\text{Tc}$;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 es metilo, metoxi, $\text{N}(\text{Me})_2$, F, Br, I o Cl.

35

3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R^1 es ^{11}C .

4. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente, en el que X es C, R^1 es ^{11}C y R^2 es Cl.

40

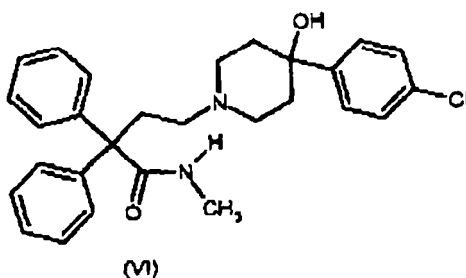
5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquier reivindicación precedente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Un procedimiento para preparar la [^{11}C -N-metil]-4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N,N-dimetil-alfa,alfa-difenil-1-piperidinabutiramida que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (VI)

45

50

55



con [^{11}C]MeI y aislar el producto.

60

65