

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 322**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2012 PCT/EP2012/067102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14032737**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2012 E 12766009 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2890981**

54 Título: **Trazadores de la senescencia**

30 Prioridad:

28.08.2012 WO PCT/EP2012/066714

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

24.04.2019

73 Titular/es:

**EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN
MEDIZINISCHE FAKULTÄT (100.0%)
Geschwister-Scholl-Platz
72074 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**COTTON, JONATHAN;
PICHLER, BERND;
FUCHS, KERSTIN;
TESKE, ANNA;
KRUEGER, MARCEL;
KESENHEIMER, CHRISTIAN;
SCHULZE-OSTHOFF, KLAUS y
HILDEBRAND, DOMINIC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 710 322 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

Trazadores de la senescencia

La presente invención se refiere a compuestos nuevos útiles para visualizar la senescencia de células y su uso. En particular, esta invención se refiere a nuevos derivados de fucosa útiles como trazadores de la senescencia.

5 La senescencia de células se define de forma amplia como el programa biológico general mediante el cual cesa la proliferación celular y las células entran en un estado de detención del ciclo celular. Por tanto, a la senescencia le acompañan cambios diferenciados en el metabolismo celular.

10 En fechas recientes, se ha reconocido que la senescencia desempeña un papel importante en el tratamiento del cáncer y la resistencia a la terapia, así como ofrece la oportunidad de obtener nuevos conocimientos acerca de la estadificación y la prognosis del cáncer. La senescencia asociada a un tratamiento puede medir el éxito quimioterapéutico, y la detección de células senescentes también puede ofrecer oportunidades de diagnóstico para detectar lesiones preneoplásicas.

15 Uno de los marcadores que se emplean más para las células senescentes es la (SA)-β-galactosidasa (β-gal) asociada a la senescencia. Se han desarrollado varios sustratos de β-gal y en la actualidad se emplean *ex vivo* e *in vitro* para demostrar la expresión de β-gal. Chen y Chang (1987), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 142, n.º 3, pp. 767-774, describe un aumento en la fucosilación en fibroblastos senescentes y se basan en el uso del isótopo radiactivo 3H *in vitro*.

20 Sin embargo, aún son necesarios compuestos mejorados que puedan actuar como trazadores de la senescencia de células, en particular sería útil que dichos trazadores puedan usarse como compuestos de diagnóstico *in vivo* empleando métodos no invasivos para la visualización de dichos trazadores.

En fechas recientes se ha descubierto que la expresión de α-fucosidasa (α-fuc) es un indicador más específico de la senescencia de las células. Además, se sabe que ciertas glicosidasas, tales como β-gal y α-fuc, se expresan en los lisosomas y que estos lisosomas a menudo son mucho más grandes en células senescentes.

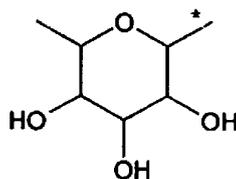
25 Los presentes inventores ahora han descubierto que ciertos derivados de fucosa que portan marcadores fluorescentes o radiomarcadores se acumulan en células senescentes y pueden usarse para marcar y detectar, de modo fiable, células senescentes *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula



en la que:

30 A. representa

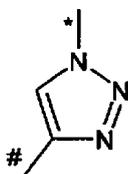


en la que:

X representa un sustituyente de halógeno, y

* representa el sitio de unión al resto representado por L.

35 L representa *Y-(CH₂)_n# o



en la que:

Y se selecciona del grupo que consiste en O, N, S, SO y SO₂,

n es un número entero de 2 a 6,

* representa el sitio de unión al resto representado por A, and

5 # representa el sitio de unión al resto representado por M, and

M representa ¹⁸F,

y sus sales, sus solvatos y los solvatos de sus sales.

10 Los compuestos de la invención son los compuestos de fórmulas (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) y sus sales, sus solvatos y los solvatos de sus sales, así como los compuestos que están incluidos en las fórmulas (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) y que se mencionan en la presente a continuación como ejemplos de realizaciones, y sus sales, sus solvatos y los solvatos de sus sales, en la medida en que los compuestos incluidos por las fórmulas (I), (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) y que se mencionan en la presente a continuación no sean ya sales, solvatos y solvatos de las sales.

15 Los compuestos de la invención, dependiendo de su estructura, existen en formas estereoisoméricas (enantiómeros, diastereómeros). Por tanto, la invención también incluye los enantiómeros o diastereómeros y sus respectivas mezclas. Los constituyentes estereoisoméricamente uniformes pueden aislarse de una manera conocida a partir de dichas mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros.

Pueden preferirse los compuestos de la invención en los que A representa un resto fucosidilo, si este resto fucosidilo está en la L-configuración natural.

20 Si los compuestos de la invención pueden aparecer en formas tautómeras, la presente invención incluye todas las formas tautómeras.

Las sales preferidas para los objetivos de la presente invención son las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención. Sin embargo, también se incluye las sales que, en sí mismas, no son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas, pero que pueden utilizarse, por ejemplo, para el aislamiento o la purificación de los compuestos de la invención.

25 Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen sales de bases inorgánicas, tales como sales de amonio, sales de metales alcalinos, en particular sales de sodio o potasio, sales de metales alcalino-térreos, en particular sales de magnesio o calcio; sales de bases orgánicas, en particular sales derivadas de ciclohexilamina, bencilamina, octilamina, etanolamina, dietanolamina, dietilamina, trietilamina, etilendiamina, procaína, morfina, pirrolina, piperidina, N-etilpiperidina, N-metilmorfina, piperazina como la base orgánica; o sales con aminoácidos básicos, en particular lisina, arginina, ornitina e histidina.

30

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) también incluyen sales de ácidos inorgánicos, tales como clorhidratos, bromhidratos, sulfato, fosfato o fosfonatos; sales de ácidos orgánicos, en particular acetatos, formiatos, propionatos, lactatos, citratos, fumaratos, maleatos, benzoatos, tartratos, malatos, metansulfonatos, etansulfonatos, toluensulfonatos o bencensulfonatos; o sales con aminoácidos ácidos, en particular aspartato o glutamato.

35

Los solvatos para los objetivos de la invención se refieren a las formas de los compuestos de la invención en las que el estado sólido o líquido forma un complejo mediante coordinación con moléculas de disolvente. Los hidratos son una forma específica de solvatos en los que la coordinación se produce con el agua.

40 En el contexto de esta invención, los sustituyentes tienen las siguientes definiciones, a menos que se especifique lo contrario.

El término alquilo en general se refiere a alquilo-(C₁-C₆) de cadena lineal o ramificada, preferiblemente alquilo-(C₁-C₄), tales como, en particular, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, isobutilo y terc-butilo.

El término alcoxi en general se refiere a alcoxi-(C₁-C₆) de cadena lineal o ramificada, preferiblemente alcoxi-(C₁-C₄), tales como, en particular, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, isopropoxi, isobutoxi y terc-butoxi.

45 Los términos mono- y dialquilamino representan, respectivamente, un radical alquilamino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo (elegidos independientemente entre sí) y como ejemplo y preferiblemente son metilamino, etilamino, n-propilamino, isopropilamino, terc-butilamino, n-pentilamino, n-hexilamino, N,N-dimetilamino, N,N-dietilamino, N-etil-N-metilamino, N-metil-N-n-propilamino, N-isopropil-N-n-propilamino, N-terc-butil-N-metilamino, N-etil-N-n-pentilamino y N-n-hexil-N-metilamino. Monoalquil-(C₁-C₃)amino representa, por ejemplo, un radical monoalquilamino que tiene de 1 a 3 átomos de carbono. Dialquil-(C₁-C₃)amino representa, por ejemplo, un radical dialquilamino que tiene de 1 a 3 átomos de carbono por cada sustituyente alquilo.

50

El término halógeno o halo se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo; preferiblemente a flúor, cloro o bromo. En algunas realizaciones, el término halógeno o halo preferiblemente se refiere a ^{76}Br , ^{75}Br , ^{19}F y ^{18}F .

En las fórmulas del grupo que están representadas por A, el punto final de la línea adyacente a un * no es un átomo de carbono ni un grupo CH_2 , sino un componente del enlace al átomo al cual está unido A.

- 5 En las fórmulas del grupo que están representadas por L, el punto final de la línea adyacente a un * o # no es un átomo de carbono ni un grupo CH_2 , sino un componente del enlace al átomo al cual está unido L.

El resto representado por M en los compuestos de la invención puede estar unido al resto representado por L en los compuestos de la invención. Preferiblemente, el fluoróforo es sustancialmente no tóxico dentro del intervalo de concentración en el que se emplean los compuestos de la invención.

- 10 El resto representado por M en los compuestos de la invención es ^{18}F , que puede estar unido al resto representado por L en los compuestos de la invención. Preferiblemente, el resto ^{18}F es sustancialmente no tóxico dentro del intervalo de concentración en el que se emplean los compuestos de la invención. En una de sus formas más simples, M es un átomo de ^{18}F .

La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula (I) en la que X representa Cl.

- 15 La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula (I) en la que n es 2, 3 o 4.

R_1 representa hidrógeno o alquilo-($\text{C}_1\text{-C}_6$),

en la que el alquilo puede estar sustituido por uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidroxí, amino, ciano, nitro, halógeno, carbonilo, alcoxi-($\text{C}_1\text{-C}_4$), monoalquil-($\text{C}_1\text{-C}_4$)amino y dialquil-($\text{C}_1\text{-C}_4$)amino,

- 20 en la que R_1 representa un alquilo-($\text{C}_1\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido que comprende al menos un ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{11}C si X no es ^{76}Br , ^{75}Br o ^{18}F ,

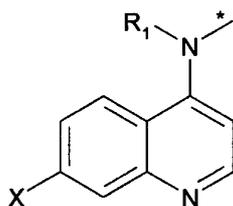
R_2 y R_3 , independientemente entre sí, representan hidrógeno o alquilo-($\text{C}_1\text{-C}_6$),

en la que el alquilo puede estar sustituido por uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidroxí, amino, ciano, nitro, halógeno, carbonilo, alcoxi-($\text{C}_1\text{-C}_4$), monoalquil-($\text{C}_1\text{-C}_4$)amino y dialquil-($\text{C}_1\text{-C}_4$)amino,

- 25 en la que al menos uno de R_2 y R_3 representa un alquilo-($\text{C}_1\text{-C}_6$) que comprende al menos un ^{11}C o que está sustituido con un resto que comprende al menos un ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{11}C , y

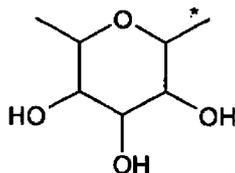
* representa el sitio de unión al resto representado por L.

En algunas realizaciones puede preferirse que M represente

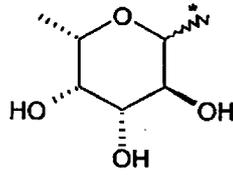


30

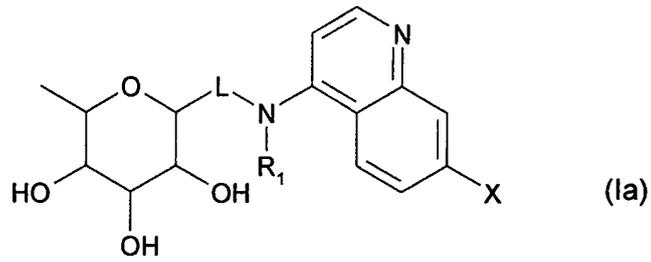
En algunas realizaciones puede preferirse que A represente



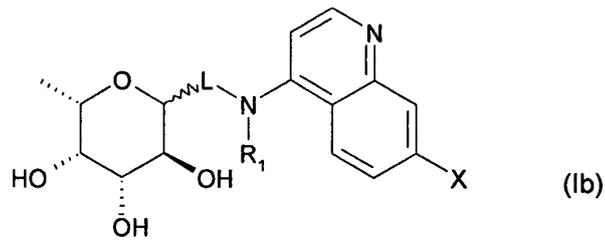
preferiblemente:



En algunas realizaciones puede preferirse que el compuesto de fórmula (I) sea el compuesto de fórmula

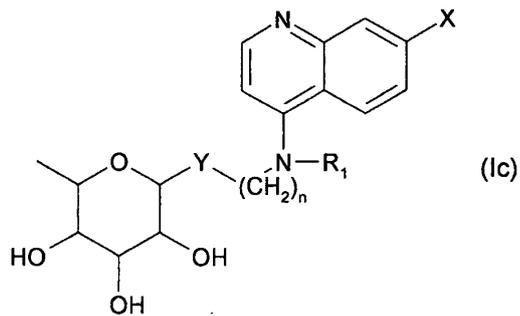


5 en la que R₁, L y X tienen el significado indicado anteriormente, preferiblemente:

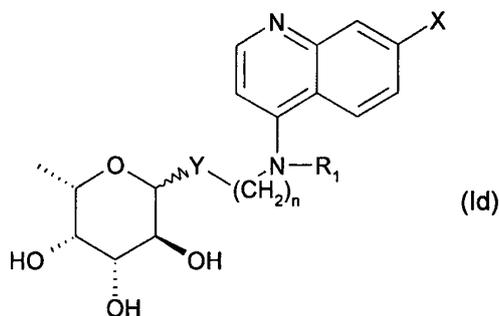


en la que R₁, L y X tienen el significado indicado anteriormente.

En algunas realizaciones puede preferirse que el compuesto de fórmula (I) sea el compuesto de fórmula



en la que R_1 , Y, X y n tienen el significado indicado anteriormente, e Y preferiblemente representa O o N, preferiblemente:



en la que R_1 , Y, X y n tienen el significado indicado anteriormente, e Y preferiblemente representa O o N.

- 5 Los compuestos de la invención pueden prepararse según diversas rutas dependiendo de la naturaleza precisa de A, L y M.

Por ejemplo, es posible comenzar a partir de una fucosa protegida y convertir la fucosa protegida en un derivado de 2-bromofucosa protegido.

- 10 Esta reacción en general se realiza en presencia de un reactivo bromador, opcionalmente en un disolvente, a una temperatura desde 0 °C hasta el reflujo del disolvente.

Los agentes bromadores adecuados incluyen PBr_3 y HBr en ácido acético.

Los disolventes preferidos son hidrocarburos halogenados, tales como diclorometano o triclorometano.

El derivado de 2-bromofucosa puede hacerse reaccionar, en la siguiente etapa, con un compuesto que formará el resto representado por L en los compuestos de la invención.

- 15 Los ejemplos de dichos compuestos incluyen etilenglicol, 2-aminoetanol, 1,2-etilendiamina, 1,3-propandiol, 3-amino-1-propanol y 1,3-diaminopropano.

Las condiciones para dicha reacción de acoplamiento son muy conocidas por los expertos en la técnica.

- 20 El conjugado de A-L obtenido de esta manera después puede acoplarse de nuevo bajo condiciones conocidas por los expertos en la técnica con un compuesto que se corresponde con el resto representado por M en los compuestos de la invención.

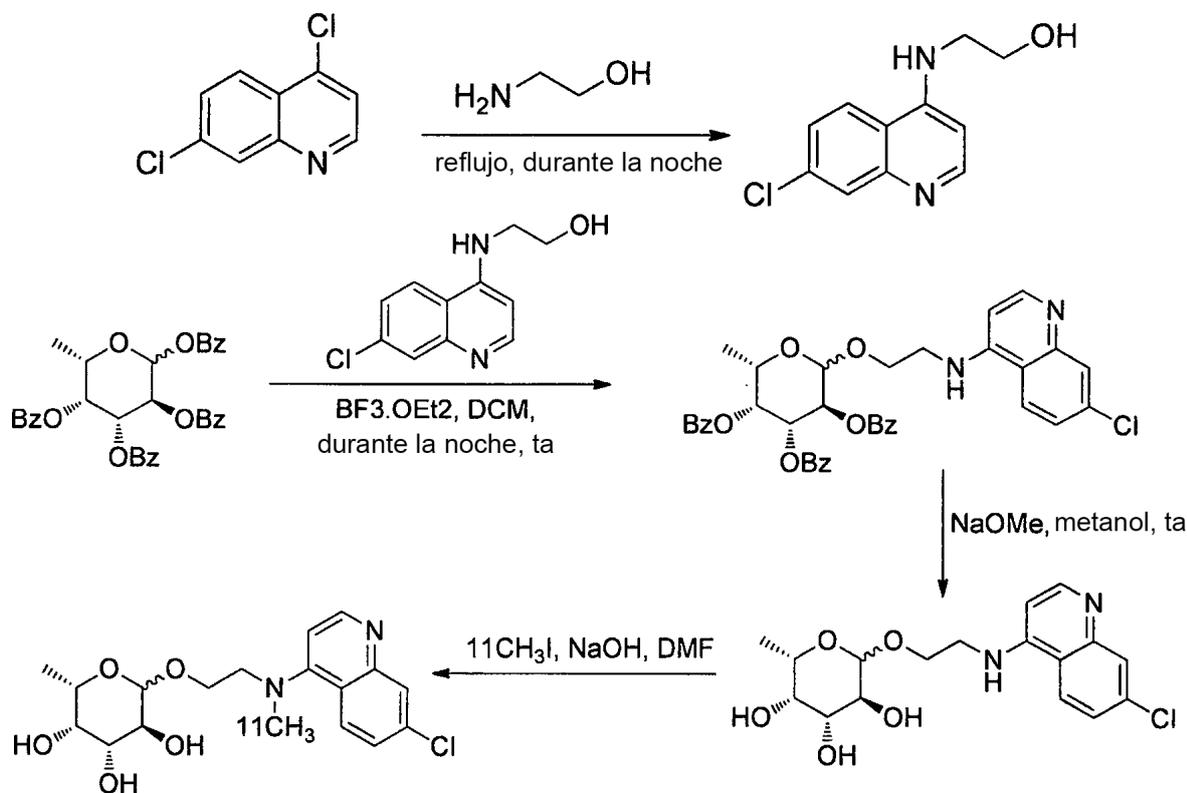
Después de la etapa de acoplamiento final, cualquier grupo protector presente en el compuesto obtenido se retira para obtener los compuestos de la invención.

- 25 También es posible convertir el derivado de 2-bromofucosa en la azida correspondiente y hacer reaccionar esta azida con un alquino adecuado bajo las condiciones adecuadas para obtener una reacción de tipo clic, seguido de otras etapas de acoplamiento y de una o más reacciones de desprotección cuando sean apropiadas. En este caso, en los compuestos que se obtienen, L representa un triazol.

- 30 Otra ruta para conseguir los compuestos de la invención implica hacer reaccionar un compuesto que se corresponde con el resto representado por M en los compuestos de la invención, con un compuesto que formará el resto representado por L en los compuestos de la invención. El conjugado de M-L después puede acoplarse con un compuesto que se corresponde con el resto representado por A en los compuestos de la invención, seguido de una o más reacciones de desprotección cuando sean apropiadas.

- 35 Algunos ejemplos de rutas sintéticas no limitantes para los compuestos de la invención se muestran en los siguientes esquemas. Las reacciones del esquema de reacción 1 producen un intermedio protegido que puede desprotegerse, por ejemplo, a través de un método en analogía a la etapa final mostrada en el esquema de reacción 2 para obtener los compuestos de la invención.

Esquema de reacción 2:



Los compuestos de la invención muestran una gama valiosa de efectos farmacológicos que no pudieron haber sido previstos. Son capaces de marcar a las células senescentes.

- 5 Por tanto, la invención se refiere además al uso del compuesto de la invención en un método para detectar la senescencia de células.

Por tanto, la invención se refiere además al uso del compuesto de la invención en un método para determinar la eficacia de un tratamiento del cáncer.

- 10 La invención, por tanto, se refiere además a un medicamento que comprende un compuesto según la invención en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico inerte.

El compuesto de la invención puede usarse para detectar la senescencia de células.

El compuesto de la invención puede usarse para determinar la eficacia de un tratamiento del cáncer.

Un método para detectar la senescencia de células comprende poner en contacto células con un compuesto de la invención.

- 15 Un método para determinar la eficacia de un tratamiento del cáncer comprende poner en contacto células con un compuesto de la invención.

Los anteriores métodos pueden realizarse *in vivo*, por ejemplo, en un paciente humano, para controlar la eficacia de un tratamiento del cáncer, o *in vitro*, por ejemplo, para seleccionar nuevos medicamentos.

Los compuestos se administrarán preferiblemente por vía parenteral.

- 20 Para esta administración, los compuestos de la invención pueden administrarse en formas de administración adecuadas.

- 25 La administración parenteral puede realizarse evitando una etapa de absorción (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbal) o con la inclusión de una etapa de absorción (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para la administración parenteral son, entre otras, preparaciones para la inyección y la infusión en forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Los compuestos de la invención pueden convertirse en las formas de administración mencionadas. Esto puede realizarse de una manera conocida *per se* mezclando con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos inertes. Estos excipientes incluyen, entre otros, vehículos (por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulgentes y dispersantes o agente humectantes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitano), ligantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo, albúmina), estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes, tales como, por ejemplo, ácido ascórbico) y correctores del sabor y/u olor.

Los datos en porcentaje en los siguientes ensayos y ejemplos son, a menos que se indique lo contrario, porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Las proporciones de disolventes, las proporciones de dilución y los datos de concentración de líquidos/disoluciones líquidas se basan, en cada caso, en el volumen. La indicación "en p/v" significa "en peso/volumen". Así, por ejemplo, "al 10% en p/v" significa que 100 ml de disolución o suspensión contienen 10 g de sustancia.

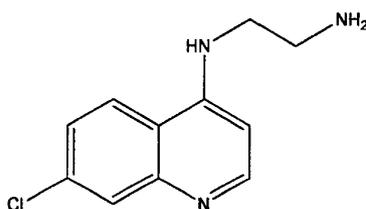
Ejemplos

Métodos generales

15 Todos los datos de LCMS (a menos que se indique lo contrario) se obtuvieron empleando un sistema de ESI/APCI HPLC-ms Agilent con una columna Phenomenex (Luna C-18, 250 x 4,60 mm, 5 micrómetros). Las muestras se ensayaron usando un gradiente de CH₃CN al 5% en agua (+ AcOH al 0,1%) durante 2 minutos que después aumentó hasta CH₃CN al 100% a lo largo de 26 minutos, tras lo cual el disolvente se mantuvo a CH₃CN al 100 % durante 2 minutos más.

20 *Materiales de partida e intermedios*

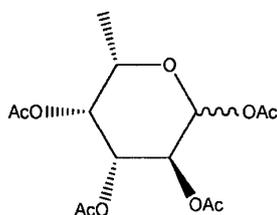
Ejemplo 1A



*N*¹-(7-cloroquinolin-4-il)etan-1,2-diamina

25 Una disolución de 4,7-dicloroquinolina (5,0 g, 25,2 mmol) en etilendiamina (15 g, 250 mmol) se calentó hasta 90 °C, agitando durante la noche bajo una atmósfera de argón. Una TLC indicó el consumo completo de la quinolina de partida, con una conversión punto a punto en un producto más polar. Se añadió NaOH 6 M (30 ml) y el material orgánico se extrajo en DCM (3 x 100 ml). Después de lavar con salmuera (2 x 100 ml) y de secar sobre MgSO₄, los disolventes se retiraron al vacío, produciendo 2,0 g de un sólido cristalino incoloro, que no se purificó más. La identidad y la pureza se confirmaron usando una LCMS, que reveló un único pico de UV activo (3,47 minutos, m/z 221,7 [M]⁺).

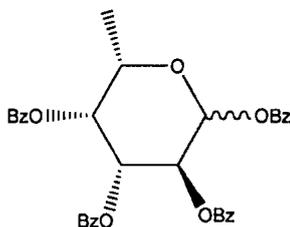
30 Ejemplo 2A



Tetraacetato de (3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetraílo

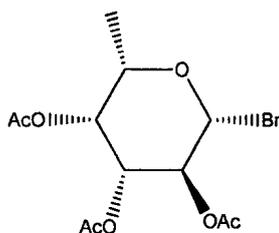
35 A una disolución hirviendo de anhídrido acético (35 ml) y NaOAc (2.5 g, 30.5 mmol) se le añadió L-fucosa (5 g, 30,5 mmol) en pequeñas porciones. Cuando la disolución se convirtió en translúcida se retiró del calor y solidificó parcialmente tras su enfriamiento. Los residuos se vertieron sobre hielo triturado (50 g) y se añadió bicarbonato de sodio sólido hasta que cesó la producción de gas. El material orgánico se extrajo en EtOAc (3 x 100 ml), se lavó con bicarbonato de sodio (100 ml) y salmuera (100 ml) y se secó sobre MgSO₄. Tras retirar los disolventes al vacío se produjo un jarabe amarillo (10,1 g, 99,6%).

Ejemplo 3A

Tetrabenzoato de (3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2,3,4,5-tetrailo

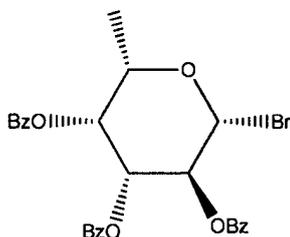
- 5 Se disolvió L-fucosa (2,0 g, 12,2 mmol) en piridina (15 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió cloruro de benzoilo (7,1 ml, 60,1 mmol) a través de un embudo de adición gota a gota a lo largo de 5 minutos, tras lo cual se retiró el baño de hielo y se dejó la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua helada (100 ml) y se extrajo en EtOAc (3 x 100 ml). Los residuos se lavaron con HCl 1 M enfriado en hielo (2 x 100 ml) y salmuera (100 ml), seguido de un secado sobre MgSO₄. Después de la retirada de los disolventes al vacío, el semisólido resultante se purificó empleando una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc:PE = 3:7) para producir un sólido incoloro cristalino (6,9 g, 93 %).

Ejemplo 4A

Triacetato de (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-bromo-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo

- 15 A una disolución de HBr (10 ml, al 33% en AcOH) se le añadió el compuesto del ejemplo 2A (2,1 g, 6,3 mmol). La reacción se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se vertió sobre hielo triturado (50 g). Después de una extracción en DCM (3 x 30 ml), las fases orgánicas reunidas se lavaron repetidamente con porciones de bicarbonato de sodio (3 a 7 x 50 ml) hasta que alcanzaron la neutralidad. Un secado sobre MgSO₄ y la eliminación de los disolventes al vacío produjo el bromuro como un jarabe naranja espeso. Debido a su inestabilidad no se purificó más, sino que se empleó directamente en las siguientes reacciones.

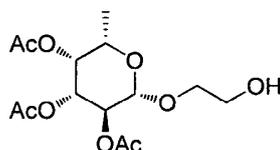
Ejemplo 5A

Tribenzoato de (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-bromo-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo

- 25 El compuesto del ejemplo 3A (1,1 g, 1,9 mmol) en DCM seco (6 ml) se enfrió hasta 0 °C en un RBF equipado con un septo de goma. Después de desgasificar y cargar el recipiente con argón, se añadió gota a gota PBr₃ (0,285 ml, 3,1 mmol), seguido de agua (0,190 ml, 10,5 mmol) a través de distintas jeringas desechables. Después de 15 minutos de agitación a 0 °C se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió DCM (50 ml), seguido de agua (50 ml). Los residuos se extrajeron aún más en DCM (2 x 30 ml), se lavaron con bicarbonato de sodio (2 x 50 ml), salmuera (50 ml) y se secaron sobre MgSO₄. Después de la retirada del disolvente al vacío quedó el sólido incoloro resultante, que demostró ser puro mediante una TLC (1,0 g, 98%).

30

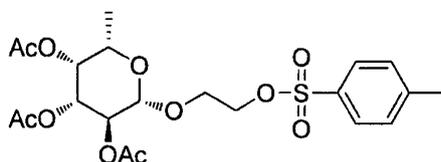
Ejemplo 6A



Triacetato de (2S,3S,4R,5R,6S)-2-(2-hidroxi)eto-6-metiltetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

5 Se agitaron el compuesto del ejemplo 4A (4,0 g, 11,3 mmol), etilenglicol (7,0 g, 112,7 mmol) y Ag_2CO_3 (4,7 g, 16,9 mmol) en CH_3CN seco (25 ml) durante 24 horas a temperatura ambiente en un tubo de secado con cloruro de calcio. La disolución se filtró a través de un lecho corto de Celite para retirar todo el material sólido, tras lo cual se añadió bicarbonato de sodio (150 ml), y el material orgánico se extrajo en DCM (3 x 100 ml). Después de secar sobre MgSO_4 y de eliminar los disolventes al vacío, el aceite naranja resultante se purificó empleando una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAC:PE = 2:5) para producir el compuesto del título como un aceite naranja (1,5 g, 40 %).

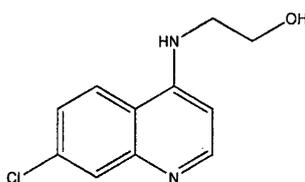
Ejemplo 7A



Triacetato de (2S,3R,4R,5S,6S)-2-metil-6-(2-(tosiloxi)eto)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

15 Se añadió cloruro de tosilo (1,1 g, 3,0 mmol) a una disolución del compuesto del ejemplo 6A (1,0 g, 3,0 mmol) y piridina (1 ml) en DCM (15 ml), agitando a 0 °C durante 30 minutos. Después se dejó que la reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche, tras lo cual se añadió bicarbonato de sodio (50 ml) y el material orgánico se extrajo en DCM (3 x 50 ml). Después de lavar con salmuera (2 x 30 ml) y sulfato de cobre al 10% acuoso, el producto bruto se secó sobre MgSO_4 , se concentró al vacío y se purificó una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAC:PE = 2:5) para producir el compuesto del título como un sólido blanco cristalino (0,43 g, 29%).

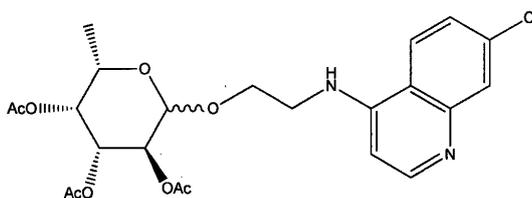
Ejemplo 8A



2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etanol

25 Se sometió a reflujo 4,7-dicloroquinolina (11,6 g, 58,6 mmol) en 2-aminoetanol (45 ml, 1,37 mol) bajo una atmósfera de argón durante la noche. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente se añadió NaOH 1 M (100 ml) y se dejó en agitación durante 10 minutos. El material sólido amarillo resultante se recogió empleando un embudo Büchner, se lavó con agua (5 x 100 ml) y se secó a fondo al vacío, produciendo el compuesto del título como un sólido de color amarillo claro (12,27 g, 94 %).

Ejemplo 9A

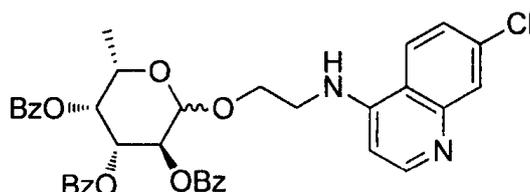


30

Triacetato de (3S,4R,5R,6S)-2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)eto-6-metiltetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

Se preparó una disolución que contenía el compuesto del ejemplo 2A (2,0 g, 6,0 mmol), el compuesto del ejemplo 8A (2,0 g, 9,0 mmol) y tamices moleculares 4Å (5 g) en DCM seco (15 ml), se desgasificó y se dejó en agitación bajo una atmósfera de argón durante 10 minutos a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió BF₃·OEt₂ (2,6 g, 18,2 mmol) a través de un septo de goma y la reacción se mantuvo a 0 °C durante 30 minutos más, tras lo cual se retiró el baño de hielo y se dejó la reacción en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de Celite y se lavó a fondo con DCM (3 x 20 ml). El residuo orgánico se lavó hasta la neutralidad con bicarbonato de sodio (3 x 50 ml), tras lo cual se lavó más con salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se retiró al vacío. La mezcla bruta se purificó empleando una cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH:EtOAc:NEt₃ = 10:90:1) que produjo el compuesto del título como un semisólido amarillo (0,6 g, 20%). La identidad se confirmó mediante LCMS (10,58 minutos, m/z 494,6 [M]⁺).

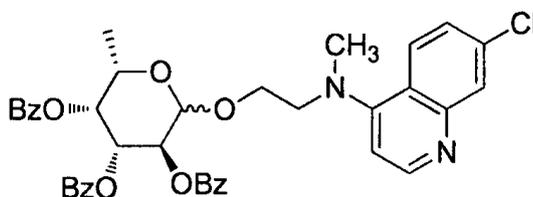
Ejemplo 10A



Tribenzoato de (3S,4R,5R,6S)-2-(2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etoxi)-6-metiltetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

Se preparó una disolución que contenía el compuesto del ejemplo 3A (3,3 g, 5,7 mmol), el compuesto del ejemplo 8A (1,9 g, 8,3 mmol) y tamices moleculares 4Å (10 g) en DCM seco (30 ml), se desgasificó y se dejó en agitación bajo una atmósfera de argón durante 10 minutos a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió BF₃·OEt₂ (4,8 g, 35,06 mmol) a través de un septo de goma y la reacción se mantuvo a 0 °C durante 30 minutos más, tras lo cual se retiró el baño de hielo y se dejó la reacción en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de Celite y se lavó a fondo con DCM (3 x 30 ml). El residuo orgánico se lavó hasta la neutralidad con bicarbonato de sodio (3 x 50 ml), tras lo cual se lavó más con salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄ y el disolvente se retiró al vacío. La mezcla bruta se purificó empleando una cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH:EtOAc:NEt₃ = 10:90:1) que produjo el compuesto del título como un semisólido amarillo (0,9 g, 23%). La identidad se confirmó mediante LCMS (13,29 minutos, m/z 680,6 [M]⁺).

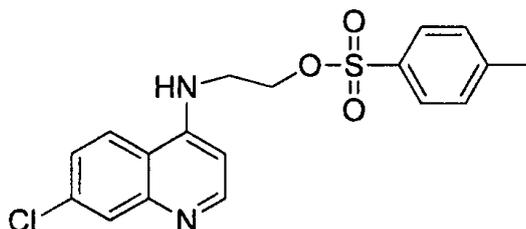
Ejemplo 11A



Tribenzoato de (3S,4R,5R,6S)-2-(2-((7-cloroquinolin-4-il)(metil)amino)etoxi)-6-metiltetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

A una disolución del compuesto del ejemplo 11A (107 mg, 0,17 mmol) y K₂CO₃ (40 mg, 0,29 mmol) en DMF (5 ml), en agitación a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón, se le añadió CH₃I (50 mg, 0,35 mmol). La reacción se calentó hasta 90 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se vertió en una disolución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml), se extrajo en DCM (3 x 50 ml) y se lavó con salmuera (50 ml). Un secado sobre MgSO₄ y la eliminación del disolvente al vacío produjo el intermedio como un aceite amarillo. No se intentó ninguna purificación y la mezcla de reacción bruta se llevó a la siguiente etapa. La identidad se confirmó mediante LCMS (13,64 minutos, m/z 695,7 [M]⁺).

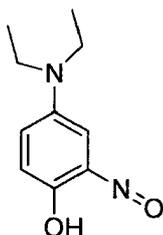
Ejemplo 12A



4-metilbencensulfonato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etilo

5 Se preparó una disolución del compuesto del ejemplo 8A (1,0 g, 4,5 mmol) y piridina (1 ml, 12,4 mmol) en DCM (13 ml) y se enfrió con agitación en un baño de hielo. Se añadió cloruro de tosilo (0,9 g, 4,7 mmol) y se dejó que la reacción se calentase hasta la temperatura ambiente. Se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) y las capas orgánicas se extrajeron en DCM (3 x 50 ml), seguido de unos lavados con más bicarbonato de sodio (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml). El material orgánico se secó sobre MgSO₄, los disolventes se retiraron al vacío y se purificó usando una cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH:EtOAc:NEt₃ = 5:95:1-MeOH:EtOAc:NEt₃ = 10:90:1) que produjo el compuesto como un sólido amarillo (0,55 g, 33%).

Ejemplo 13A

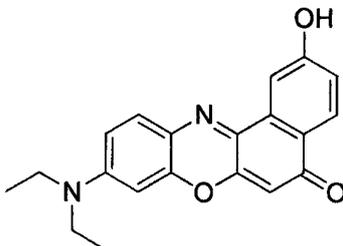


10

4-(diethylamino)-2-nitrosophenol

15 Se preparó una disolución que contenía 3-dietilaminofenol (15,0 g, 90,7 mmol) en HCl concentrado (100 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió lentamente NaNO₂ (6,9 g, 100,0 mmol) en agua (50 ml) a lo largo de 40 minutos de modo que no se observaron vapores marrones de NOx. La reacción se dejó en agitación durante 2 horas, tras lo cual el precipitado espeso se filtró usando un embudo Büchner y se lavó con pequeñas porciones de agua (3 x 50 ml). Después de secar el sólido durante 1 hora en el embudo Büchner, el material sólido se disolvió en EtOH (70 ml), se añadió Et₂O (35 ml) y la disolución se conservó a -20 °C durante la noche para permitir la cristalización. Al día siguiente, el material sólido se recogió mediante filtración al vacío usando un embudo Büchner y se secó al aire. El producto fue un sólido naranja/rojo (8,8 g, 50 %).

Ejemplo 14A

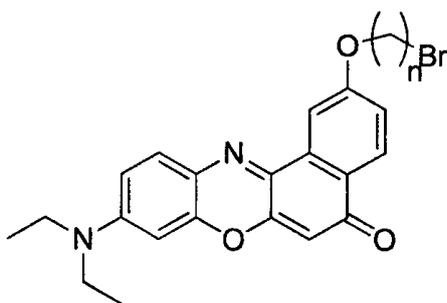


20

9-(diethylamino)-2-hidroxi-5H-benzo[a]fenoquinazolin-5-ona

25 El compuesto del ejemplo 13A (7,0 g, 36,0 mmol) y 1,6-dihidroxi-naftaleno (5,9 g, 36,1 mmol) se sometieron a reflujo en DMF (100 ml) durante 3 horas. Después de retirar los disolventes al vacío, el residuo se redisolvió en metanol y se adsorbió sobre sílice y se purificó empleando una cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH:NEt₃ = 50:1) para producir el compuesto del título como un sólido de color morado oscuro (11,1 g, 92%).

Ejemplo 15A

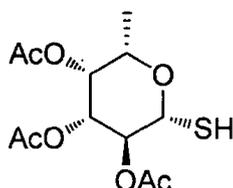


2-(bromometoxi)-9-(diethylamino)-5H-benzo[a]fenoquinazolin-5-ona

Una disolución que contenía el compuesto del ejemplo 14A (4,2 g, 12,6 mmol), K₂CO₃ (2,5 g, 18,1 mmol) y 1,3-

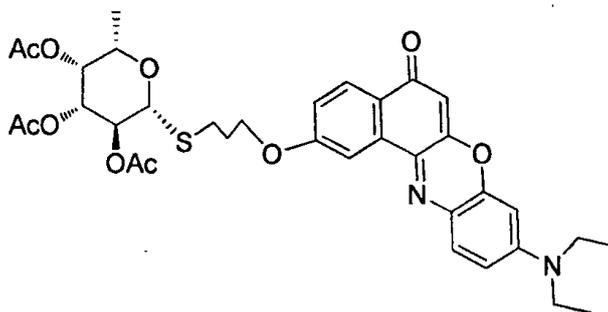
dibromopropano (25,2 g, 126 mmol) en DMF (30 ml) se sometió a reflujo durante 2 h. El disolvente se retiró al vacío y el sólido bruto se purificó usando una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc:éter de petróleo:NEt₃ = 40:60:1) que produjo el compuesto del título como un sólido de color morado (1,1 g, 19%). Una LCMS confirmó que era el producto con un pico de UV (21,40 minutos, m/z 454,6 [M+H]⁺).

5 Ejemplo 16A

Triacetato de (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-2-mercapto-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triolo

10 El compuesto del ejemplo 4A (1,5 g, 4,3 mmol) y tiourea (0,4 g, 5,5 mmol) se sometieron a reflujo en acetonitrilo desgasificado seco (20 ml) durante 1 hora, tras lo cual el matraz se enfrió durante 30 minutos en un baño de hielo. El material sólido se recogió mediante un embudo Büchner, se lavó con acetonitrilo frío y se secó al aire durante 30 minutos (0,9 g). Se añadió la sal de isotiuronio (0,9 g, 2,5 mmol) en DCM (10 ml) a un matraz de 3 bocas que contenía agua desgasificada a fondo (20 ml). A esto se le añadió Na₂S₂O₅ (0,6 g, 2,5 mmol), tras lo cual la disolución se sometió a reflujo a 50 °C bajo una atmósfera de argón durante 30 minutos y después se dejó que se enfriase durante 10 minutos más. Una extracción usando DCM (3 x 50 ml), un secado sobre Na₂SO₄, seguido de la
15 eliminación de los disolventes al vacío produjo el compuesto del título como un sólido translúcido (0,5 g, 37%).

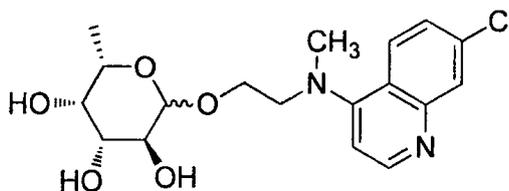
Ejemplo 17A



20 El compuesto del ejemplo 15A (450 mg, 0,99 mmol), el compuesto del ejemplo 16A (470 mg, 1,53 mmol) y K₂CO₃ (260 mg, 1,88 mmol) se sometieron a reflujo durante 1 hora en acetonitrilo (20 ml). Una TLC reveló una conversión punto por punto del bromuro de rojo del Nilo a un producto fluorescente más polar. Después de una purificación usando una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc:éter de petróleo:NEt₃ = 1:1), se produjo el compuesto del título como un sólido de color morado (450 mg, 67% mmol).

Ejemplos de compuestos

Ejemplo 1



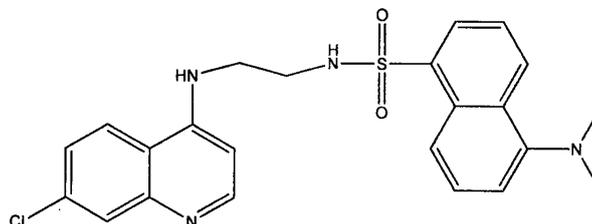
25

(3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-2-(2-((7-cloroquinolin-4-il)(metil)amino)etoxi)-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triolo

30 El compuesto del ejemplo 12A sin purificar se disolvió en metanol seco (5 ml), tras lo cual se añadió NaOMe (al 30-40% en MeOH, 0,1 ml) y la reacción se dejó en agitación en un tubo de secado durante 90 minutos. Se añadió AcOH (al 30% en metanol) gota a gota para disminuir el pH hasta 4-6. Después de extinguir el NaOMe, los disolventes se eliminaron al vacío para producir el compuesto del título. La identidad se confirmó mediante LCMS (8,91 minutos, m/z 382,7 [M]⁺).

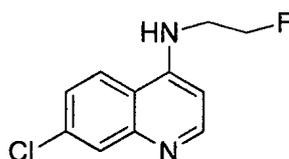
Este compuesto no se encuentra dentro del alcance de la reivindicación 1, pero se proporciona como modelo, por ejemplo, para los compuestos marcados con ^{11}C de la invención.

Ejemplo 2

5 *N*-(2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etil)-5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamida

Se disolvió el compuesto del ejemplo 1A (0,5 g, 2,3 mmol) en DCM (10 ml) que contenía NEt_3 (1 ml, 6,9 mmol) y la disolución se enfrió hasta $0\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño de hielo. Se añadió cloruro de dansilo (0,6 g, 2,3 mmol) en forma de un sólido y se dejó que la reacción se calentase hasta la temperatura ambiente mientras se agitaba en un tubo de secado cargado con cloruro de calcio. Se añadió bicarbonato de sodio (10 ml) y el residuo orgánico se extrajo en DCM (3 x 15 ml). El material orgánico reunido se lavó con agua (10 ml) y después con salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO_4 y los disolventes se retiraron al vacío. Una purificación empleando una cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{MeOH}:\text{EtOAc}:\text{NEt}_3 = 10:90:1$) produjo el compuesto del título como un sólido amarillo (1,0 g, 96%). La identidad se confirmó mediante LCMS (10,94 minutos, m/z 454,7 $[\text{M}]^+$).

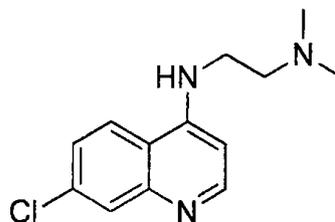
Ejemplo 3

15 7-cloro-*N*-(2-fluoroetil)quinolin-4-amina

Se preparó una suspensión que contenía el compuesto del ejemplo 12A (0,83 g, 3,75 mmol) en DCM (15 ml). Esta suspensión se añadió a un matraz de 3 bocas que contenía desoxofluor (al 50% en THF, 1,79 ml, 4,1 mmol) a temperatura ambiente, agitando bajo una atmósfera de argón. Se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado (50 ml) y los restos se extrajeron en DCM (3 x 30 ml) y se lavaron con más bicarbonato de sodio hasta que alcanzaron la neutralidad. El material orgánico se secó sobre MgSO_4 , los disolventes se retiraron al vacío y el material bruto se purificó usando una cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{MeOH}:\text{EtOAc}:\text{NEt}_3 = 10:90:1$) para producir el compuesto como un sólido amarillo (0,37g, 44%). La identidad se confirmó mediante LCMS (9,29 minutos, m/z 224,7 $[\text{M}]^+$).

25 Este compuesto no se encuentra dentro del alcance de la reivindicación 1, pero se proporciona como modelo, por ejemplo, para los compuestos marcados con ^{18}F de la invención.

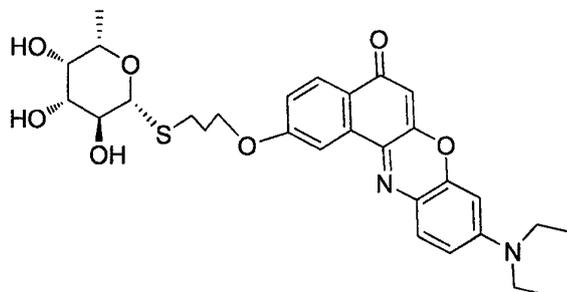
Ejemplo 4

30 *N*¹-(7-cloroquinolin-4-il)-*N*²,*N*²-dimetiletan-1,2-diamina

Se calentaron 4,7-dicloroquinolina (3,0 g, 15,1 mmol) y *N,N*-dimetiletildiamina (10,0 g, 113,4 mmol) hasta $115\text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche. Se añadió NaOH 6 M (20 ml) y las fases orgánicas se extrajeron en DCM (3 x 50 ml). Después de lavar con salmuera (2 x 100 ml) y de secar sobre MgSO_4 , los disolventes se retiraron al vacío, produciendo el compuesto del título como un sólido de color marrón claro (3,7 g, 98%). Se demostró que el producto era puro mediante LCMS (2,83 minutos, m/z 249,7 $[\text{M}]^+$).

Este compuesto no se encuentra dentro del alcance de la reivindicación 1, pero se proporciona como modelo, por ejemplo, para los compuestos marcados con ^{11}C de la invención.

Ejemplo 5



5 9-(diethylamino)-2-(3-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-il)tio)propoxi)-5H-benzo[a]fenoxazin-5-ona

Se disolvió el compuesto del ejemplo 17A (450 mg, 0,7 mmol) en metanol seco (10 ml), a lo cual se le añadió metóxido de sodio (al 30-40% en metanol, 0,1 ml). Se dejó que la reacción se desarrollase a temperatura ambiente durante 5 horas, tras lo cual se añadió ácido acético (0,5 ml), se retiraron los disolventes al vacío y el residuo bruto se purificó usando una cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc:metanol = 4:1) para producir JC106 como un aceite negro (356 mg, 96% mmol).

Evaluación de la actividad farmacológica

A continuación se describe la actividad farmacológica de los compuestos de la invención remitiéndose a los dibujos adjuntos, que muestran:

15 Figura 1: Datos de un análisis FACS del compuesto del ejemplo 5 en células HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal) y células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) con y sin un tratamiento con doxorubicina 250 nM.

Figura 2: Fotos de microscopía óptica de células HCT116 y MCF7 teñidas con β -gal con y sin un tratamiento con doxorubicina 250 nM. Las células tratadas, principalmente las células MCF7, mostraron una fuerte expresión de β -gal.

20 Figura 3: Una gráfica de las señales de tinción obtenidas para células HCT116 y MCF7 teñidas con LysoTracker® en presencia y en ausencia de doxorubicina.

Figura 4: Datos de un análisis FACS del compuesto del ejemplo 2 en células HCT116 y MCF7 con (senescencia +) y sin un tratamiento con doxorubicina 250 nM. Las células se incubaron durante 20 min en 37 °C con CO_2 al 5%. Las células se marcaron con 40 ng/ml del compuesto del ejemplo 2. Ambas células HCT116 y MCF7 tratadas con doxorubicina mostraron un mayor enriquecimiento en la molécula marcada sin necesidad de una permeabilización.

Para demostrar la capacidad de los compuestos de la invención para marcar y visualizar células senescentes, se incubaron células HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal) y células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) durante 20 min a 37 °C con CO_2 al 5% en presencia y en ausencia de doxorubicina. Después las células se marcaron con 40 ng/ml del compuesto del ejemplo 5.

30 Las células MCF7 tratadas con doxorubicina mostraron un mayor enriquecimiento en el inhibidor del compuesto del ejemplo 5, indicado por un desplazamiento en la dirección de PerCP-A. Esto demuestra la capacidad del compuesto del ejemplo 5 para unirse y visibilizar células senescentes.

Para estimular a células HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal) y células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) para la tinción de β -galactosidasa de senescencia, las células se trataron con doxorubicina 250 nM durante 24 horas. La doxorubicina interacciona con el ADN mediante intercalación e inhibe el avance de la enzima topoisomerasa II. La figura 2 muestra fotos de microscopía óptica representativas de células HCT116 y MCF7 teñidas con β -gal con y sin un tratamiento con doxorubicina 250 nM. Las células tratadas con doxorubicina aumentan de tamaño en la senescencia y, principalmente las células MCF7, mostraron una fuerte expresión de β -gal (azul), lo cual indica la presencia de células senescentes (véase la figura 2).

40 En la figura 3 se muestra una gráfica que indica la señal obtenido a partir de la tinción de lisosomas de células HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal) y células MCF7 (línea celular de cáncer de mama), en presencia y en ausencia de doxorubicina. Esta gráfica de nuevo muestra una tinción de lisosomas positiva potenciada, comparado con células sin tratamiento de doxorubicina (células no tratadas), lo cual indica la presencia de células senescentes.

5 Para demostrar la capacidad de los compuestos de la invención para marcar y visualizar células senescentes, se incubaron células HCT116 (línea celular de carcinoma colorrectal) y células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) durante 20 min a 37 °C con CO₂ al 5%. Después las células se marcaron con 40 ng/ml del compuesto del ejemplo 2. Ambas células HCT116 y MCF7 tratadas con doxorubicina mostraron un mayor enriquecimiento en la molécula marcada sin necesidad de una permeabilización (véase la figura 4). Esto demuestra la capacidad del compuesto del ejemplo 2 para unirse y visibilizar células senescentes incluso en células no permeabilizadas.

Resumen

10 Los datos mostrados en la figura 2 y la figura 3 claramente demuestran la presencia de células senescentes en las líneas celulares tratadas con doxorubicina. La figura 1 y la figura 4 demuestran claramente que los compuestos de la invención se acumulan en células senescentes y producen una señal mensurable. Esto demuestra que los compuestos de la invención pueden actuar como marcadores para células senescentes y pueden ser detectados, por ejemplo, por medio de métodos de formación de imágenes ópticos.

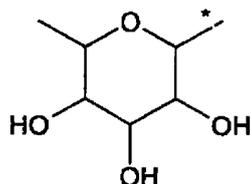
REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula:



en la que:

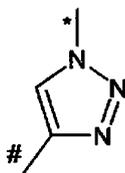
5 A representa



en la que:

* representa el sitio de unión al resto representado por L.

L representa $*Y-(CH_2)_n-#$ o



10

en la que:

Y se selecciona del grupo que consiste en O, N, S, SO y SO₂,

n es un número entero de 2 a 6,

* representa el sitio de unión al resto representado por A, and

15 # representa el sitio de unión al resto representado por M, and

M representa un resto que comprende al menos ¹⁸F,

y sus sales, sus solvatos y los solvatos de sus sales.

2.- Un compuesto según la reivindicación 1, que se caracteriza porque n es 2, 3 o 4.

20 3.- Un medicamento que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o 2 en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico inerte.

4.- El uso de un compuesto según la reivindicación 1 o 2 para detectar la senescencia de células *in vitro*.

5.- El uso de un compuesto según la reivindicación 1 o 2 para determinar la eficacia de un tratamiento del cáncer *in vitro*.

25 6.- Un método para detectar la senescencia de células que comprende poner en contacto células con un compuesto según la reivindicación 1 o 2 *in vitro*.

7.- Un método para determinar la eficacia de un tratamiento del cáncer que comprende poner en contacto células con un compuesto según la reivindicación 1 o 2 *in vitro*.

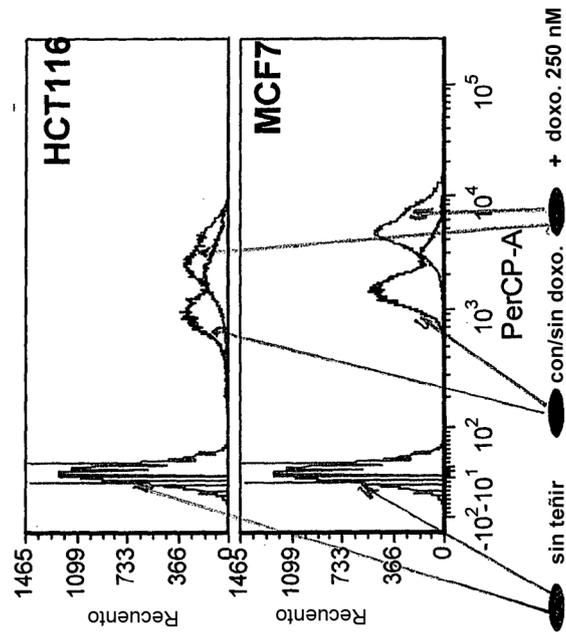


Figura 1: Datos de FACS para un inhibidor de fucosidasa marcado con rojo del Nilo en células HCT116 y MCF7

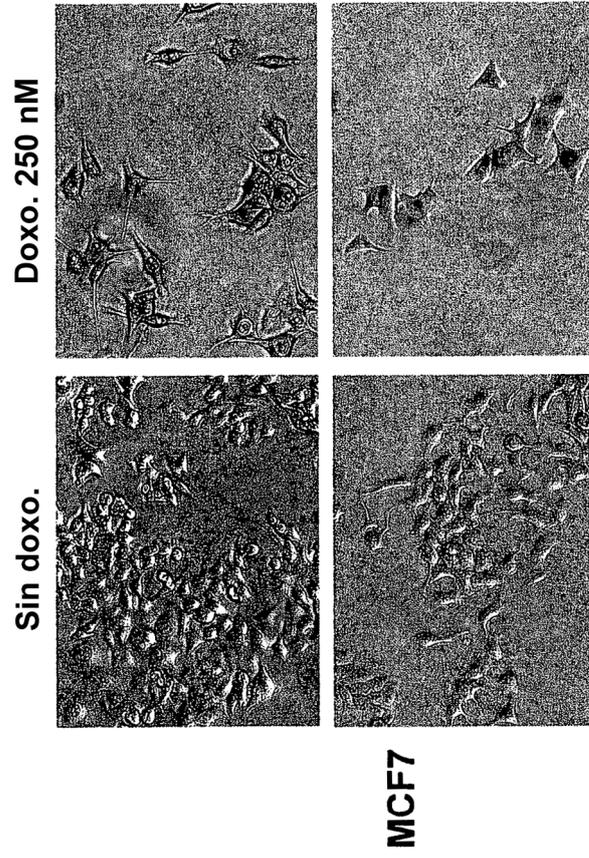


Figura 2: Fotografías de microscopía óptica del ensayo de tinción de β -Gal en células HCT116 y MCF7

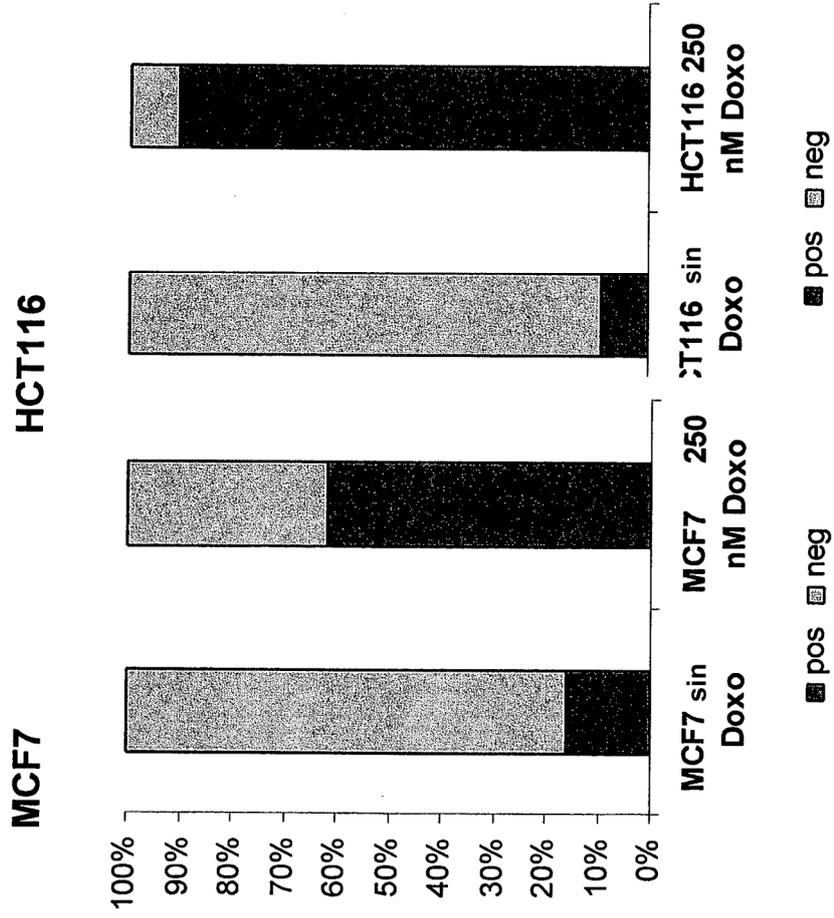


Figura 3: Tinción de lisosomas de HCT116 y MCF7 con LysoTracker®

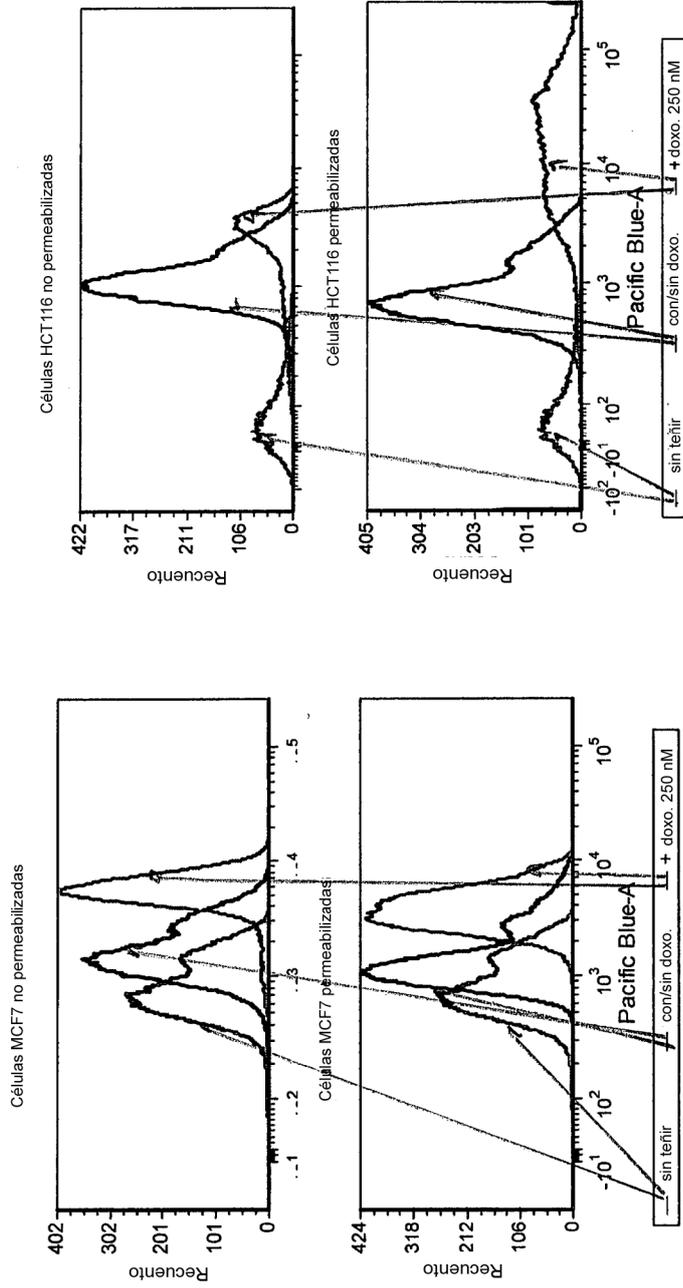


Figura 4: Datos de FACS para aminoquinolina marcada con dansilo en HCT116 y MCF7