

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 464**

21 Número de solicitud: 201230670

51 Int. Cl.:

C07C 217/74 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.11.2013

Fecha de la concesión:

26.08.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.09.2014

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (75.0%)

OTRI. Edificio Central Universidad

C/ Delgado Barreto, s/n

38201 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) ES y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (25.0%)**

72 Inventor/es:

DÍAZ GONZÁLEZ, Mario;

MARRERO ALONSO, Jorge Nicolás;

GÓMEZ SOUTULLO, Tomás;

MARÍN CRUZADO, Raquel;

LAHOZ ZAMARRO, Fernando y

BOTO CASTRO, Alicia

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Derivados del tamoxifeno, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

Derivados del tamoxifeno, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

La invención se refiere a derivados del tamoxifeno, y sus usos como composición farmacéutica en el tratamiento de enfermedades que cursan con activación de la señalización por estrógenos o como herramienta para la identificación dianas moleculares del tamoxifeno o como emisor laser molecular. Además, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de estos compuestos y a composiciones que los comprenden.

ES 2 428 464 B1

DESCRIPCIÓN

Derivados del tamoxifeno, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere a unos compuestos nuevos, derivados del tamoxifeno, y sus usos como composición farmacéutica en el tratamiento de enfermedades que cursan con activación de la señalización por estrógenos o como herramienta para la identificación de dianas moleculares del tamoxifeno o como emisor láser molecular. Además, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de estos compuestos y a composiciones que los comprenden.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 El tamoxifeno es el fármaco más comúnmente utilizado en la quimioterapia anticancerosa en el tratamiento del cáncer de mama estrógeno-dependiente. La introducción del fármaco en la práctica clínica desde los años 70, ha permitido acumular una gran cantidad de datos epidemiológicos que demuestran su gran eficacia en el tratamiento de este tipo de tumores. El paradigma fundamental que explica los efectos beneficiosos del tamoxifeno es que éste actúa, en los tumores de mama dependientes de estrógenos, como un antiestrógeno, es decir como una molécula capaz de antagonizar la unión de los estrógenos a sus receptores intracelulares, conocidos como receptores de estrógenos. A pesar de su bien aceptada aplicabilidad, numerosas evidencias demuestran que el tamoxifeno es capaz de producir un considerable número de efectos secundarios, que van desde la endometriosis (y el cáncer de endometrio) a la generación de cataratas [MacGregor JI, Jordan VC. "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action". *Pharmacol Rev.* (1998) 50(2):151-196 y en Jordan VC. "Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer"; *Cancer Cell.* (2004) 5(3):207-213].

25 Una buena parte de sus efectos indeseados están relacionados con su capacidad para modular respuestas celulares independientes de los receptores de estrógenos, algunas de las cuales se inician en la membrana celular. La preparación de derivados no permeables del tamoxifeno, con grupos amonio en la cadena lateral, han permitido conocer algunas respuestas a nivel de membrana como se describe en Marrero-Alonso J., Garcia-Marrero B., Gómez T. y Díaz M. *Functional inhibition of intestinal and uterine muscles by non-permeant triphenyl ethylene derivatives*, *Eur. J. Pharmacol.* (2006), 532, 115-127.

35 Pese a estos avances, en gran medida las bases moleculares de las acciones colaterales son desconocidas, debido a la falta de herramientas moleculares que permitan identificar las dianas celulares sobre las que se producen. Dentro de las posibles herramientas se encontrarían los derivados fluorescentes del fármaco. Aunque para otros compuestos se han desarrollado distintos derivados fluorescentes [R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, "Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications", *Chemical Reviews*, (2010), 110, 2579-2619], hay muy pocos trabajos sobre derivados del tamoxifeno, y ninguno de ellos es comercial.

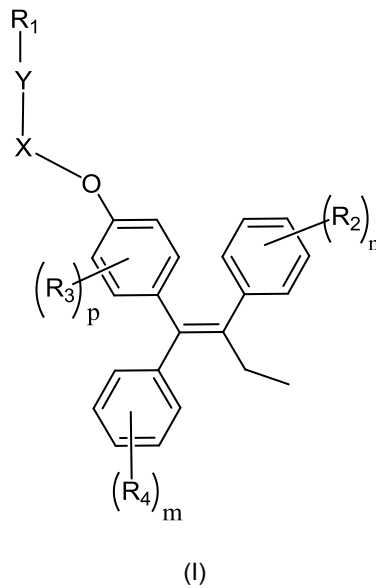
40 Recientemente se ha comunicado la síntesis y caracterización de derivados fluorescentes del 4-hidroxi-Tamoxifeno (4-OH-Tx) [Rickert EL, Oriana S, Hartman-Frey C, Long X, Webb TT, Nephew KP, Weatherman RV (2010) *Synthesis and characterization of fluorescent 4-hydroxytamoxifen conjugates with unique antiestrogenic properties. Bioconjugate Chemistry.* 21:903-910]. Estas modificaciones consisten en la conjugación del 4-OH-Tx con distintos fluoróforos, a saber, BODIPY, carboxifluoresceína y AlexaFluor 546, a través de un linker de 6 átomos de carbono (el 1,6-diaminohexano) sobre la cadena lateral del tamoxifeno. Tanto la incorporación del linker (que alarga la cadena lateral) como el tamaño del fluoróforo (que es muy voluminoso), interfieren la unión del tamoxifeno a los receptores de estrógenos.

50 Por tanto, existe la necesidad de sintetizar compuestos con actividad similar al tamoxifeno y que posean un efecto mínimo sobre la afinidad del derivado por el receptor de estrógenos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

55 Un primer aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de fórmula general (I) (a partir de ahora compuesto de la invención):



o cualquiera de sus sales, donde:

5 X representa un grupo alquilo (C₁-C₁₀) o acilo:

Y representa un grupo que se selecciona de la lista que comprende amino, amonio, tiol, éter, alquilo(C₁-C₃), alquenilo(C₂-C₃) y alquinilo(C₂-C₃);

R₁ representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo (C₁-C₃); preferiblemente R₁ está unido directamente al grupo Y.

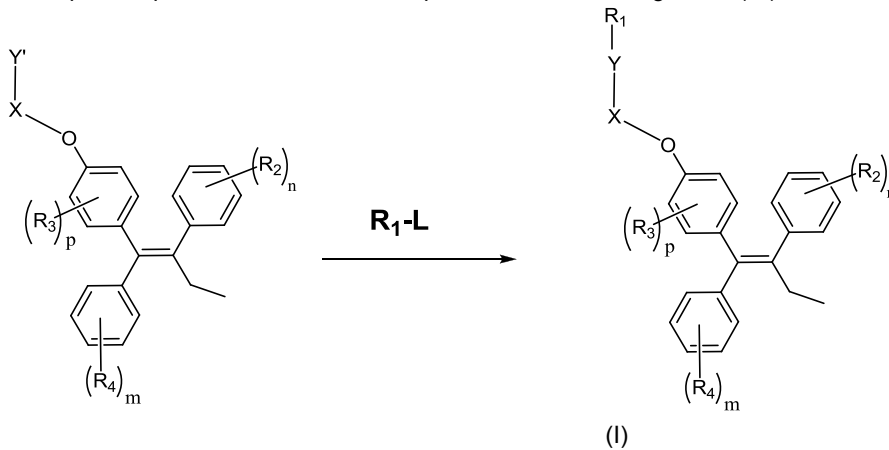
10 R₂, R₃ y R₄, representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH, NH₂, SH, O-alquilo, O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo, S-alquilo, alquilo, acilo y arilo;

n y m tienen, independiente, un valor de entre 1 a 5; y

p tiene un valor de entre 1 a 4.

15

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de obtención del compuesto de la invención, cuando Y es un grupo amino, tiol o éter, que comprende la reacción de un precursor de fórmula general (IV) con R₁-L:



20 donde: X, R₁, R₂, R₃, R₄, n, m y p se han descrito anteriormente; Y' es un grupo amino, OH o SH y L es un grupo saliente.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo

25

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I), para la identificación y evaluación de dianas moleculares del tamoxifeno distintas a los receptores de estrógenos, incluyendo transportadores y canales iónicos, así como otros lugares de unión a antiestrógenos (AEBS, antiestrogen-binding sites).

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la elaboración de una composición farmacéutica. Preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan a través de la actividad estrogénica.

Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y un disolvente orgánico no polar. Y el uso de dicha composición como pigmento láser y/o para la fabricación de un dispositivo láser o como resonador óptico.

5 Por tanto, otro aspecto más de la presente invención se refiere a un dispositivo láser que comprende el compuesto de la invención o la composición descrita anteriormente.

Descripción detallada de la invención

10 En la presente invención se describe un nuevo derivado fluorescente del tamoxifeno, es decir, el compuesto de la invención, además se describe el proceso químico para su obtención, y sus diferentes utilidades o aplicaciones, tanto como herramienta molecular como alternativa farmacológica al tamoxifeno. El estudio de los efectos biológicos indican, además, que el compuesto de la invención ha resultado ser tan poderoso como el propio tamoxifeno en su faceta antiestrogénica, pero desprovistos de sus efectos secundarios.

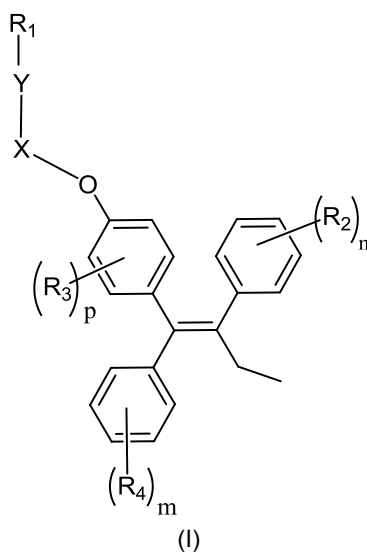
15 La presente invención se basa en el hecho que los inventores han identificado un nuevo derivado del tamoxifeno que sorprendentemente permite identificar además del receptor de estrógenos dianas moleculares no convencionales del tamoxifeno (Figura 1B), es decir, distintas al receptor de estrógenos, tanto intracelulares como de superficie celular y estudiar su farmacología molecular (Figura 1). Además, el compuesto de la invención previene el crecimiento y la proliferación celular dependiente de estrógenos en la línea celular MCF7, procedente de un carcinoma mamario humano, de forma similar al tamoxifeno (Figura 2A), pero no presenta estrogenicidad, es decir, que carece de la capacidad para inducir la activación del receptor de estrógenos (Figura 3A). En ratas inmaduras, donde el tamoxifeno se comporta como un antagonista parcial, el compuesto de la invención antagoniza el efecto uterotrófico del etinil-estradiol de manera similar al tamoxifeno pero sólo a las dosis más elevadas.

20 Por el contrario, y de gran importancia biológica y farmacéutica, el compuesto de la invención carece de los efectos uterotróficos del tamoxifeno o del estradiol (Tabla 1), no modifica ni el número de células epiteliales, ni su talla, ni aumenta el número de glándulas endometriales (Figura 4), no modifica el peristaltismo intestinal (Figura 5A) ni las respuestas contráctiles del útero o la aorta en el rango de concentraciones (Figura 5B) donde el tamoxifeno provoca una respuesta espasmolítica aguda y es mucho menos estrogénico que el tamoxifeno a cualquier dosis ensayada (Tabla 2).

25 Con respecto a su actividad biológica, el compuesto de la invención, al igual que el tamoxifeno, es bien tolerado por los animales de experimentación y no exhibe toxicidad en el rango de concentraciones ensayado (0,01 mg/kg/día – 10 mg/kg/día).

30 Dadas las propiedades biológicas demostradas, el compuesto de la invención también podría ser empleado como terapia antiestrógeno en tumores de mama estrógeno dependientes, y en otras enfermedades donde se requiere una actividad estrogénica.

40 Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de fórmula general (I) (en adelante compuesto de la invención):



45 o cualquiera de sus sales, donde:
 X representa un grupo alquilo (C₁-C₁₀) o acilo (-CO-); preferiblemente es un grupo alquilo;

Y representa un grupo que se selecciona de la lista que comprende amino, amonio, tiol(-S-), éter(-O-), alquilo(C₁-C₃), alqueni(C₂-C₃) y alquini(C₂-C₃); preferiblemente es un grupo amino o amonio;

R₁ representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo (C₁-C₃); preferiblemente R₁ se une directamente al grupo Y;

5 R₂, R₃ y R₄, representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH, NH₂, SH, O-alquilo(C₁-C₁₀), O-acilo(-OCO-R'), NH-alquilo(C₁-C₁₀), NH-acilo(-NHCO-R''), S-alquilo(C₁-C₁₀), alquilo(C₁-C₁₀), acilo(-CO-R''') y arilo; preferiblemente son, de manera independiente, hidrógeno, OH o O-alquilo;

n y m tienen, independiente cada uno, un valor de entre 1 a 5; y

p tiene un valor de entre 1 a 4.

10

En una realización preferida del compuesto de la invención, R₂ y R₃ son H.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, R₄ es H o OH.

15 En una realización más preferida n, m o p tienen el valor de 1.

Por "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono, más preferiblemente de entre 20 1 a 3 átomos de carbono. Aún más preferiblemente cuando X es un grupo alquilo es -CH₂-CH₂-.

Por "alqueni" se refiere en la presente invención a cadenas hidrocarbonadas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 3 átomos de carbono, y que contiene un enlace carbono-carbono doble, por ejemplo, vinilo, 1-propeni, alilo, isopropeni, etc.

25

El término "alquini" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, de 2 a 3 átomos de carbono, y que contiene un enlace carbono-carbono triple, por ejemplo, etilino, propini, etc.

30

Por "amino" se refiere a -NR_a-, donde R_a es un grupo alquilo (C₁-C₁₀), tal y como se ha descrito anteriormente. Más preferiblemente R_a es un grupo metilo.

Por "amoni" se refiere al grupo -⁺NR_aR_b-, donde R_a y R_b representan, de manera independiente, un grupo alquilo (C₁-C₁₀), tal y como se ha descrito anteriormente. Más preferiblemente son un grupo metilo.

35

Por "O-alquilo" se refiere a un grupo que contiene un átomo oxígeno unido a un grupo alquilo(C₁-C₁₀), definido anteriormente.

Por "O-acilo" se refiere al grupo -OCO-R', donde R' es un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₁₀), definido anteriormente.

40

Por "NH-alquilo" se refiere a un grupo -NH- unido a un grupo alquilo(C₁-C₁₀), tal y como se ha definido anteriormente.

Por "NH-acilo" se refiere al grupo -NHCO-R'', donde R'' es un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₁₀), tal y como se ha definido anteriormente.

45

Por "S-alquilo" se refiere a un grupo que contiene un átomo de azufre unido a un grupo alquilo(C₁-C₁₀), tal y como se ha definido anteriormente.

Por "acilo" se entiende el grupo -CO-R''', donde R''' es un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₁₀), tal y como se ha definido anteriormente.

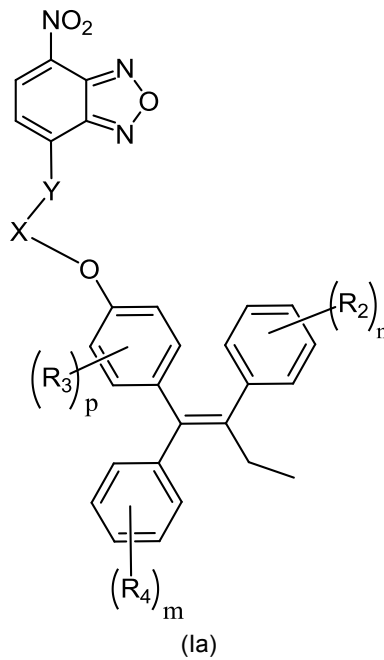
50

Por "arilo", se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos, sencillos o múltiples, que tienen entre 5 a 18 átomos de carbono en la parte del anillo, tales como pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, fluorenilo o antracilo. Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo.

55

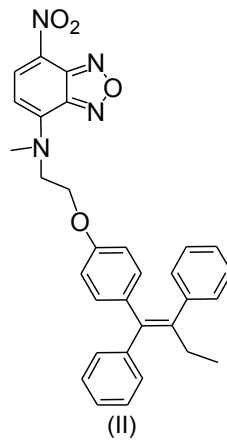
Por "fluoróforo" se refiere en la presente invención a una molécula fluorescente. Preferiblemente este fluoróforo es de pequeño tamaño, es decir, implica que dicha molécula sea de pequeño peso y volumen, más preferiblemente el fluoróforo tiene un peso molecular igual o inferior a 300 Da. Ejemplos de fluoróforos son, pero sin limitarse a, AMCA (dietilamino cumarin carboxil), NBD ((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il), dansilo (5-(Dimetilamino)naftaleno-1-sulfonil) o 60 4-*N,N*-dimetilaminoftalimido (o 4-*N,N*-Dimetilamino-1,8-naftalimido).

En una realización más preferida del compuesto de la invención, R₁ es NBD, dando lugar a la fórmula general (Ia):



Donde: X, Y, R₂, R₃, R₄, n, m y p, son tal y como se han descrito anteriormente.

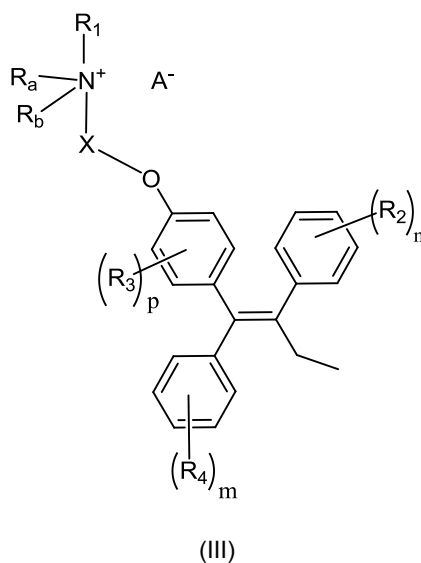
- 5 En una realización aún más preferida del compuesto de la invención, Y es un grupo amino y más preferiblemente un grupo -N(CH₃)-, aún más preferiblemente R₁ es NBD, más preferiblemente X es -CH₂-CH₂- y aún más preferiblemente es el compuesto de fórmula (II) denominado N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (FLT_X1 ó FLUTAMOX):



10

En otra realización preferida del compuesto de la invención, Y es un grupo amonio y se representa por la fórmula general (III):

15



5 donde: X, R₁, R₂, R₃, R₄, n, m y p, son tal y como se han descrito anteriormente;

R_a y R_b representan, de manera independiente un grupo alquilo (C₁-C₁₀), más preferiblemente un grupo alquilo (C₁-C₃), aún más preferiblemente un grupo metilo; y

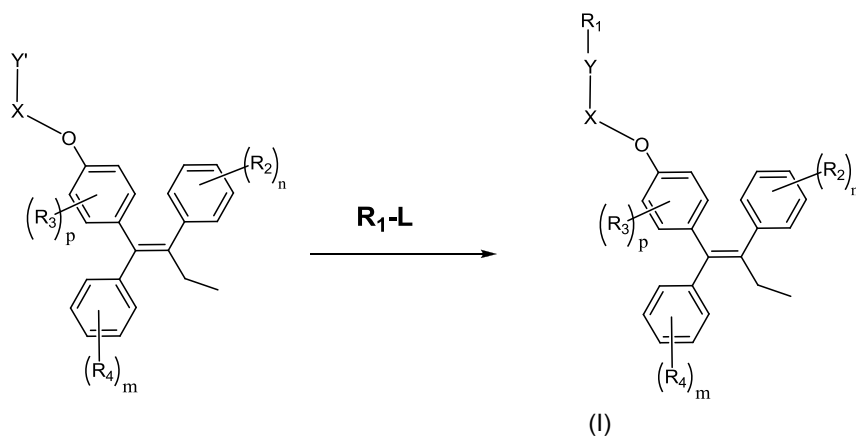
A⁻ representa un anión, el anión puede ser, pero sin limitarse un ión haluro (fluoruro, cloruro, yoduro o bromuro), sulfato o cualquier otro anión. Preferiblemente el anión es un ión haluro.

10

El compuesto de fórmula general (III) es un derivado no permeable del tamoxifeno, que permite estudiar sus interacciones a nivel de membrana.

15

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del compuesto (I) o compuesto de la invención, cuando Y es un grupo amino, tiol o éter, que comprende la reacción de un precursor de fórmula general (IV) con R₁-L:



20

donde: X, R₁, R₂, R₃, R₄, n, m y p se han descrito anteriormente; Y' es un grupo amino(NH), OH o SH y L es un grupo saliente.

Por "grupo saliente" se entiende a un átomo o grupo de átomos que se desligan fácilmente de una molécula, en este caso de la molécula fluorescente R₁. Grupos salientes son ampliamente conocidos por un experto en la materia y pueden ser, pero sin limitarse a, Cl, Br, I, mesilo (OMs), entre otros.

25

En una realización preferida del procedimiento de la invención, cuando X es un grupo CH₂-CH₂, Y es un grupo amino y R₂, R₃, R₄ son hidrógeno del compuesto de fórmula (I) que se obtiene, o más preferiblemente es el compuesto de fórmula (II), el precursor es el N-desmetiltamoxifeno:

5 contener excipientes convencionales conocidos en la materia, tales como agentes de unión, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; agentes de relleno, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón, maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina, lubricantes para la preparación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, desagregantes como almidón, polivinilpirrolidona glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina, o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, tal como laurilsulfato de sodio.

10 Las composiciones sólidas orales se pueden preparar por métodos convencionales de mezclado, llenado o preparación de comprimidos. Las operaciones repetidas de mezclado se pueden utilizar para distribuir de forma uniforme el principio activo utilizando grandes cantidades de agentes de relleno. Estas operaciones son convencionales en el arte de esta invención. Los comprimidos se pueden preparar, por ejemplo a través de granulación húmeda o seca y pueden ser opcionalmente recubiertos por métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, particularmente con un recubrimiento entérico.

15 Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para la administración parenteral, tal como soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma farmacéutica adecuada. Excipientes adecuados, tales como agentes a granel, neutralizantes o surfactantes pueden ser mencionados.

20 Los compuestos o composiciones descritos en la presente invención pueden ser administrados por cualquier método adecuado, como infusión intravenosa, preparaciones orales y administración intraperitoneal o intravenosa. Sin embargo, la vía de administración preferida dependerá de la condición del paciente. En particular, la administración oral es preferida debido a la comodidad para el paciente y el carácter crónico de las enfermedades que deben ser tratadas, aunque también es preferida la administración mediante inyección intratumoral, subcutánea o parenteral.

25 En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una cantidad de entre 0,01mg/kg/día a 10mg/kg/día del compuesto de fórmula general (I).

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades a través de su actividad antiestrogénica, por tanto estas enfermedades son las enfermedades tratables o prevenibles a través de su actividad antiestrogénica y estas se pueden seleccionar de la lista que comprende: osteoporosis, infertilidad masculina (oligospermia), ginecomastia, trastornos ovulatorios (incluyendo infertilidad), condición fibroquística mamaria o hipercolesterolemia.

35 Muchos cánceres de mama son sensibles a los estrógenos, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor canceroso mamario crezca. Este tipo de cáncer se denomina cáncer positivo para receptores de estrógenos o cáncer positivo para RE o cáncer de mama estrógeno dependiente.

40 Por tanto, una realización preferida de la invención comprende el uso del compuesto de la invención de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un tipo de cáncer estrógeno dependiente, más preferiblemente de cáncer de mama estrógeno dependiente.

45 Además del cáncer de mama, los estrógenos y sus receptores, se han asociado con una mayor incidencia de cánceres de útero y de endometrio, cáncer de ovario y cáncer de próstata. Por lo tanto, dado que el FLTX1 carece de los efectos hiperplásicos e hipertróficos del tamoxifeno en útero y endometrio en las pruebas realizadas, una realización preferida de la invención comprende el uso del compuesto de la invención de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de los cánceres de mama ER+ en los que existe un riesgo probable de carcinomas uterinos por tamoxifeno así como en la prevención y/o tratamiento de cánceres de endometrio, de ovario y de próstata cuyo progreso esté asociado a actividad estrogénica.

50 A lo largo de la presente descripción, el término "tratamiento" se refiere a eliminar, reducir o disminuir la causa o efectos de la enfermedad. Para los propósitos de esta invención, tratamiento incluye, aunque sin quedar limitados a los mismos, aliviar, disminuir o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad; reducir el grado de enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, aliviar o mejorar el estado de la enfermedad y remitir (ya sea total o parcial).

55 Además, el compuesto de la invención -diluido en un solvente orgánico adecuado, como por ejemplo metanol, aceite de oliva o acetona - se comporta como un medio material con capacidad de emisión láser (Figura 6). Esto es, el compuesto de la invención se comporta como un "Laser Dye" o pigmento láser y, por tanto, puede ser de aplicación en el campo de la nanotecnología, en concreto en óptica o optofluídica. Para conseguir que este pigmento láser emita luz láser debe iluminarse con luz pulsada cuya longitud de onda corresponda a la banda de absorción del compuesto de la invención utilizado (aprox. 550 nm). La presente invención supone una novedad ya que ni la molécula de tamoxifeno ni la del fluoróforo NBD producen, por sí solas emisión láser. Se trata de un descubrimiento relevante teniendo en cuenta que la eficiencia de conversión de luz de bombeo a luz de emisión láser es mayor (aproximadamente 30%) que la medida de otros pigmentos láser comerciales de uso frecuente como es el caso de la Rhodamina 6G (inferior al 20%).
60
65 Preferiblemente, el compuesto de la invención utilizado, en el rango de concentraciones entre 1 μ M y 50 mM y disuelto

en un solvente adecuado, se comporta como un medio material amplificador de luz de elevada eficiencia (pigmento láser) en el intervalo de 540-570 nm. Hay que destacar que:

- a. Produce emisión láser en alguna de esas longitudes de onda incluso sin necesidad de espejos que formen una cavidad láser al ser pulsado con una energía mínima dentro de la banda de absorción del fluoróforo;
- 5 b. Cuando se excita con un láser pulsado en régimen de nanosegundos, produce pulsos de emisión láser de alta energía (del orden de mili julios) con una duración temporal de los pulsos de nanosegundos; y
- c. Produce emisión láser en alguna de esas longitudes de onda cuando se adhiere una película de dicho medio por capilaridad alrededor de una estructura de simetría cilíndrica o circular.

10 Además, el compuesto de la invención podría utilizarse para el desarrollo de láseres con aplicaciones en optoelectrónica, optofluídica, óptica, medicina, oncología, etc. Igualmente, podría emplearse en metodologías basadas en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) tanto como donante como aceptor de energía para formación de imágenes en microscopía.

15 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o compuesto de la invención y un disolvente orgánico no polar.

20 Cualquier disolvente orgánico no polar o apolar es conocido por cualquier experto en la materia y como ejemplos, pero sin limitarse, se podría utilizar alcohol, dimetilsulfóxido, lípido graso, cetona o cualquiera de sus combinaciones, preferiblemente metanol, dimetilsulfóxido, aceite de oliva, acetona o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de la composición, el compuesto de fórmula (I) se encuentra en una concentración de entre 1 μ M a 50 mM con respecto a la composición final.

25 De manera adicional, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición anteriormente descrita o del compuesto de fórmula general (I), como pigmento láser, para la fabricación de un láser o como resonador óptico.

30 En una realización preferida, tanto la composición como el compuesto de fórmula (I) es útil para aplicaciones en optoelectrónica, optofluídica, óptica, medicina, oncología, en metodologías basadas en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), tanto como donante como aceptor de energía para formación de imágenes en microscopía, o fotoactivación por medios láser.

35 Teniendo en cuenta la aplicación de dicha composición o compuesto de fórmula (I), otro aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo láser que comprende el compuesto de la invención o la composición descrita anteriormente.

40 En otra realización preferida, la aplicación de la emisión láser del compuesto de la invención o más preferiblemente del compuesto de fórmula (II) puede utilizarse para destruir células tumorales, preferiblemente células ER+, en tumores localizados. Dentro de esta aplicación, estas células tumorales ER+ serían previamente cargadas con el compuesto mediante inyección intratumoral, subcutánea o parenteral y fotoactivadas por longitudes de onda dentro de su espectro de excitación.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención sería un método de tratamiento de estos tipos de cánceres, que comprende:

- 45 -la administración del compuesto de la invención en células tumorales mediante inyección intratumoral, subcutánea o parenteral; y
- la irradiación a una longitud de onda adecuada para la fotoactivación del compuesto y cuya emisión láser permita la destrucción localizada de células tumorales ER+.

50 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

55 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 **Figura 1.- Análisis mediante microscopia confocal de las propiedades fluorescentes y de marcaje celular del compuesto de la invención.** Espectros de excitación y de emisión del compuesto de fórmula II (Figura 1A). Este compuesto de la invención permite marcar dianas intracelulares en células permeabilizadas de diferentes líneas celulares (MCF7, SN56 y HT22, Figura 1B) y dianas de la membrana celular (MCF7, Figura 1C).

Figura 2.- Efectos estrogénicos/citotóxicos (A) y antiproliferativos (B) del tamoxifeno y del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno sobre la línea celular MCF7. Los asteriscos indican diferencias significativas de $p < 0,05$ respecto al vehículo.

5 **Figura 3.- Actividad transcripcional del tamoxifeno y del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno en células MCF7 y T47D-KBluc.** Ambas líneas celulares fueron transfectadas con el gen de la luciferasa bajo el control del receptor de estrógenos. Se muestran los resultados del abordaje antiestrogénico (A) y estrogénico (B). Los asteriscos indican diferencias significativas de $p < 0,05$ respecto al vehículo.

10 **Figura 4.- Efectos del tamoxifeno, estradiol y N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno sobre la estructura histológica del útero de ratones CD1.** Se muestran ejemplos representativos de las tinciones hematoxilina-eosina bajo los cuatro tratamientos. El panel superior muestra secciones transversales del cuerpo uterino. El panel central se observa la estructura microscópica del miometrio (myo), el estroma (stro) y el epitelio (epi). Las flechas señalan las glándulas del estroma. El panel inferior muestra microfotografías a 60 aumentos del epitelio. La doble flecha marca los límites en altura del epitelio.

15 **Figura 5.- Efectos del tamoxifeno y del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno sobre la actividad peristáltica espontánea (A) y sobre la respuesta contráctil uterina inducida por despolarización por KCl en presencia de CaCl_2 (B).** En A se muestran ejemplos representativos de las repuestas al tamoxifeno (panel izquierdo) y N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (panel derecho) sobre el peristaltismo duodenal en ratones hembra CD1. En B, respuesta típica de úteros de ratonas ovariectomizadas en las que se induce una contracción tónica por $\text{CaCl}_2 + \text{KCl}$. Tamoxifeno y N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno se aplican a los tiempos indicados.

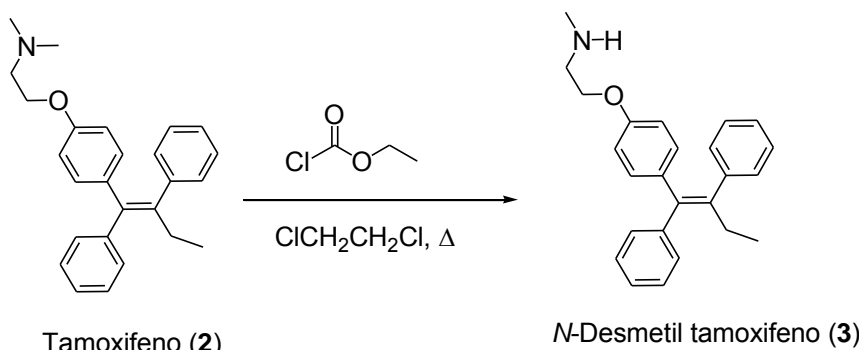
25 **Figura 6.- Energía de emisión láser del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno en función de la energía de bombeo incidente.** En el centro se muestra un esquema del sistema con la trayectorias de la luz incidente y emitida desde la cubeta. En la fotografía, la flecha indica la zona de emisión láser a 550 nm. Se empleó una solución concentrada de N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (10 mM) en acetona.

30 **Figura 7.- Espectro de resonancia de la energía de emisión láser del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno.** El espectro corresponde a la energía sobre el umbral de bombeo en el haz de luz con polarización vertical. Se empleó una solución concentrada de N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (10 mM) en acetona.

35 EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1.- Obtención química del compuesto de la invención de fórmula general (Ib).

1.1.- Primera etapa de obtención del N-Desmetiltamoxifeno (3).

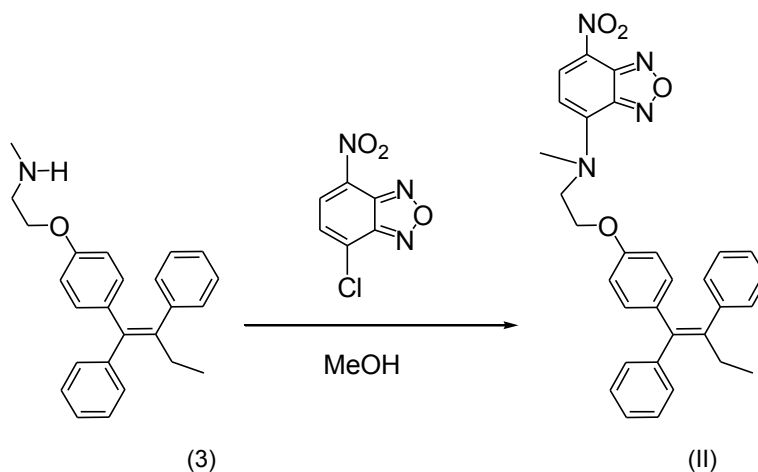


40 A una solución de tamoxifeno (2) (1,85 g, 5,0 mmol) en 1,2-dicloroetano seco (25 mL) se le añadió cloroformato de etilo (0,7 mL, 7,5 mmol) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 7 h. A continuación se añadió más cloroformato de etilo (0,7 mL, 7,5 mmol) y el reflujo se continuó durante 8 h. La mezcla de reacción se enfrió a 26 °C y se vertió sobre una solución acuosa diluida de NaOH y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó con sulfato sódico, se filtró y se evaporó el disolvente bajo vacío.

45 El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/EtOAc 1:1), obteniéndose N-desmetiltamoxifeno 3 (1,26 g, 71%) como un sólido cristalino: p.f. 75-76 °C (a partir de hexano); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} 0,89 (3H, dd, $J = 7,4, 7,5$ Hz), 2,40 (3H, s), 2,44 (2H, ddd, $J = 7,4, 7,4, 7,5$ Hz), 2,87 (2H, dd, $J = 5,2, 5,3$ Hz), 3,94 (2H, dd, $J = 5,0, 5,3$ Hz), 6,58 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,76 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,08 (1H, dd, $J = 7,0, 7,2$ Hz), 7,11 (2H, d, $J = 7,2$ Hz), 7,14 (2H, dd, $J = 7,2, 7,3$ Hz), 7,20 (2H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,25 (1H, dd, $J = 7,2, 7,5$ Hz), 7,33 (2H, dd, $J = 7,3, 7,7$ Hz); MS m/z (intensidad relativa) 357 (M^+ , 64), 300 ($\text{M}^+ + \text{H} - \text{MeNHCH}_2\text{CH}_2$, 100); HRMS m/z calcd para

$C_{25}H_{27}NO$, 357,2093; encontrada, 357,2063; calcd para $C_{22}H_{20}O$, 300,1514; encontrada, 300,1491. Anal. Calcd para $C_{25}H_{27}NO$: C, 83,99; H, 7,61; N, 3,92. Encontrado: C, 83,99; H, 7,79; N, 3,91.

1.2.- Segunda etapa de obtención del compuesto de la invención N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (Fórmula II).



A una solución agitada de desmetil tamoxifeno (**3**) (200 mg, 0,56 mmol) en metanol seco (15 mL) se le añadió 4-cloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol (NBD-Cl, 244 mg, 1,2 mmol) y la solución se agitó a 26 °C durante 5 h. Luego se vertió sobre una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó, filtró y evaporó como en el experimento anterior, y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexanos-EtOAc, desde 95:5 a 1:1), obteniéndose el compuesto de fórmula **II** como un sólido naranja cristalino (182 mg, 63%): p.f. 141-142 °C (pentano-EtOAc); 1H NMR (500 MHz, acetona- d_6) δ_H 0,85 (3H, dd, $J = 7,4, 7,4$ Hz), 2,39 (2H, ddd, $J = 7,4, 7,4, 7,5$ Hz), 3,57 (3H, br s), 4,27 (2H, dd, $J = 6,3, 6,3$ Hz), 4,52 (1H, m), 6,41 (1H, d, $J = 9,3$ Hz), 6,52 (2H, d, $J = 8,2$ Hz), 6,73 (2H, d, $J = 7,9$ Hz), 7,05-7,16 (5H, m), 7,18 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), 7,23 (1H, dd, $J = 7,1, 7,3$ Hz), 7,32 (2H, dd, $J = 7,0, 7,2$ Hz), 8,42 (1H, d, $J = 8,9$ Hz); ^{13}C NMR (125,7 MHz, acetona- d_6) δ_C 12,8 (CH₃), 29,0 (CH₂), 42,0 (CH₃), 54,6 (CH₂), 65,7 (CH₂), 102,2 (CH), 113,4 (2 × CH), 126,1 (CH), 126,6 (CH), 127,8 (2 × CH), 128,2 (2 × CH), 129,2 (2 × CH), 129,6 (2 × CH), 131,7 (2 × CH), 135,0 (C), 135,5 (CH), 136,0 (C), 138,4 (C), 141,4 (C), 142,4 (C), 143,7 (C), 145,0 (2 × C), 146,1 (C), 156,5 (C); MS m/z (intensidad relativa) 520 (M⁺, 100); HRMS m/z calcd para $C_{31}H_{28}N_4O_4$, 520,2111; encontrada, 520,2099; Anal. Calcd para $C_{31}H_{28}N_4O_4$: C, 71,52; H, 5,42; N, 10,76. Encontrado: C, 71,72; H, 5,49; N, 10,76.

25 Ejemplo 2.- Estudio de las propiedades fluorescentes y del marcaje celular del compuesto N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (FLTX1)

Los espectros de fluorescencia normalizados del compuesto FLTX1 en solución metanólica se muestran en la figura 1A. El compuesto tiene una excitación máxima a 428 nm y una emisión máxima a 530 nm (Mostrado en la Figura 1A para una solución de FLTX1 a 10 mM en metanol). El estudio de las propiedades fluorescentes del marcaje celular FLTX1, se realizó en células HT22, SN56 y MCF7, fijadas en 2% paraformaldehído 0,1% glutaraldehído y 150 mM sacarosa, a temperatura ambiente y bajo condiciones tanto permeabilizantes (0,5% nonidet P-40 2 minutos) y no-permeabilizantes. Posteriormente, las células fijadas fueron marcadas con 50 μM FLTX1 durante 2 horas, lavadas en PBS y montadas en soportes de vidrio en PBS/glicerol (1:1). El marcaje fluorescente se analizó utilizando microscopia confocal utilizando una línea de argón con excitación a 415 nm y registrando la fluorescencia emitida a 560 nm. En los ensayos de competición, previamente a la adición FLTX1, las células fueron expuestas a distintas concentraciones de estradiol, tamoxifeno o NBD, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los ensayos de colocalización con el receptor de estrógenos, se realizaron determinando primero la inmunoseñal del anticuerpo anti-ER alfa, y a continuación la señal fluorescente del FLTX1.

El derivado fluorescente FLTX1 permite marcar dianas intracelulares en células permeabilizadas de diferentes líneas celulares (MCF7, SN56 y HT22, Figura 1B). También es posible el marcaje fluorescente de la membrana celular, en línea con la existencia de lugares de unión de membrana para antiestrógenos en condiciones no permeabilizantes (mostrado en la Figura 1C para células MCF7, resultados similares se obtienen en las otras dos líneas celulares). El marcaje es específico para el tamoxifeno: es totalmente competido por éste y no se modifica por excesos del fluoróforo (NBD). Una buena parte del marcaje total, alrededor del 20%, es desplazado por el estradiol, indicando que además del receptor de estrógenos, el FLTX1, permite marcar otros lugares de unión al tamoxifeno. Una parte de este marcaje residual corresponde a los canales de calcio de tipo L.

Ejemplo 3.- Ensayos de inhibición de la proliferación celular del FLTX1,

Los ensayos de proliferación celular se realizaron sobre células MCF7, procedentes de un carcinoma mamario humano, positivas para el receptor de estrógenos cultivadas en medio libre de rojo fenol y en presencia de suero fetal inactivado por carbono. Para los ensayos de estrogenicidad y toxicidad, concentraciones crecientes del compuesto de la invención (10 nM-10 µM) se incorporaron a los cultivos a las 24 horas de iniciado el cultivo y se mantuvieron durante 6 días. Para los ensayos antiestrogénicos, se emplearon iguales concentraciones del compuesto de la invención que en los ensayos estrogenicos, pero se mantuvieron durante 4 días, tras los cuales se incorporó 100 pM 17β-estradiol. La viabilidad celular se cuantificó utilizando el reactivo WST-1 (Cell Proliferation Reagent, Roche), que determina la actividad mitocondrial en células funcionalmente viables. (Figura 2).

Así, se observó que el compuesto de la invención previene el crecimiento y la proliferación celular dependiente de estrógenos en la línea celular MCF7 de forma similar al tamoxifeno (Figura 2A). Por sí solos, ni tamoxifeno ni el compuesto de la invención presentan efectos proliferativos en esta línea celular (Figura 2B).

Ejemplo 4.- Análisis de los efectos antiestrogénicos del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (FLTX1)

El análisis de los efectos transcripcionales del FLTX1, se realizó en células cotransfectadas mediante electroporación con el gen reportero 3x-Vit-ERE-TATA-luciferasa y con el gen de la β-galactosidasa. Paralelamente se emplearon células T47D-KBluc, transfectadas de manera estable con el gen pGL2.TATA.Inr.luc.neo. Después de transfectadas, las células fueron incubadas en medio libre de rojo fenol en presencia de suero inactivado durante 24 horas. Tras este periodo se incubaron en presencia de tamoxifeno o del FLTX1 a las concentraciones indicadas (10 nM – 10 µM) durante 15 horas (en el abordaje estrogenico). En el estudio de los efectos antiestrogenico, las células fueron expuestas a estas mismas concentraciones de tamoxifeno o del FLTX1 durante 8 horas, y luego incubadas con 100 pM 17β-estradiol en presencia del tamoxifeno o del FLTX1 durante otras 15 horas. Una vez finalizados los experimentos, se recogieron las células, se destruyeron en tampón de lisis, se centrifugaron a 12000 g durante 2 minutos, y se determinó la actividad luciferasa en el sobrenadante mediante luminometría. La luminiscencia se normalizó a la cantidad de proteína en las mismas muestras. (Figura 3)

En los análisis de la modificación de la actividad transcripcional en células MCF7 y T47D-KBluc transfectadas con el gen de la luciferasa bajo el control del receptor de estrógenos, se observa que a diferencia del tamoxifeno, el compuesto de la invención no presenta estrogenicidad, es decir, que carece de la capacidad para inducir la activación del receptor de estrógenos (Figura 3A). Los abordajes antiestrogenicos muestran que el compuesto de la invención es tan poderoso como el tamoxifeno inhibiendo la actividad transcripcional (Figura 3B), con valores de IC₅₀ de alrededor de 1 µM.

Ejemplo 5.- Actividad uterotrónica del N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (FLTX1).

En los bioensayos "in vivo" de actividad uterotrónica se utilizaron ratonas CD-1 inmaduras (17 días) y ratas Sprague-Dawley inmaduras (19 días), mantenidas entre 22°C y 24°C bajo ciclos luz-oscuridad de 12 horas. Las ratonas fueron inyectados subcutánea- y diariamente con soluciones de tamoxifeno o del FLTX1 (en aceite de oliva) a las dosis de 0,01, 0,1 y 1 mg/kg/día (en el caso de ratas también se administraron dosis de 10 mg/kg/día) durante 3 días. Como controles positivos se utilizó 17β-estradiol (1 µg/kg/día), en el caso de ratonas, o etinil estradiol (0,5 µg/kg/día) en el caso de ratas, administrados también subcutáneamente durante 3 días. En el caso de ratas, donde se determinaron los efectos antiestrogenicos, la administración del tamoxifeno y del FLTX1, a las dosis indicadas, también se realizó conjuntamente con la de etinil estradiol (0,5 µg/kg/día). Tras este periodo los animales fueron sacrificados mediante anestesia con pentobarbital sódico y se extrajeron y pesaron los diferentes órganos y tejidos. En algunas ratonas CD-1, el tejido uterino extraído se dividió en dos porciones (cuernos) de los que uno se fijó en solución de Bouin para los ensayos morfométricos, y el otro se embebió en una solución PBS conteniendo 4% paraformaldehído para los ensayos inmunohistoquímicos. (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Pesos relativos de diferentes órganos y tejidos en ratones CD-1 puberales tratados con tamoxifeno y FLUTAMOX

Tratamiento	Útero						
	Húmedo	Seco	Cuernos	Cervix	Vagina	Hígado	Bazo
Vehículo	155,30 ± 12,85 ^Δ	140,77 ± 12,00 ^Δ	106,54 ± 9,06 ^Δ	34,23 ± 4,13 ^Δ	98,63 ± 13,69 ^Δ	5,07 ± 0,18	736,86 ± 79,58
17β-estradiol (1 µg/kg/día)	572,11 ± 78,15*	469,69 ± 41,63*	373,75 ± 38,39*	95,94 ± 4,35*	215,50 ± 23,10*	4,76 ± 0,19	571,44 ± 98,41
Tamoxifeno (mg/kg/día)							
0,01	220,37 ± 33,12 ^Δ	219,84 ± 31,19 ^Δ	176,38 ± 24,42 ^Δ	43,47 ± 6,95 ^Δ	159,38 ± 19,03	5,04 ± 0,55	593,12 ± 65,16
0,1	546,11 ± 62,84*	433,85 ± 27,05*	373,84 ± 18,92*	66,35 ± 7,04* ^Δ	213,63 ± 24,13*	4,52 ± 0,12	610,67 ± 73,43
1	474,02 ± 63,06*	373,16 ± 17,91*	328,66 ± 17,69*	44,50 ± 5,37 ^Δ	132,72 ± 16,41 ^Δ	4,57 ± 0,12	579,02 ± 38,16
FLUTAMOX (mg/kg/día)							
0,01	116,35 ± 25,75 ^Δ	113,72 ± 27,91 ^Δ	91,98 ± 21,49 ^Δ	21,74 ± 6,55 ^Δ	100,43 ± 21,63 ^Δ	4,54 ± 0,17	531,27 ± 82,18
0,1	110,70 ± 13,97 ^Δ	104,09 ± 16,71 ^Δ	88,19 ± 12,06 ^Δ	15,90 ± 5,08 ^Δ	89,61 ± 18,49 ^Δ	4,44 ± 0,21	520,36 ± 94,29
1	126,35 ± 20,65 ^Δ	119,30 ± 25,11 ^Δ	99,56 ± 20,55 ^Δ	19,74 ± 4,93 ^Δ	127,90 ± 28,86 ^Δ	4,55 ± 0,14	614,91 ± 69,39

Valores expresados como media ± error estándar, corregido a 100 g de peso corporal. Los pesos absolutos se indican en mg. Los valores de hígado se expresan como porcentaje del peso corporal. * Diferente del vehículo con significación estadística de $p < 0,05$. ^Δ diferente del estradiol con significación estadística de $p < 0,05$.

Tabla 2. Pesos relativos de diferentes órganos y tejidos en ratas Sprague-Dawley prepuberales tratadas con tamoxifeno y FLUTAMOX

Tratamiento	Útero						
	Húmedo	Seco	Cuernos	Cervix	Vagina	Hígado	Bazo
Vehículo	55,57 ± 3,71 ^Δ	48,73 ± 4,45 ^Δ	41,32 ± 4,10 ^Δ	7,41 ± 1,06 ^Δ	55,30 ± 6,18 ^Δ	4,47 ± 0,17	332,27 ± 30,25
Etinil estradiol (EE)							
(0,5 µg/kg/día)	313,43 ± 27,41*	229,67 ± 12,92*	185,73 ± 11,09*	43,94 ± 4,47*	106,27 ± 6,58*	3,55 ± 0,64	325,93 ± 21,78
Tamoxifeno							
(mg/kg/día)							
0,01	83,56 ± 6,03 ^Δ	75,17 ± 4,60 ^Δ	67,27 ± 4,72 ^Δ	7,90 ± 0,44 ^Δ	61,67 ± 6,23 ^Δ	4,01 ± 0,13	366,92 ± 33,56
0,1	148,31 ± 16,63 ^{*Δ}	135,53 ± 14,75 ^{*Δ}	118,24 ± 12,51 ^{*Δ}	17,29 ± 2,48 ^{*Δ}	73,78 ± 7,32 ^Δ	4,27 ± 0,25	351,35 ± 37,40
1	172,91 ± 10,95 ^{*Δ}	159,21 ± 7,62 ^{*Δ}	130,99 ± 5,45 ^{*Δ}	28,23 ± 2,31 ^{*Δ}	92,66 ± 6,42 [*]	4,05 ± 0,10	314,02 ± 25,83
10	208,05 ± 4,10 ^{*Δ}	198,69 ± 3,96*	156,00 ± 4,78*	42,69 ± 1,15*	97,83 ± 3,07*	4,26 ± 0,09	295,21 ± 7,16
FLUTAMOX							
(mg/kg/día)							
0,01	59,94 ± 2,93 ^Δ	57,51 ± 4,09 ^Δ	50,21 ± 3,60 ^Δ	7,30 ± 0,92 ^Δ	54,06 ± 1,67 ^Δ	4,29 ± 0,14	341,17 ± 13,44
0,1	60,69 ± 2,45 ^Δ	56,95 ± 3,32 ^Δ	50,84 ± 3,13 ^Δ	6,11 ± 0,43 ^Δ	59,89 ± 6,15 ^Δ	4,29 ± 0,20	329,21 ± 10,72
1	65,60 ± 3,40 ^Δ	60,66 ± 4,02 ^Δ	52,90 ± 4,04 ^Δ	7,76 ± 0,12 ^Δ	53,59 ± 5,36 ^Δ	4,15 ± 0,11	308,78 ± 23,74
10	151,00 ± 8,80 ^{*Δ}	138,13 ± 8,37 ^{*Δ}	120,21 ± 7,18 ^{*Δ}	17,92 ± 1,69 ^{*Δ}	84,45 ± 9,95*	3,86 ± 0,14*	353,86 ± 2,99
Tamoxifeno + EE (0,5 µg/kg/día)							
(mg/kg/día)							
0,01	238,16 ± 8,40 [†]	190,51 ± 6,73 [†]	157,80 ± 4,52	32,71 ± 2,83	98,63 ± 8,55	4,02 ± 0,05	350,80 ± 22,23
0,1	207,57 ± 19,78 [†]	173,98 ± 11,59 [†]	139,97 ± 6,28 [†]	34,01 ± 5,65	97,97 ± 11,96	3,93 ± 0,26	334,58 ± 32,44
1	176,28 ± 4,23 [†]	165,86 ± 3,07 [†]	133,52 ± 2,89 [†]	32,34 ± 3,46	78,72 ± 10,41	4,20 ± 0,19	338,66 ± 17,31
10	196,00 ± 11,71 [†]	186,38 ± 11,51 [†]	149,18 ± 9,39 [†]	37,20 ± 3,58	94,16 ± 7,84	4,04 ± 0,04	328,88 ± 28,50

FLUTAMOX+ EE (0,5 µg/kg/día)											
(mg/kg/día)											
0,01	314,94 ± 18,07	255,70 ± 17,95	208,01 ± 14,04	47,69 ± 4,65	116,76 ± 7,83	4,06 ± 0,10	348,31 ± 10,33				
0,1	290,95 ± 21,56	232,64 ± 16,02	194,38 ± 11,23	38,26 ± 4,98	104,19 ± 7,01	4,37 ± 0,10	279,02 ± 84,27				
1	235,52 ± 34,40	203,68 ± 28,32	167,71 ± 21,29	35,97 ± 7,19	99,28 ± 5,94	4,09 ± 0,08	323,88 ± 21,55				
10	216,24 ± 15,02†	190,65 ± 11,50	157,18 ± 11,02	33,47 ± 1,74	98,62 ± 4,99	3,86 ± 0,15*	337,15 ± 32,49				

Valores expresados como media ± error estándar, corregido a 100 g de peso corporal. Los pesos absolutos se indican en mg. Los valores de hígado se expresan como porcentaje del peso corporal. * Diferente del vehículo con significación estadística de $p < 0,05$. ^Δ Diferente del etinilestradiol con significación estadística de $p < 0,05$. † Diferente del etinilestradiol con significación estadística de $p < 0,05$ para el antagonismo.

Los ensayos uterotróficos realizados en ratones, donde el tamoxifeno se comporta como agonista estrogénico y provoca el aumento del tamaño y peso uterino, así como del cervix, muestran que el FLTX1 carece de los efectos uterotróficos del tamoxifeno o del estradiol (Tabla 1).

5 En ratas inmaduras, donde el tamoxifeno se comporta como un antagonista parcial, el FLTX1 antagoniza el efecto uterotrófico del etinil-estradiol de manera similar al tamoxifeno pero sólo a las dosis más elevadas. Por el contrario, FLTX1 es mucho menos estrogénico que el tamoxifeno a cualquier dosis ensayada (Tabla 2).

10 Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos se realizaron sobre muestras uterinas fijadas como se indicó anteriormente. Los cuernos uterinos se embebieron en parafina y se realizaron cortes seriados de 10 μm , desparafinados y teñidos con hematoxilina-eosina. Utilizando el software para morfometría Leica QWinV3 se analizaron el número de células, las alturas epiteliales y el número de glándulas del estroma sobre áreas consecutivas de 300 μm^2 .
15 Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron sobre muestras fijadas en paraformaldehído, utilizando un anticuerpo monoclonal anti PCNA (proliferating cell nuclear antigen). La reacción fue revelada mediante un anticuerpo secundario biotinilado acoplado a peroxidasa utilizando diaminobenzidina como sustrato. Se determinó el número de células positivas a PCNA en áreas de 300 μm^2 en secciones consecutivas de la porción media del cuerno uterino. (Figura 4).

20 En ratonas inmaduras, tanto el tamoxifeno como el 17- β estradiol provocan un aumento de la proliferación celular determinada como inmunoreactividad al antígeno de proliferación nuclear (PCNA) (+110% y +79% respecto al vehículo, para tamoxifeno y estradiol, respectivamente). Sin embargo, los valores observados para el compuesto de la invención fueron similares (incluso ligeramente inferiores) a los del vehículo (-14%).

25 En resumen, a diferencia del tamoxifeno, que provoca hiperplasia e hipertrofia del endometrio uterino, el compuesto de la invención no modifica ni el número de células epiteliales, ni su talla, ni aumenta el número de glándulas endometriales.

Ejemplo 6.- La influencias del compuesto de la invención en las actividades contráctiles asociadas al peristaltismo intestinal y a las respuestas mecánicas de útero y aorta.

30 Las actividades contráctiles asociadas al peristaltismo intestinal y a las respuestas mecánicas de útero y aorta, se realizaron en modelos de roedores adecuados al tipo de tejido ensayado (ratones CD-1 macho para el estudio del peristaltismo duodenal, ratonas ovariectomizadas para los ensayos sobre útero, y ratas macho Sprague-Dawley para los estudios de aorta). Una vez sacrificados los animales se extrajeron los órganos correspondientes y se mantuvieron en soluciones salinas fisiológicas, oxigenadas y glucosadas, específicas para cada órgano, a 37 °C durante 30 minutos. Se
35 ajustó la tensión basal y se determinó el rango contráctil para cada tejido al inicio de cada experimento. Las respuestas contráctiles de útero y aorta se indujeron mediante despolarización con KCl 60 mM. Tanto el tamoxifeno como el FLTX1 (en el rango 0,1-30 μM) se adicionaron directamente a los baños de órganos, mientras se monitorizaba la señal contráctil utilizando transductores isométricos. (Figura 5).

40 En resumen, el estudio de los efectos sobre la actividad contráctil de la musculatura lisa del tubo digestivo y del útero, indican que el compuesto de la invención no modifica ni el peristaltismo intestinal (Figura 5A) ni las respuestas contráctiles del útero en el rango de concentraciones (Figura 5B) donde el tamoxifeno provoca una respuesta espasmolítica aguda. Sin embargo, FLTX1, provocó un leve efecto relajante, similar al ejercido por el tamoxifeno, sobre la actividad contráctil de la musculatura lisa de aorta.

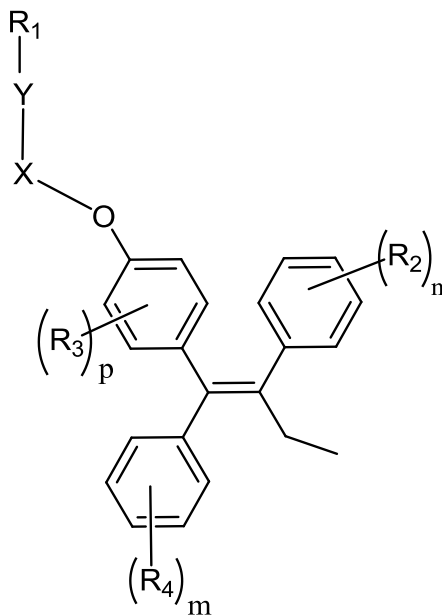
Ejemplo 7.- Caracterización del FLTX1 como material de emisión láser.

45 La emisión láser del FLTX1 se consigue iluminando el material (una disolución del FLTX1 entre 1 μM y 50 mM disuelto en un solvente orgánico no polar adecuado como acetona, metanol o aceite vegetal) con luz pulsada de una longitud de onda entre 425 nm y 520 nm, correspondientes a la banda de absorción del FLTX1. La densidad de energía de bombeo debe estar por encima de un valor mínimo. Si se emplea una fuente de luz pulsada de bombeo con una duración de pulsos de 10 ns en 470 nm, la densidad de energía mínima para obtener emisión láser es de 0,6 mJ/cm^2 . El medio material que produce la emisión láser es un fluido que puede alojarse en una cubeta de cuarzo transparente. Dicha cubeta no necesita recubrimientos espejados ni encontrarse dentro de una cavidad exterior láser. La emisión láser se
50 produce en el medio material en ausencia de espejos adicionales. (Figura 6A).

55 Por último, si se emplea en un entorno con geometría cilíndrica, esférica o circular, y dimensiones de decenas a cientos de micras, se puede construir un resonador óptico que amplifique la emisión del FLTX1 obteniendo picos de emisión láser muy estrechos que corresponden a los modos longitudinales de la cavidad resonante (Figura 7). La posición de estos picos es sensible a modificaciones en las propiedades físicas o químicas del medio. De este modo, las variaciones de estos picos de emisión láser pueden utilizarse como sensor para determinar interacciones entre el FLTX1 y otras moléculas, tales como receptores de estrógenos u otras dianas moleculares.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, donde:

X representa un grupo alquilo (C₁-C₁₀) o acilo:

Y representa un grupo que se selecciona de la lista que comprende amino, amonio, tiol, éter, alquilo(C₁-C₃), alqueno(C₂-C₃) y alquino(C₂-C₃);

R₁ representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo (C₁-C₃);

R₂, R₃ y R₄, representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH, NH₂, SH, O-alquilo, O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo, S-alquilo, alquilo, acilo y arilo;

n y m tienen, independiente, un valor de entre 1 a 5; y

p tiene un valor de entre 1 a 4.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₂ y R₃ son H.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R₄ es H o OH.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde n, m o p tienen el valor de 1.

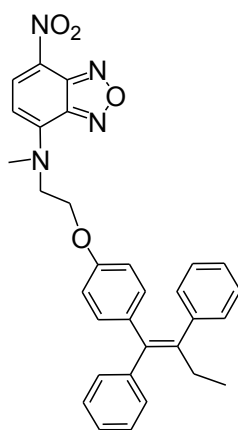
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el fluoróforo se selecciona de la lista que comprende AMCA, NBD, dansilo o 4-N,N-dimetilaminofalimido.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde X es un grupo alquilo (C₁-C₃).

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X es un alquilo C₂.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde Y es un grupo amino.

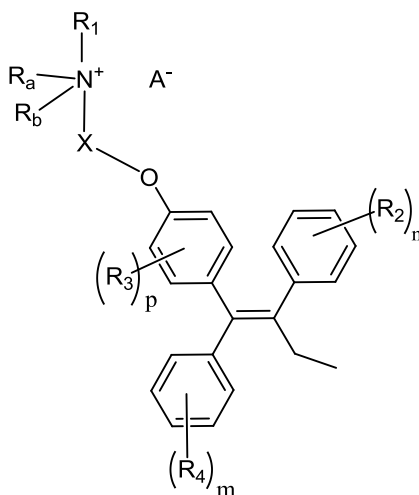
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho compuesto es de fórmula (II):



(II)

5

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Y es un grupo amonio y se representa por la fórmula general (III):



(III)

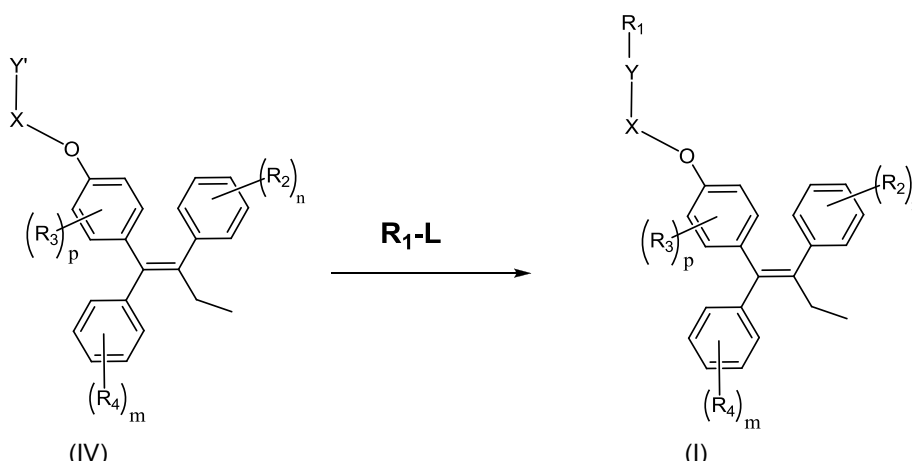
10

donde: X, R₁, R₂, R₃, R₄, n, m y p se han descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

15 R_a y R_b representan, de manera independiente, un grupo alquilo (C₁-C₁₀); y

A⁻ representa un anión.

11. Compuesto según la reivindicación 10, donde el anión es un ión haluro o sulfato.
- 20 12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde R_a o R_b representan, de manera independiente, un grupo alquilo (C₁-C₃).
13. Compuesto según la reivindicación anterior, donde R_a o R_b son un grupo metilo.
- 25 14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde R₁ es un fluoróforo unido al grupo amonio mediante un grupo alquilo (C₁-C₃).
15. Procedimiento de obtención del compuesto (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la reacción de un precursor de fórmula general (IV) con R₁-L:



donde: X, R₁, R₂, R₃, R₄, n, m y p se han descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; Y es un grupo amino, tiol o éter, Y' es un grupo NH, OH o SH y L es un grupo saliente.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

16. Procedimiento según la reivindicación 15, donde L es Cl, Br u OMs.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, caracterizado porque, cuando X es un grupo CH₂-CH₂, Y es un grupo amino, y R₂, R₃ y R₄ son hidrógeno, el precursor es el N-desmetiltamoxifeno.

18. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde el N-desmetiltamoxifeno se obtiene mediante la desmetilación del tamoxifeno por tratamiento con alquil cloroformatos.

19. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, que además comprende otro agente antitumoral.

21. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, donde el compuesto de fórmula general (I) está en una cantidad de entre 0,01 mg/kg/día a 10 mg/kg/día.

22. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la identificación y evaluación de dianas moleculares del tamoxifeno distintas a los receptores de estrógenos.

23. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la elaboración de una composición farmacéutica.

24. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades tratables o prevenibles a través de su actividad antiestrogénica que se seleccionan de la lista que comprende: cáncer, osteoporosis, infertilidad masculina (oligospermia), ginecomastia, infertilidad femenina, condición fibroquística de mama o hipercolesterolemia.

25. Uso según la reivindicación 24, donde el cáncer es un cáncer de mama.

26. Composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un disolvente orgánico no polar.

27. Composición según la reivindicación anterior, donde el disolvente orgánico es un alcohol, dimetilsulfóxido, lípido graso, cetona o cualquiera de sus combinaciones.

28. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, donde el compuesto de fórmula (I) se encuentra en una concentración de entre 1 μM a 50 mM con respecto a la composición final.

29. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 o del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, como pigmento láser.

30. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 o del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la fabricación de un láser.

31. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 o del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, como resonador óptico.
- 5 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para aplicaciones en optoelectrónica, optofluidica, óptica, medicina u oncología.
33. Uso según cualquier de las reivindicaciones 29 a 31, para aplicaciones en metodologías basadas en FRET o fotoactivación por medios láser.
- 10 34. Dispositivo láser que comprende el compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28.

**Espectro de Fluorescencia del FLTX1
(10 mM en metanol)**

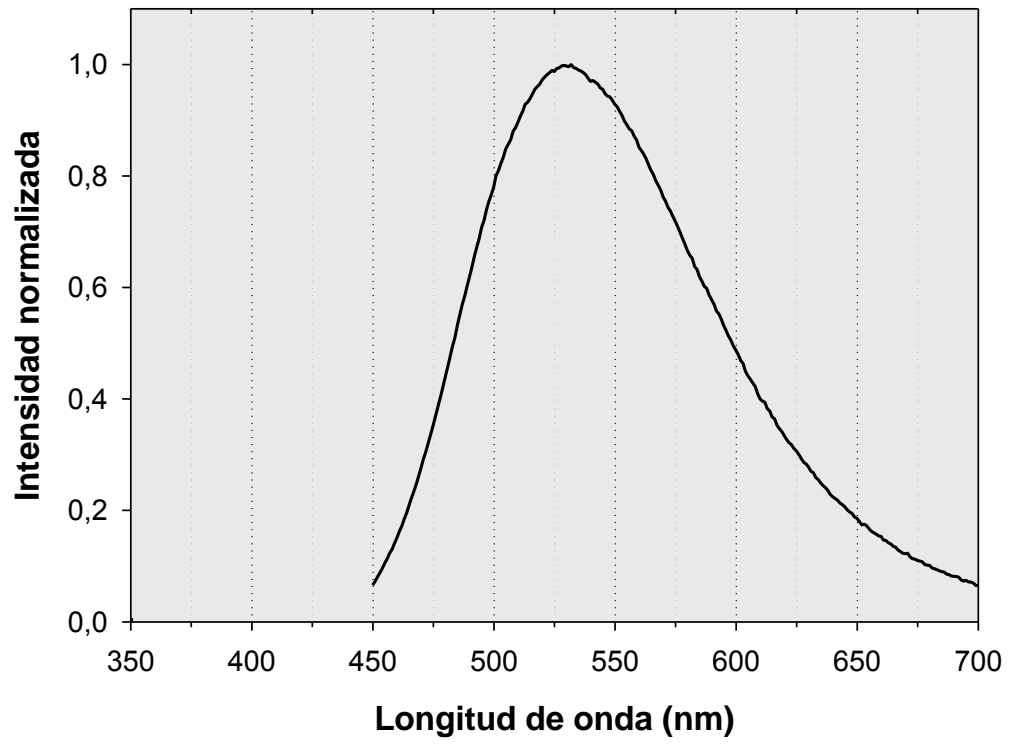


Figura 1A

B) Condiciones permeabilizantes

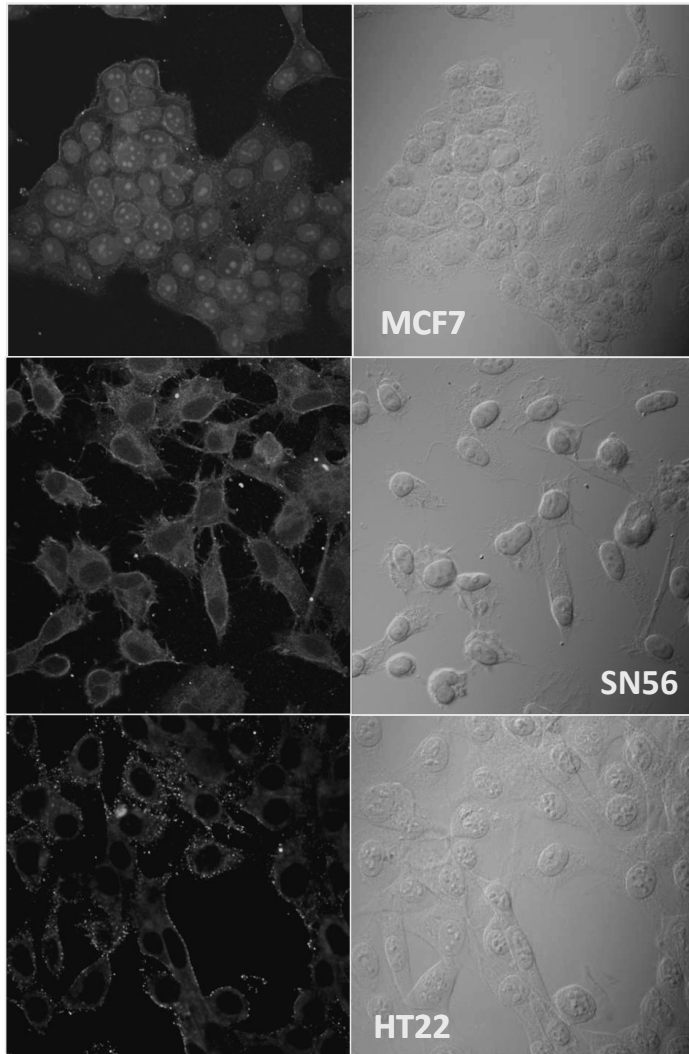


Figura 1B

C) Condiciones no permeabilizantes

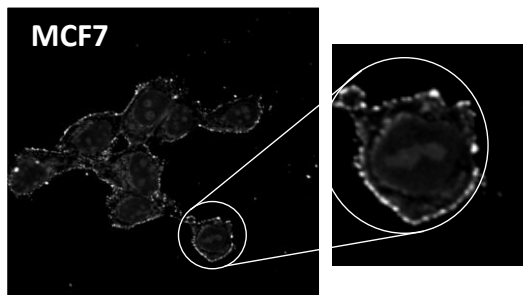


Figura 1C

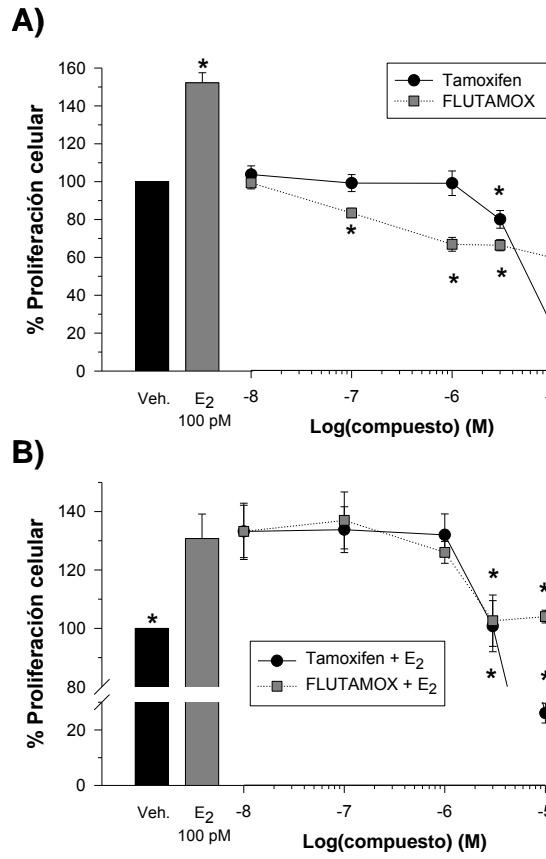


Figura 2

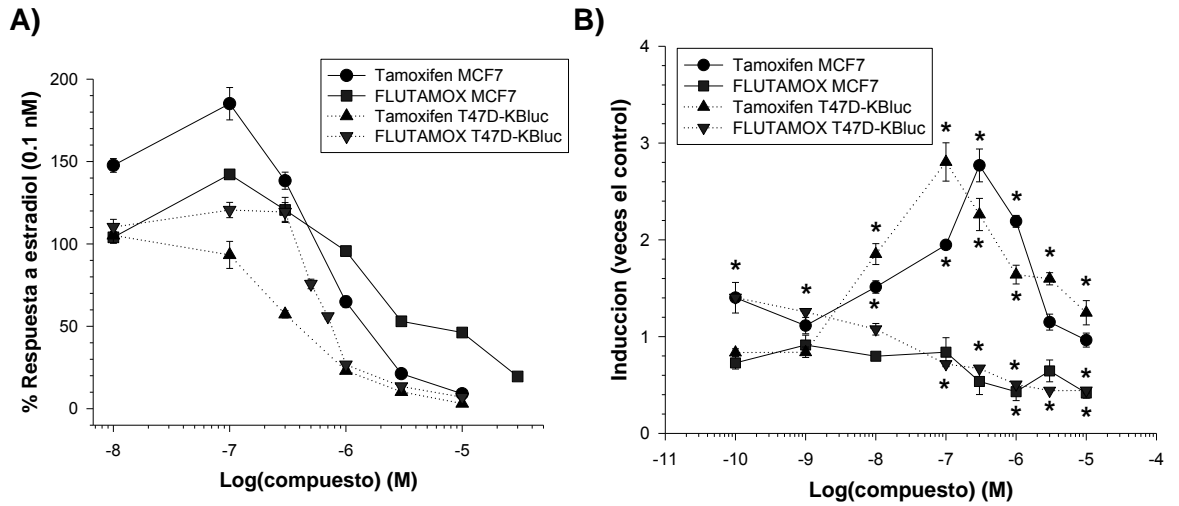


Figura 3

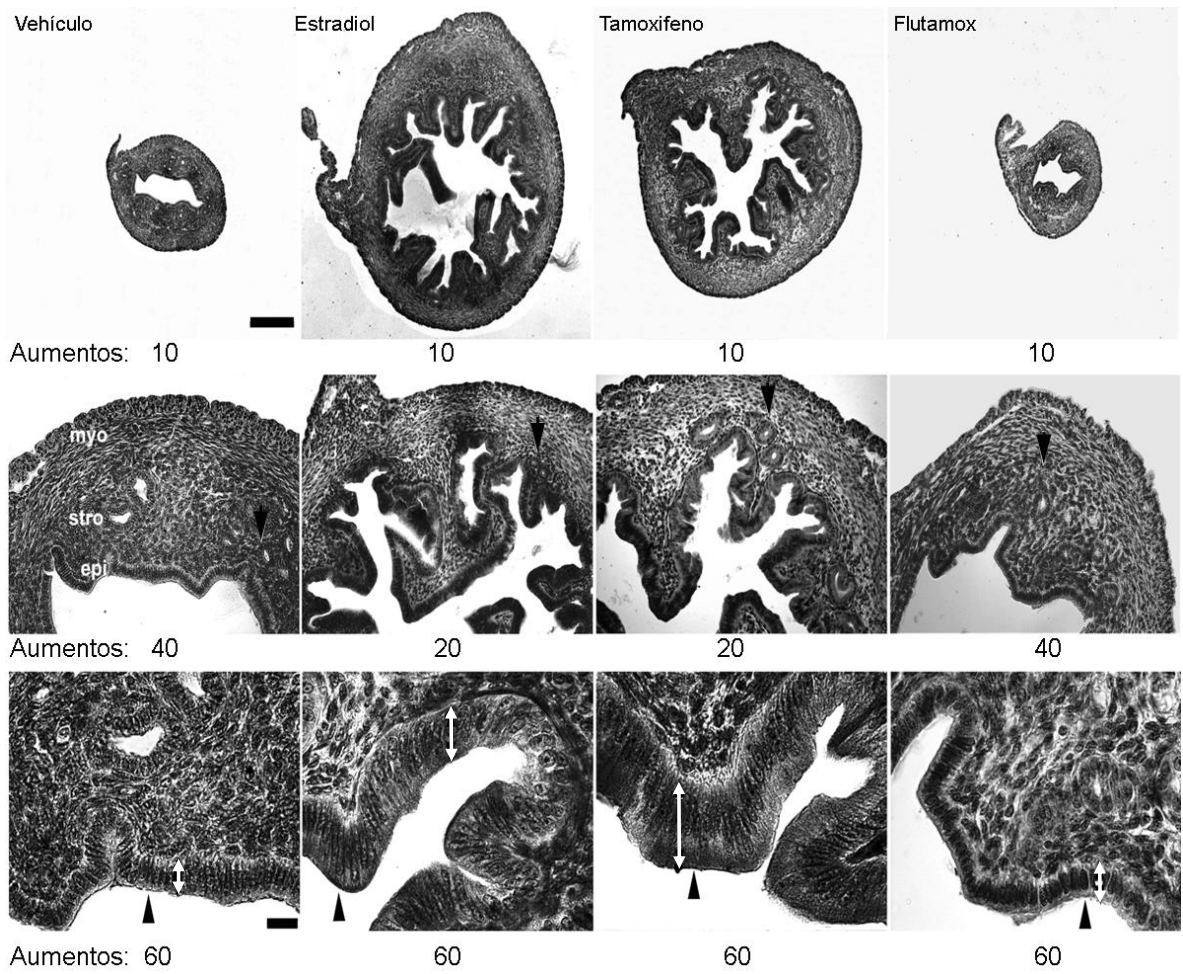


Figura 4

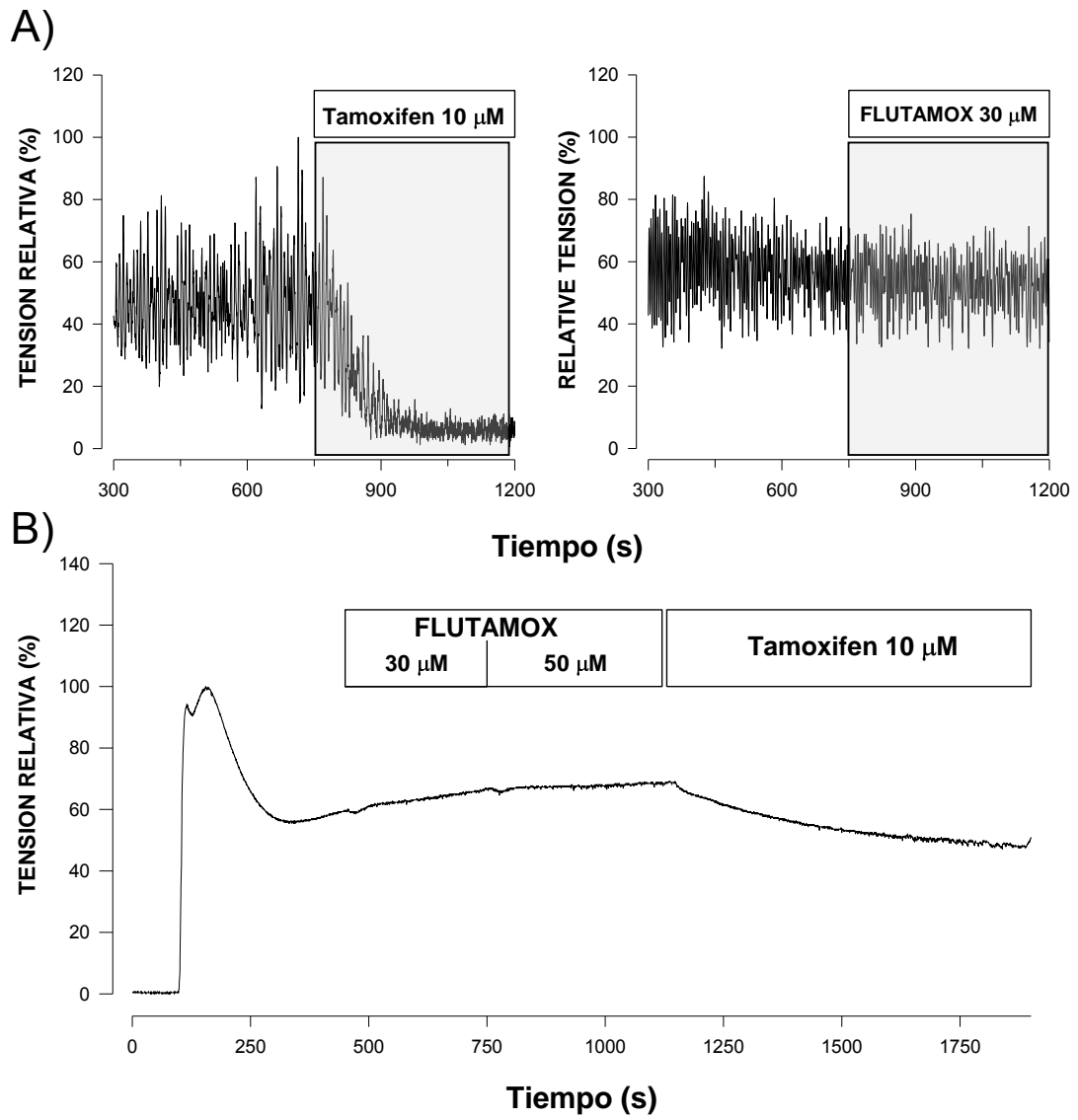


Figura 5

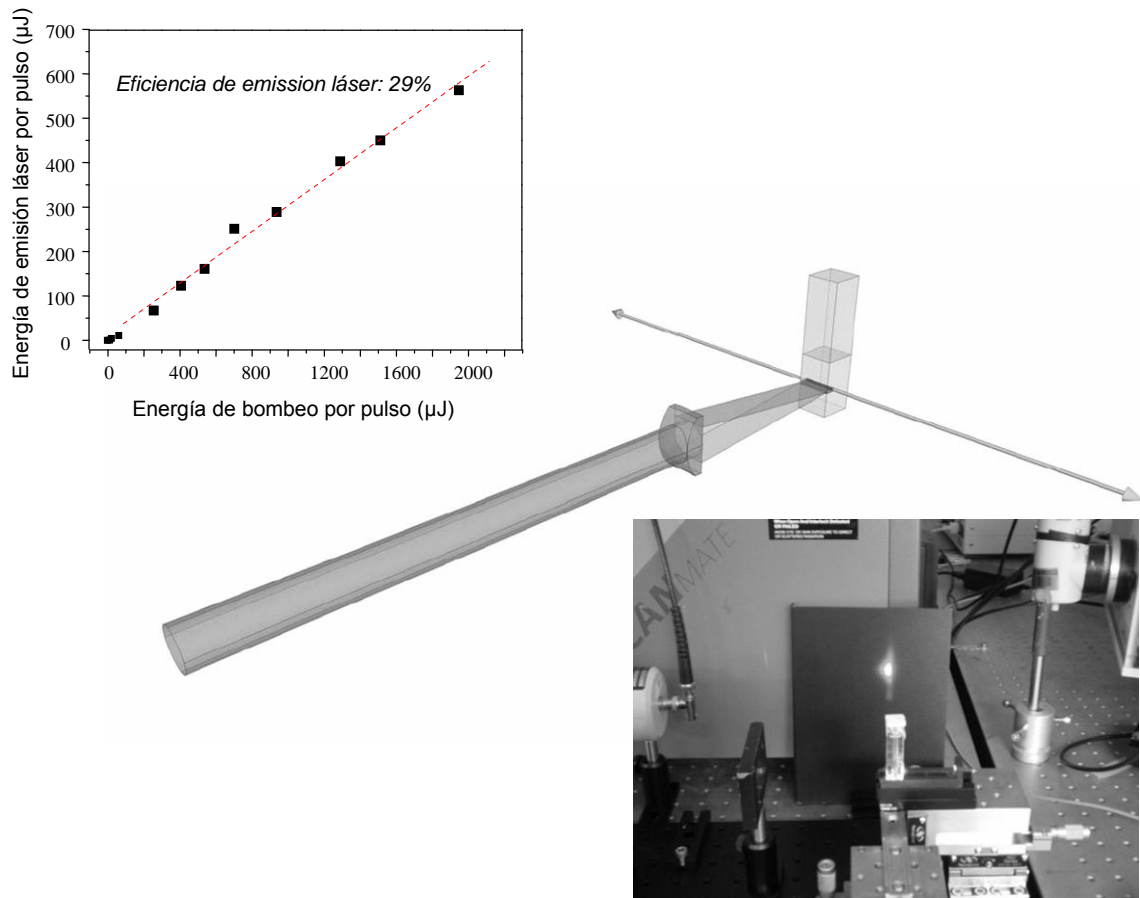


Figura 6

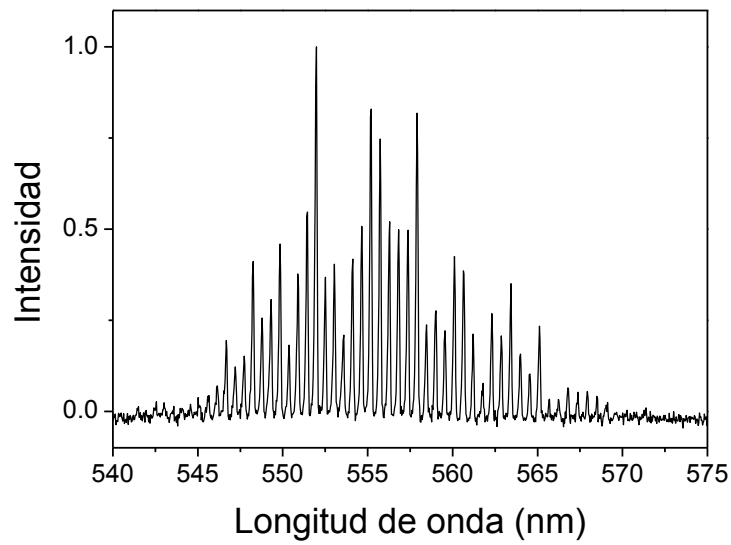


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230670

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C217/74** (2006.01)
A61K31/138 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	E L RICKERT et al., Bioconjugate Chemistry 2010, vol 21, págs 903-910. "Synthesis and characterization of fluorescent 4-hydroxytamoxifen conjugates with unique antiestrogenic properties", resumen; esquema 2.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.09.2013

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	E L RICKERT et al., Bioconjugate Chemistry 2010, vol 21, págs 903-910. "Synthesis and characterization of fluorescent 4-hydroxytamoxifen conjugates with unique antiestrogenic properties", resumen; esquema 2.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a derivados de tamoxifeno que contienen un grupo fluoróforo de fórmula general (I) de la reivindicación 1, más concretamente a los compuestos de fórmulas (II), en el que el conjugado se forma con NBD, y (III), ver reivindicaciones 2-14, así como al procedimiento para su obtención (reivindicaciones 15-18), la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) (reivindicaciones 19-21) y su uso para el tratamiento y/o prevención de enfermedades estrógeno- dependientes, por ejemplo cáncer de mama (reivindicaciones 22-25); también se reivindica el uso de un compuesto de fórmula (I) en un disolvente orgánico como pigmento láser en métodos analíticos basados en fotoactivación por láser (reivindicaciones 26-34).

El documento D1 divulga, ver esquema 2 de D1, conjugados fluorescentes de 4-OH-tamoxifeno en los que el grupo fluoróforo es carboxifluoresceína, BODIPY o AlexaFluor, su actividad antiestrogénica y su utilidad en el tratamiento de cáncer de mama (ver resumen y página 904 párrafo tercero). Los derivados fluorescentes que se describen en la solicitud no se han encontrado divulgados anteriormente por lo que se consideran nuevos, por otra parte la invención se considera inventiva pues para un técnico en la materia no sería evidente deducir del estado de la técnica la actividad frente a estrógenos de los compuestos de fórmula (I) sin realizar la experimentación que le permita disponer de los datos biológicos de dichos compuestos.

En consecuencia, se considera que la invención descrita en la solicitud cumple las condiciones de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.