



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 332 857**

② Número de solicitud: 200801297

⑤ Int. Cl.:  
**C07D 219/06** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **22.04.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2010**

Fecha de la concesión: **10.06.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.06.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**24.06.2010**

⑰ Titular/es: **Universidad de La Laguna**  
**OTRI Edificio Central**  
**c/ Delgado Barreto, s/n**  
**38200 La Laguna, Tenerife, ES**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

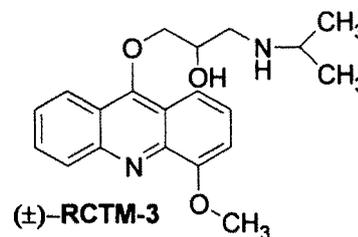
⑱ Inventor/es: **Borges Jurado, Ricardo;**  
**Beltrán Baute, Beatriz;**  
**Machado Ponce, José D.;**  
**Carrillo Fumero, Romen;**  
**Suárez Montesinos, Mónica;**  
**Martín García, Víctor y**  
**Martín Ruiz, Tomás**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Betabloqueante fluorescente (+/-)-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo  $\beta$ .**

㉑ Resumen:

Betabloqueante fluorescente (+/-)-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo  $\beta$  que corresponde a la estructura química del propanolol sustituyéndose el anillo 1-naftol por el 9-hydroxy-4-methoxyacridine. El compuesto resultante es una base débil con una liposolubilidad elevada y una estructura que lo hace fuertemente fluorescente y estable químicamente. Además presenta una eficiencia cuántica lumínica muy alta. Es un marcador de organelas secretoras muy eficiente para su uso en microscopía de epifluorescencia estándar. Su enorme eficiencia cuántica hace posible obtener imágenes de gran calidad con los láseres habituales en microscopía confocal o de onda evanescente.



ES 2 332 857 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Betabloqueante fluorescente (+/-)-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo  $\beta$ .

5 **Sector de la técnica**

Biomedicina, farmacéutica.

**Introducción**

10

Los betabloqueantes son medicamentos utilizados para disminuir la presión arterial, reducir los trastornos del ritmo cardíaco y ralentizar el corazón. Como su nombre indica, “bloquean” la acción estimulante de moléculas presentes de forma natural en el cuerpo como la adrenalina, ocupando en su lugar su zona de acción, los receptores “beta” (1).

15

Los betabloqueantes se distinguen según si su eliminación se realiza por el hígado o los riñones, y según el tipo de receptores beta en los que se fijan: los receptores beta 1 predominan en los tejidos cardíacos y el riñón, los beta 2 en los vasos y los bronquios. Estos receptores reconocen específicamente ciertas moléculas denominadas catecolaminas, como la adrenalina o la noradrenalina, que estimulan el aparato cardiovascular, la respiración y el metabolismo. Al bloquear la acción de estas catecolaminas, los betabloqueantes pueden tratar la hipertensión, la taquicardia y la insuficiencia cardíaca crónica, así como la migraña y el glaucoma (en forma de colirio). Pueden tener efectos secundarios: trastornos cardíacos, constricción de los bronquios e hipoglucemias (1).

20

25

Los fármacos bloqueantes de los receptores beta-adrenérgicos se acumulan en el interior de las vesículas secretoras de las neuronas simpáticas (2,3). Probablemente sea este su mecanismo de acción hipotensor. Sin embargo, estos compuestos no se han podido visualizar debido a que sólo son fluorescentes en el ultravioleta lejano. A esas longitudes de onda muchos componentes celulares también lo son.

**Referencias**

30

1- **Goodman LS, Gilman A, Bruton LL, et al.** The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; 2006.

35

2- **Boksa P.** Studies on the uptake and release of propranolol and the effects of propranolol on catecholamines in cultures of bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol.* 1986; 35(5):805-815.

3- **Bagwell EE, Webb JG, Walle T, et al.** Stereoselective uptake of atenolol into storage granules isolated from PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 249(2):476-482.

**Estado de la técnica**

40

Son conocidos métodos y composiciones como el descrito en el documento US2004137611 donde se utiliza la emisión luminosa para monitorizar el comportamiento celular.

45

Sin embargo, no existe, en nuestro conocimiento ningún beta-bloqueante fluorescente en el ultravioleta cercano ni en el visible, circunstancia que cumple el RCTM-3 (figura 2). Entendemos que el compuesto ( $\pm$ )-RCTM-3 es novedoso tanto en su estructura, su aplicación y la descripción del mecanismo de acción de esta familia farmacológica.

50

El RCTM-3 además, por sus características físico-químicas, es captado por las vesículas secretoras constituyendo un excelente marcador fluorescente de las mismas. Esta circunstancia puede ser utilizada para la monitorización de la secreción por métodos fluorescentes, para la localización de beta-bloqueantes en tejidos y en sus fracciones y en general para el seguimiento de los mismos. Las propiedades fluorescentes servirían para estudios de fijación de fármacos eliminando la necesidad de utilizar compuestos radiactivos.

**Descripción de la invención**

55

La estructura química y el método de síntesis de muestran en la figura 1. Este compuesto está relacionado con la estructura química del propranolol sustituyéndose el anillo de 1-naftol por el 9-hydroxy-4-methoxyacridine (Aldrich). El compuesto resultante es una base débil con una liposolubilidad elevada y una estructura que lo hace fuertemente fluorescente y estable químicamente (Figura 1).

60

El ( $\pm$ )-RCTM-3 tiene acciones  $\beta$ -bloqueantes no selectivas ( $\beta_{1-3}$ ). La potencia bloqueadora  $\beta_1$  es algo inferior ( $IC_{50}=18 \mu M$ ) (figura 3) al de otros fármacos comerciales pero se acumula en las vesículas secretoras con enorme afinidad. La figura 3 muestra que la frecuencia cardíaca espontánea ( $240 \pm 10$  l.p.m.) se incrementó notablemente con 300 nM de adrenalina ( $342 \pm 12$  l.p.m.). El  $\pm$ RCTM-3 produjo una inhibición concentración dependiente con una  $IC_{50}$  de 18  $\mu M$ . Este efecto es reversible si se mantiene la adrenalina y se elimina el RCTM-3 del medio.

65

Además, el RTCM-3 presenta una alta eficiencia cuántica lumínica muy alta 200 veces labetalol y 20 veces quinacrina. Esta acumulación selectiva hace a las vesículas muy brillantes cuando se iluminan células con luz de  $\lambda$  424

nm. Es un marcador de organelas secretoras muy eficiente para su uso en microscopía de epifluorescencia estándar. Su enorme eficiencia cuántica hace posible obtener imágenes de gran calidad con los láseres habituales en microscopía confocal o de onda evanescente cuyas líneas espectrales de excitación son más altas ( $\lambda$  458 nm) y donde sólo se excita el 2% del total. Se observa la co-localización del RCTM-3 con gránulos cromafines bovinos que sobreexpresan cromogranina A de ratón marcada con quimera con la variante mejorada de la proteína verde fluorescente de medusa (EGFP). Las imágenes muestran una célula cromafín transfectada e incubada con el fármaco, tomando fotografías con un microscopio de onda evanescente Zeiss 200. En verde CgA-EGFP y en azul el RCTM-3. Sólo son visibles las estructuras fluorescentes situadas a menos de 150 nm de la membrana celular. Igualmente, al co-liberarse con los neurotransmisores puede ser utilizado para la detección (por la medida directa de la fluorescencia) de la actividad secretora celular.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Estrategia de síntesis del ( $\pm$ )-RCTM-3

Figura 2. Espectros de fluorescencia del RCTM-3. En el panel superior se muestra es el de excitación (emisión fijada a 485 nm) y en el inferior el de emisión (excitado a 424 nm). El recuadro en la gráfica superior muestra la banda de excitación de la línea de láser utilizada en la figura 4, cuya eficiencia sería de sólo 2-5%.

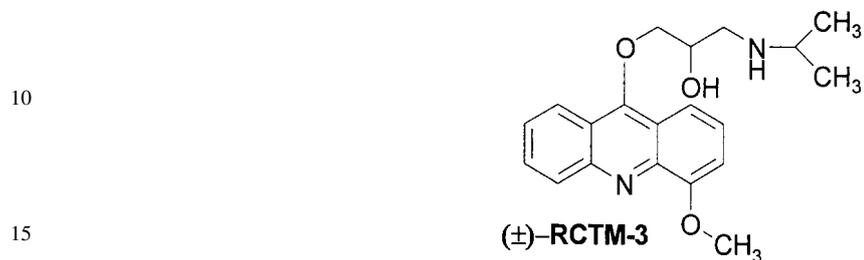
Figura 3. Inhibición de la frecuencia cardiaca en aurícula de rata pre-estimulada con adrenalina. Los datos muestra media  $\pm$  error estándar.

### Modos de realización de la invención

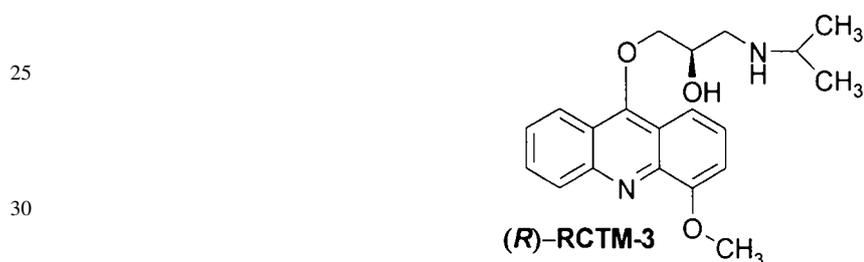
En la figura 1 se muestra la estrategia de síntesis. En la figura 2 se muestran los espectros de excitación y emisión del ( $\pm$ )-RCTM-3. El estudio se llevó a cabo en cubetas de cuarzo en un espectrofluorímetro Varian Eclipse. Las propiedades fluorescentes de la molécula no se ven influenciadas por el pH del medio. Los recuadros indican la línea de excitación del láser y de corte del dicroico en excitación y en emisión respectivamente.

## REIVINDICACIONES

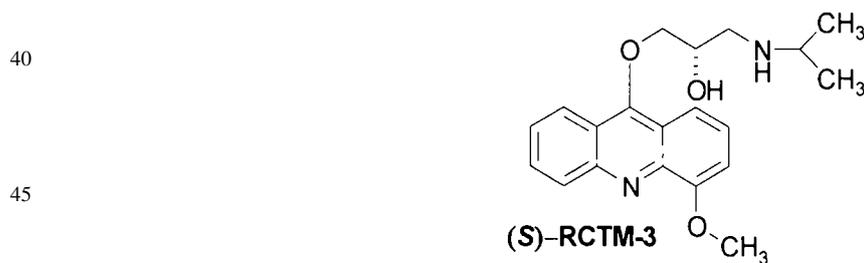
5 1. Betabloqueante fluorescente ( $\pm$ )-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo Beta que corresponde a la estructura química del propranolol sustituyéndose el anillo de 1-naftol por el 9-hydroxy-4-methoxyacridine según:



20 2. Forma enantiomérica (*R*)-RCTM-3 del betabloqueante fluorescente ( $\pm$ )-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo Beta que corresponde a la estructura química del propranolol sustituyéndose el anillo de 1-naftol por el 9-hydroxy-4-methoxyacridine según:



35 3. Forma enantiomérica (*S*)-RCTM-3 del betabloqueante fluorescente ( $\pm$ )-RCTM-3 de los receptores adrenérgicos de tipo Beta que corresponde a la estructura química del propranolol sustituyéndose el anillo de 1-naftol por el 9-hydroxy-4-methoxyacridine según:



50

55

60

65

Figural

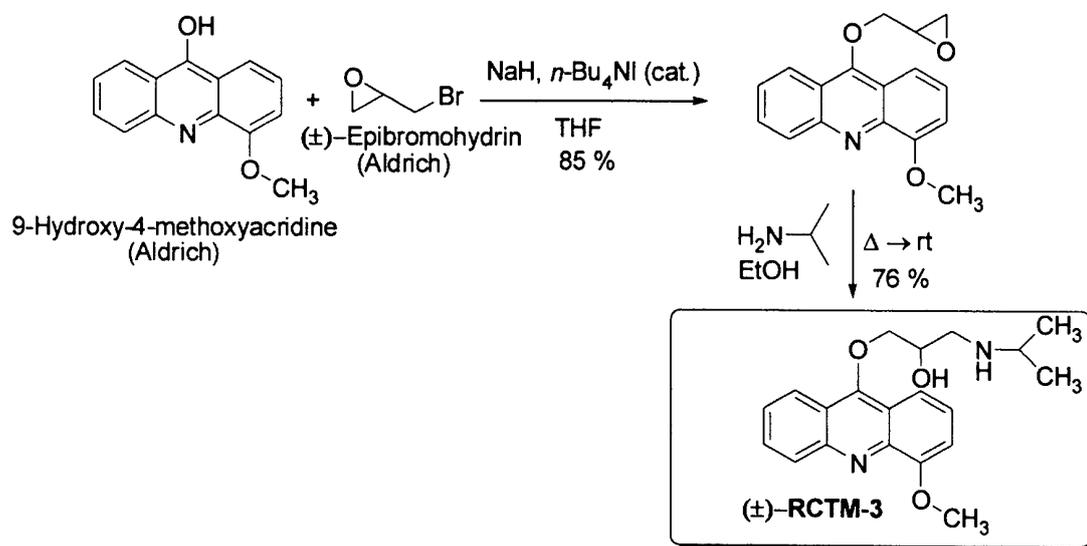


Figura 2

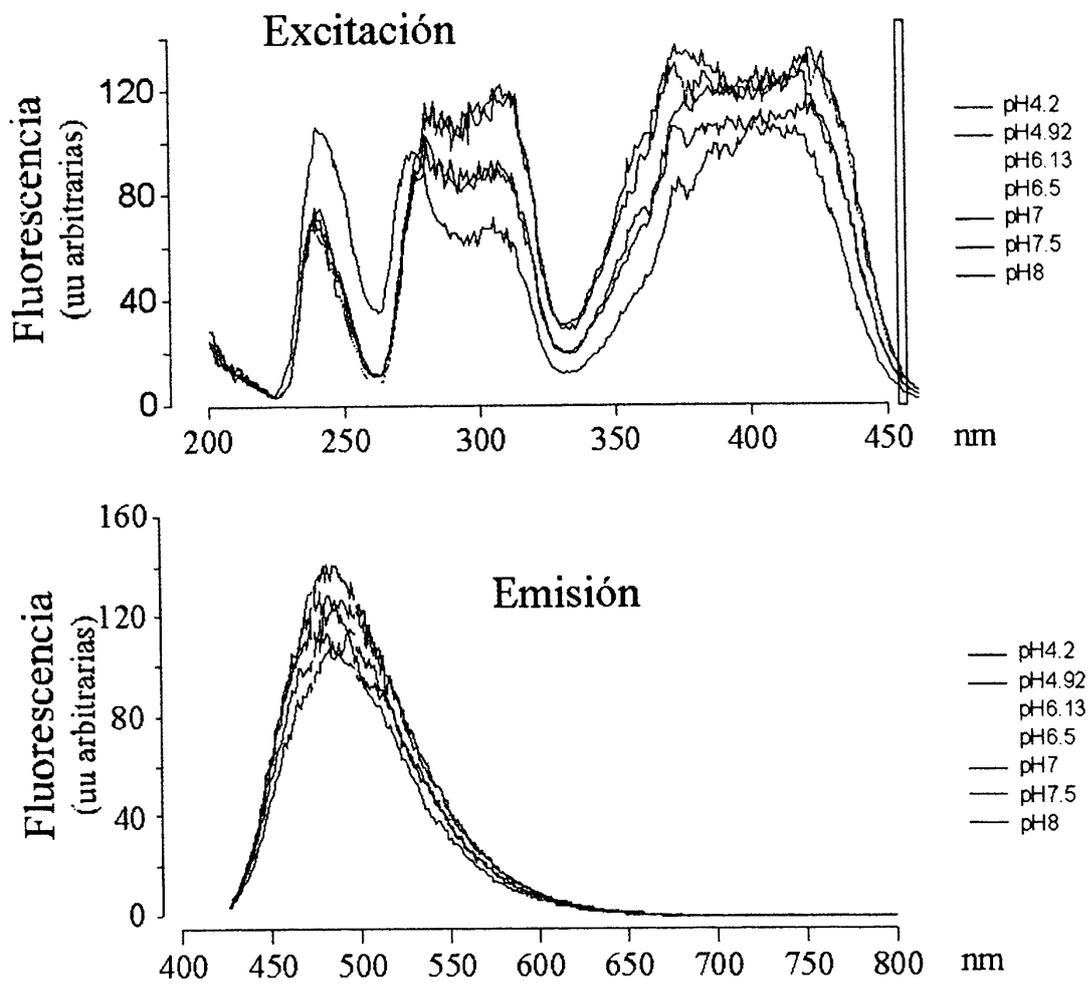
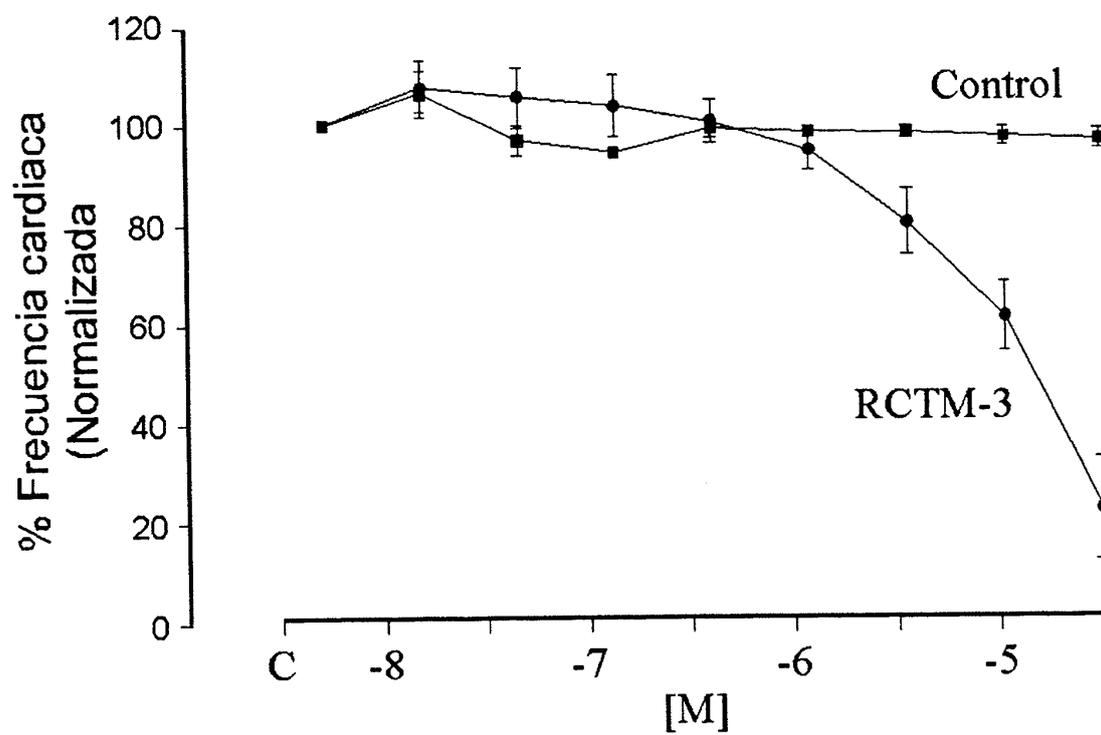


Figura 3





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 857

② Nº de solicitud: 200801297

③ Fecha de presentación de la solicitud: 22.04.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07D 219/06 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | P ASTHANA et al., Indian Journal of Chemistry 1987, vol. 26B, págs. 330-334. "Synthesis of 9-substituted-oxy acridine & 1,2,3,4-tetrahydroacridine derivatives as potential biodynamic agents", páginas 331-332, compuesto 7, esquema 1. | 1-3                        |
| A         | EP 1088818 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE) 04.04.2001, párrafo [0013], página 4; reivindicaciones 1,4,5.   | 1-3                        |

#### 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

18.01.2010

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

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

C07D

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.01.2010

**Declaración**

|  |                      |           |
|--|----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>             | Reivindicaciones 1-3 | <b>SÍ</b> |
|  | Reivindicaciones     | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-3 | <b>SÍ</b> |
|  | Reivindicaciones     | <b>NO</b> |

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 ha sido publicada.

**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       | Indian Journal of Chemistry 1987, vol 26B, pp 330-334 | 1987              |
| D02       | EP 1088818  | 04.04.2001        |

**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 al compuesto de la reivindicación 1 y sus enantiómeros (reivindicaciones 2 y 3) y su aplicación como betabloqueante fluorescente.

El documento D1 divulga derivados de acridina sustituidos en la posición 9, el compuesto 7 se considera el más próximo al compuesto de la reivindicación 1, no se mencionan propiedades fluorescentes del compuesto 7. El documento D2 divulga compuestos de fórmula I próximos estructuralmente al compuesto de la reivindicación 1 de la solicitud, concretamente los compuestos que se relacionan en el párrafo [0013] de D2, no se mencionan propiedades fluorescentes de estos compuestos.

No se ha encontrado descrito el compuesto de la reivindicación 1 de la solicitud ni datos que permitan suponer que la utilización del sustituyente 4-metoxiacridina en la estructura del propanolol sea favorable para obtener betabloqueantes fluorescentes. Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-3 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva, de acuerdo con los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.