

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2013/164513 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
7 de noviembre de 2013 (07.11.2013) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*C07D 271/12* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2013/070280
- (22) Fecha de presentación internacional:  
6 de mayo de 2013 (06.05.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201230670 4 de mayo de 2012 (04.05.2012) ES
- (71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA** [ES/ES]; OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano nº 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **DÍAZ GONZÁLEZ, Mario**; Universidad de La Laguna, OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **MARRERO ALONSO, Jorge Nicolas**; Universidad de La Laguna, OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **GÓMEZ SOUTULLO, Tomás**; Universidad de La Laguna, OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **MARÍN CRUZADO, Raquel**; Universidad de La Laguna, OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **LAHOZ ZAMARRO, Fernando**; Universidad de La Laguna, OTRI. Edificio Central Universidad., C/ Delgado, Barreto, s/n, E-38201 La Laguna (Sta. Cruz Tenerife) (ES). **BOTO CASTRO, Alicia**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/ Serrano nº 117, E-28006 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
  - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: TAMOXIFEN DERIVATIVES, METHOD FOR OBTAINING SAME AND USE THEREOF

(54) Título : DERIVADOS DEL TAMOXIFENO, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to derivatives of tamoxifen and to the uses thereof as a pharmaceutical composition in the treatment of diseases associated with activation of estrogen signaling, as a tool for the identification of target molecules of tamoxifen, or as a molecular laser emitter. In addition, the invention relates to the method for the production of said compounds and to compositions comprising same.

(57) Resumen: 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 láser molecular. Además, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de estos compuestos y a composiciones que los comprenden.



WO 2013/164513 A1

## DERIVADOS DEL TAMOXIFENO, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

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.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

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].

30

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.

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.

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.

30

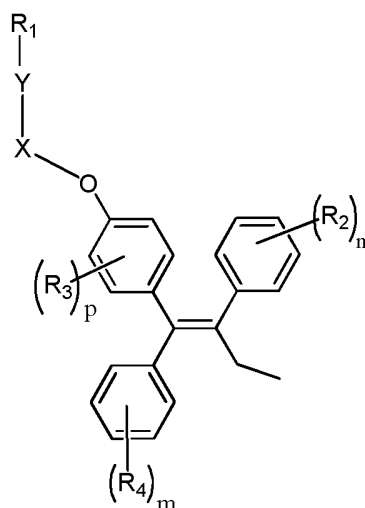
Por tanto, existe la necesidad de sintetizar compuestos con actividad similar al tamoxifeno y que posean un efecto mínimo sobre la afinidad del derivado por el

receptor de estrógenos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### 5 Breve descripción de la invención

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



10

(I)

o cualquiera de sus sales, donde:

X representa un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ) o acilo:

15 Y representa un grupo que se selecciona de la lista que comprende amino, amonio, tiol, éter, alquilo( $C_1-C_3$ ), alquenilo( $C_2-C_3$ ) y alquinilo( $C_2-C_3$ );

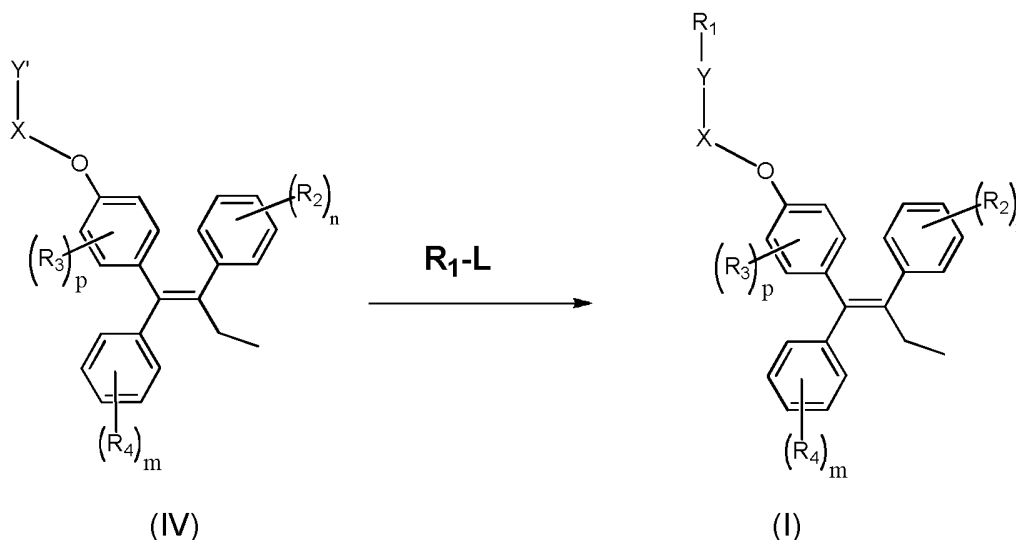
R<sub>1</sub> representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ ); preferiblemente R<sub>1</sub> está unido directamente al grupo Y.

20 R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>, representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH, NH<sub>2</sub>, 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.

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 R<sub>1</sub>-L:



donde: X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, n, m y p se han descrito anteriormente; Y' es un grupo amino, OH o SH y L es un grupo saliente.

10

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

15

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).

20

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.

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**

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.

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 estrogénicidad, 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.

5

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).

10

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).

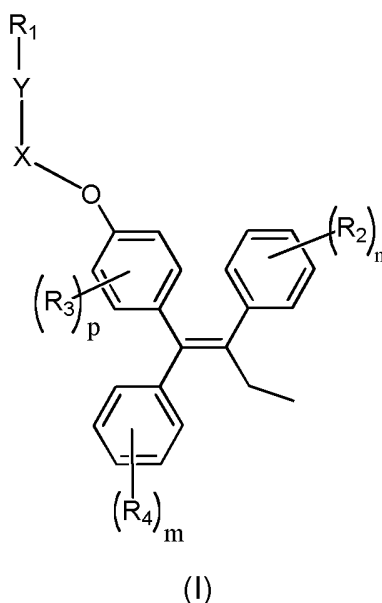
15

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.

20

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

25



o cualquiera de sus sales, donde:

5 X representa un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 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(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), alquenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>) y alquinilo(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>); preferiblemente es un grupo amino o amonio;

10 R<sub>1</sub> representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>); preferiblemente R<sub>1</sub> se une directamente al grupo Y;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>, representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH, NH<sub>2</sub>, SH, O-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), O-acilo(-OCO-R'), NH-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), NH-acilo(-NHCO-R''), S-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), 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.

20

En una realización preferida del compuesto de la invención, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son H.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, R<sub>4</sub> es H o OH.



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

5 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 1 a 3 átomos de carbono. Aún más preferiblemente cuando X es un grupo alquilo es  $-CH_2-CH_2-$ .

10

Por "alqueno" 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-propeno, alilo, isopropeno, etc.

15

El término "alquino" 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, propino, etc.

20 Por "amino" se refiere a  $-NR_a-$ , donde  $R_a$  es un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), tal y como se ha descrito anteriormente. Más preferiblemente  $R_a$  es un grupo metilo.

Por "amonio" se refiere al grupo  $-^+NR_aR_b-$ , donde  $R_a$  y  $R_b$  representan, de manera independiente, un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), tal y como se ha descrito anteriormente. Más preferiblemente son un grupo metilo.

25

Por "O-alquilo" se refiere a un grupo que contiene un átomo oxígeno unido a un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), definido anteriormente.

30 Por "O-acilo" se refiere al grupo  $-OCO-R'$ , donde  $R'$  es un hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), definido anteriormente.

Por "NH-alquilo" se refiere a un grupo -NH- unido a un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), 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 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), tal y como se ha definido anteriormente.

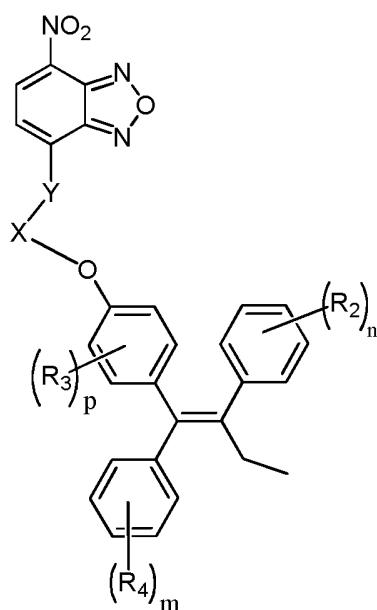
Por "S-alquilo" se refiere a un grupo que contiene un átomo de azufre unido a un grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), tal y como se ha definido anteriormente.

Por "acilo" se entiende el grupo -CO-R'", donde R'" es un hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), tal y como se ha definido anteriormente.

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.

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 4-*N,N*-dimetilaminoftalimido (o 4-*N,N*-Dimetilamino-1,8-naftalimido).

En una realización más preferida del compuesto de la invención, R<sub>1</sub> es NBD, dando lugar a la fórmula general (Ia):

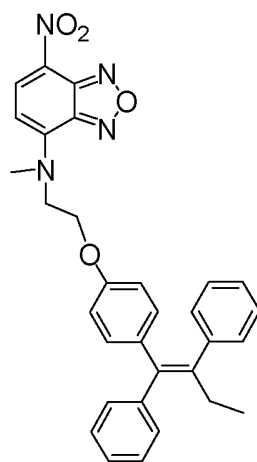


(Ia)

Donde: X, Y, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, n, m y p, son tal y como se han descrito anteriormente.

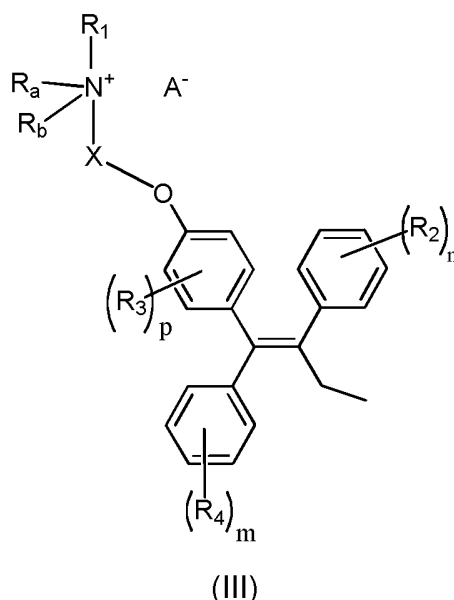
- 5 En una realización aún más preferida del compuesto de la invención, Y es un grupo amino y más preferiblemente un grupo -N(CH<sub>3</sub>)-, aún más preferiblemente R<sub>1</sub> es NBD, más preferiblemente X es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- y aún más preferiblemente es el compuesto de fórmula (II) denominado N-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)desmetiltamoxifeno (FLTX1 ó FLUTAMOX):

10



(II)

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



5

donde: X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, n, m y p, son tal y como se han descrito anteriormente;

R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> representan, de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), más preferiblemente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), aún más preferiblemente un grupo metilo; y

A<sup>-</sup> 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.

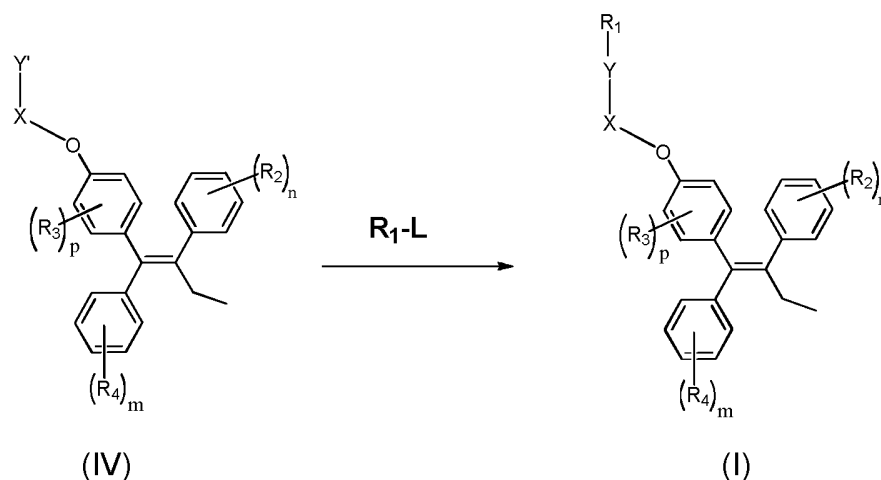
15

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

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 R<sub>1</sub>-L:

20

12



donde: X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, n, m y p se han descrito anteriormente; Y' es un grupo amino(NH), OH o SH y L es un grupo saliente.

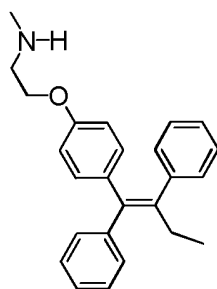
5

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 R<sub>1</sub>. 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.

10

En una realización preferida del procedimiento de la invención, cuando X es un grupo CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, Y es un grupo amino y R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 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:

15



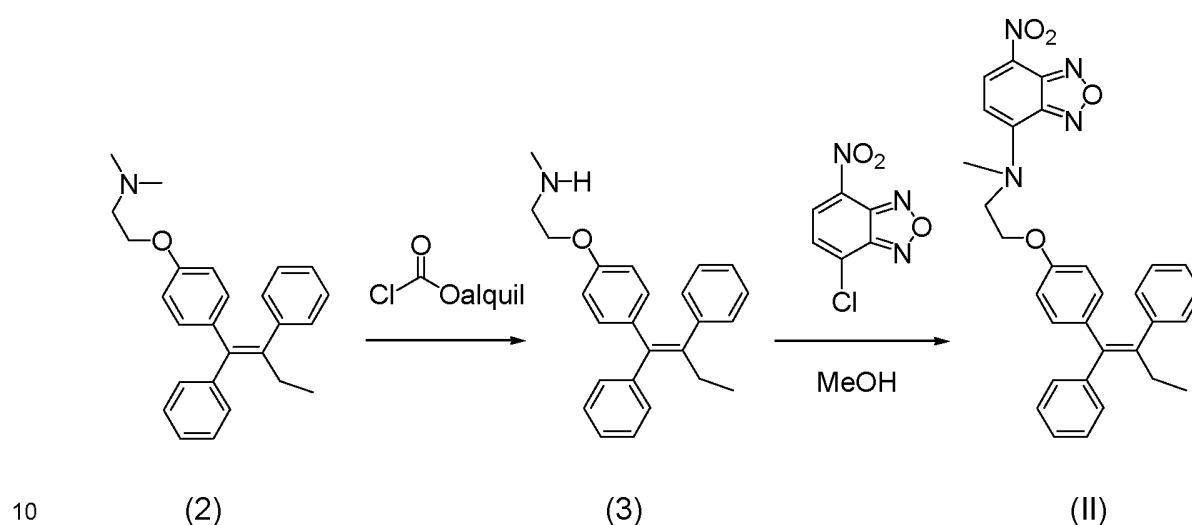
En otra realización preferida, el N-desmetiltamoxifeno se obtiene mediante la desmetilación del tamoxifeno por tratamiento con alquil clorofornatos.

20

Por "alquil cloroformatos" se refiere al compuesto Cl-C(O)O-alquilo, donde el grupo alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) está definido anteriormente.

Un procedimiento particular de la presente invención, útil para la obtención del compuesto (II), comprende:

- a) la desmetilación del tamoxifeno **2** por tratamiento con alquil cloroformatos para la obtención de *N*-Desmetiltamoxifeno **3**, y
- b) un tratamiento de *N*-Desmetiltamoxifeno **3** con NBD-Cl.



Por otro lado, el compuesto de la invención es de aplicación en el campo biotecnológica, en concreto en el desarrollo de bioensayos de actividad estrogénica/antiestrogénica, como herramienta molecular en la identificación subcelular de dianas moleculares del tamoxifeno ajenas a los receptores de estrógenos, en bioensayos de competición o en ensayos de bioactivación bajo el control del receptor de estrógenos. Más particularmente, como sonda en laboratorios de investigación para estudiar procesos fisiológicos de interés clínico poco conocidos, ya que la interacción habitual del tamoxifeno es con los receptores de estrógenos.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la identificación y evaluación de dianas moleculares del tamoxifeno distintas a los receptores de estrógenos, estos incluyen

transportadores y canales iónicos, así como otros lugares de unión a antiestrógenos (AEBS, antiestrogen-binding sites).

Además, el compuesto de la invención es de aplicación en el campo farmacéutico como antiestrógeno, en particular en tratamientos coadyuvantes en cáncer de mama estrógeno-dependiente, al carecer de los efectos uterotróficos, hiperplásicos, hipertróficos y del agonismo estrogénico del tamoxifeno.

Por tanto, otro 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, la composición farmacéutica puede comprender otro principio activo.

Este principio activo podría ser otro agente antitumoral, ya que en una gran parte de las terapias anticancerígenas aplicadas a pacientes se suelen utilizar una combinación de principios activos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen cualquier composición sólida (tabletas, pastillas, cápsulas, formas granuladas, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, etc.) y pueden 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.

30

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 granulaci3n h3meda o seca y pueden ser opcionalmente recubiertos por m3todos bien conocidos en la pr3ctica farmac3utica normal, particularmente con un recubrimiento ent3rico.

Las composiciones farmac3uticas tambi3n pueden ser adaptadas para la administraci3n parenteral, tal como soluciones est3riles, suspensiones o productos liofilizados en la forma farmac3utica adecuada. Excipientes adecuados, tales como agentes a granel, neutralizantes o surfactantes pueden ser mencionados.

Los compuestos o composiciones descritos en la presente invenci3n pueden ser administrados por cualquier m3todo adecuado, como infusi3n intravenosa, preparaciones orales y administraci3n intraperitoneal o intravenosa. Sin embargo, la v3a de administraci3n preferida depender3 de la condici3n del paciente. En particular, la administraci3n oral es preferida debido a la comodidad para el paciente y el car3cter cr3nico de las enfermedades que deben ser tratadas, aunque tambi3n es preferida la administraci3n mediante inyecci3n intratumoral, subcut3nea o parenteral.

En una realizaci3n preferida, la composici3n farmac3utica comprende una cantidad de entre 0,01mg/kg/d3a a 10mg/kg/d3a del compuesto de f3rmula general (I).

Otro aspecto de la presente invenci3n se refiere al uso del compuesto de la invenci3n de f3rmula general (I) para la elaboraci3n de una composici3n farmac3utica, preferiblemente para el tratamiento y/o prevenci3n de enfermedades a trav3s de su actividad antiestrog3nica, por tanto estas enfermedades son las enfermedades tratables o prevenibles a trav3s 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.

5

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.

10

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.

15

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.

20

25

30

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).

- 5 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%). Preferiblemente, el compuesto de la invención utilizado, en el rango de concentraciones entre 1  $\mu\text{M}$  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:
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 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;
  - 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.

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  
5     aceptor de energía para formación de imágenes en microscopía.

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.

10

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,  
15     acetona o cualquiera de sus combinaciones.

20

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

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.

25     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.

30

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.

5 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  
10 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:

-la administración del compuesto de la invención en células tumorales mediante  
15 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+.

20 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  
25 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **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).

5 **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.

10 **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  
15 indican diferencias significativas de  $p < 0,05$  respecto al vehículo.

**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  
20 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  
25 límites en altura del epitelio.

**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  $\text{CaCl}_2$  (B).** En A) se muestran ejemplos representativos de las  
30 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.

5

**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.

10

**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.

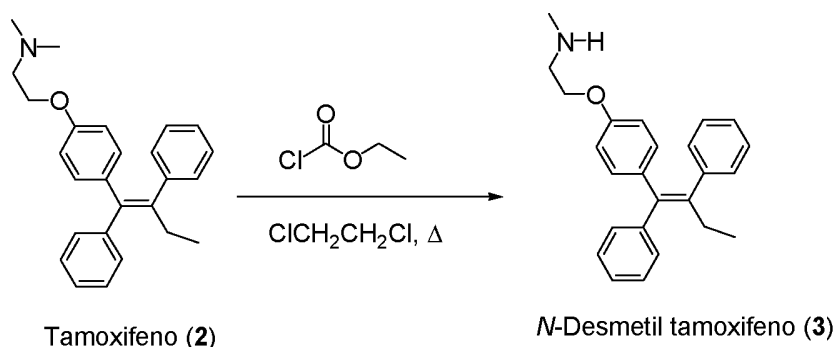
15

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

20

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

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

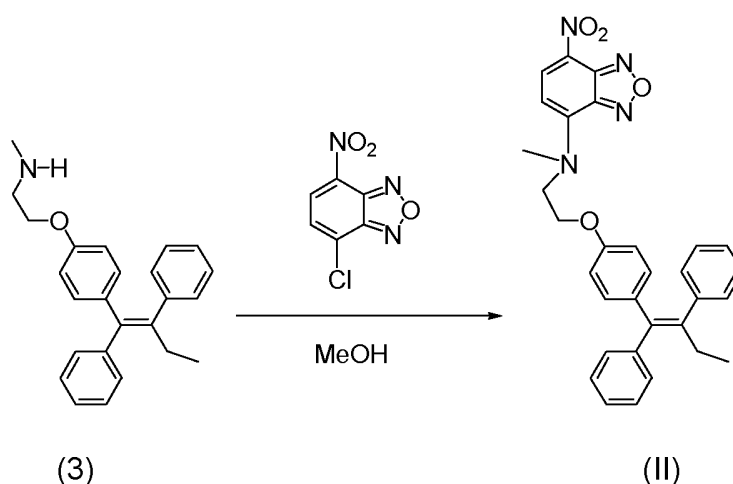


25

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.

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); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> 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*<sup>+</sup>, 64), 300 (*M*<sup>+</sup> + H – MeNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 100); HRMS *m/z* calcd para C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>NO, 357,2093; encontrada, 357,2063; calcd para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O, 300,1514; encontrada, 300,1491. Anal. Calcd para C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>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<sub>3</sub> y se extrajo con EtOAc. La

5 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); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetona-d) δ<sub>H</sub> 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),

10 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); <sup>13</sup>C NMR (125,7 MHz, acetona-d) δ<sub>C</sub> 12,8 (CH<sub>3</sub>), 29,0 (CH<sub>2</sub>), 42,0 (CH<sub>3</sub>), 54,6 (CH<sub>2</sub>), 65,7 (CH<sub>2</sub>), 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<sup>+</sup>, 100); HRMS *m/z* calcd para C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, 520,2111; encontrada, 520,2099; Anal. Calcd para C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C, 71,52; H, 5,42; N, 10,76. Encontrado: C, 71,72; H, 5,49; N, 10,76.

20

**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)**

25

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

30 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  $\mu$ M 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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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.

25

### **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  
30 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  $\mu$ M) 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 estrogénicos, pero se mantuvieron durante 4 días, tras los cuales se incorporó  
5 100 pM 17 $\beta$ -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  
10 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).

#### 15 **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  $\beta$ -galactosidasa. Paralelamente se  
20 emplearon células T47D-KBluc, transfectadas de manera estable con el gen pGL2.TATA.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  
25 del FLTX1 a las concentraciones indicadas (10 nM – 10  $\mu$ M) durante 15 horas (en el abordaje estrogénico). En el estudio de los efectos antiestrogénico, las células fueron expuestas a estas mismas concentraciones de tamoxifeno o del FLTX1 durante 8 horas, y luego incubadas con 100 pM 17 $\beta$ -estradiol en presencia del tamoxifeno o del FLTX1 durante otras 15 horas. Una vez  
30 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 antiestrogénicos muestran que el compuesto de la invención es tan poderoso como el tamoxifeno inhibiendo la actividad transcripcional (Figura 3B), con valores de IC<sub>50</sub> de alrededor de 1 µM.

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

En los bioensayos "in vivo" de actividad uterotrófica 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 antiestrogénicos, 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
<b>Vehículo</b>	155,3 0 ± <sup>Δ</sup>	140,7 7 ± <sup>Δ</sup>	12,00 4 ± 9,06 <sup>Δ</sup>	106,5 34,2 3 ± 4,13 <sup>Δ</sup>	13,69 98,63 ± <sup>Δ</sup>	0,1 5,07 ± 8	736,86 ± 79,58
<b>17β-estradiol</b> (1 µg/kg/día)	572,1 1 ± *	78,15 9 ± *	41,63 5 ± *	373,7 38,39 95,9 4 ± 4,35*	215,5 23,10 0 ± *	4,76 ± 9	571,44 ± 98,41
<b>Tamoxifeno</b> (mg/kg/día)							
0,01	220,3 7 ± <sup>Δ</sup>	33,12 4 ± <sup>Δ</sup>	219,8 31,19 176,3 24,42	43,4 7 ± 6,95 <sup>Δ</sup>	159,3 8 ± <sup>Δ</sup> 8 ± 19,03	0,5 5,04 ± 5	593,12 ± 65,16
0,1	546,1 1 ± *	62,84 5 ± *	433,8 27,05 373,8 18,92	66,3 7,04* 5 ± <sup>Δ</sup>	213,6 24,13 3 ± *	4,52 ± 2	610,67 ± 73,43
1	474,0 2 ± *	63,06 6 ± *	373,1 17,91 328,6 17,69	44,5 0 ± 5,37 <sup>Δ</sup>	132,7 16,41 2 ± <sup>Δ</sup>	0,1 4,57 ± 2	579,02 ± 38,16

**FLUTAMOX**

(mg/kg/día)

0,01	116, 25,7	113, 27,9	91,9 21,4	21,7	100, 21,6	0,1	531,2
	35 ± 5 <sup>Δ</sup>	72 ± 1 <sup>Δ</sup>	8 ± 9 <sup>Δ</sup>	4 ± 6,55 <sup>Δ</sup>	43 ± 3 <sup>Δ</sup>	4,54 ± 7	7 ± 82,18
0,1	110, 13,9	104, 16,7	88,1 12,0	15,9	89,6 18,4	0,2	520,3
	70 ± 7 <sup>Δ</sup>	09 ± 1 <sup>Δ</sup>	9 ± 6 <sup>Δ</sup>	0 ± 5,08 <sup>Δ</sup>	1 ± 9 <sup>Δ</sup>	4,44 ± 1	6 ± 94,29
1	126, 20,6	119, 25,1	99,5 20,5	19,7	127, 28,8	0,1	614,9
	35 ± 5 <sup>Δ</sup>	30 ± 1 <sup>Δ</sup>	6 ± 5 <sup>Δ</sup>	4 ± 4,93 <sup>Δ</sup>	90 ± 6 <sup>Δ</sup>	4,55 ± 4	1 ± 69,39

28

---

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  $p < 0,05$ . <sup>Δ</sup> 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
<b>Vehículo</b>	55,57 ± 3,71 <sup>Δ</sup>	48,73 ± 4,45 <sup>Δ</sup>	41,32 ± 4,10 <sup>Δ</sup>	7,41 ± 1,06 <sup>Δ</sup>	55,30 ± <sup>Δ</sup>	4,47 ± 0,17	332,2 30,2 7 ± 5
<b>Etinil estradiol (EE)</b>							
(0,5 μg/kg/día)	313,4	229,6	185,7		106,2	6,58	325,9 21,7
	3 ± 27,41*	7 ± 12,92*	3 ± 11,09*	43,94 ± 4,47*	7 ± *	3,55 ± 0,64	3 ± 8
<b>Tamoxifeno</b>							
(mg/kg/día)							
0,01	83,56 ± 6,03 <sup>Δ</sup>	75,17 ± 4,60 <sup>Δ</sup>	67,27 ± 4,72 <sup>Δ</sup>	7,90 ± 0,44 <sup>Δ</sup>	61,67 ± <sup>Δ</sup>	4,01 ± 0,13	366,9 33,5 2 ± 6
0,1	148,3 16,63*	135,5 14,75*	118,2 12,51*	2,48*	73,78 ± <sup>Δ</sup>	7,32	351,3 37,4 5 ± 0
	1 ± <sup>Δ</sup>	3 ± <sup>Δ</sup>	4 ± <sup>Δ</sup>	17,29 ± <sup>Δ</sup>	4,27 ± 0,25		

172,9	10,95*	159,2	130,9	5,45* <sup>Δ</sup>	2,31*	6,42	314,0	25,8
1	1 ± <sup>Δ</sup>	1 ± 7,62* <sup>Δ</sup>	9 ±	28,23 ± <sup>Δ</sup>	92,66 ± *	4,05 ± 0,10	2 ± 3	
208,0		198,6	156,0		3,07		295,2	
	5 ± 4,10* <sup>Δ</sup>	9 ± 3,96*	0 ± 4,78*	42,69 ± 1,15*	97,83 ± *	4,26 ± 0,09	1 ± 7,16	

**FLUTAMOX**  
(mg/kg/día)

0,01	59,94 ± 2,93 <sup>Δ</sup>	57,51 ± 4,09 <sup>Δ</sup>	50,21 ± 3,60 <sup>Δ</sup>	7,30 ± 0,92 <sup>Δ</sup>	54,06 ± <sup>Δ</sup>	4,29 ± 0,14	341,1	13,4
					1,67		7 ± 4	
0,1	60,69 ± 2,45 <sup>Δ</sup>	56,95 ± 3,32 <sup>Δ</sup>	50,84 ± 3,13 <sup>Δ</sup>	6,11 ± 0,43 <sup>Δ</sup>	59,89 ± <sup>Δ</sup>	4,29 ± 0,20	329,2	10,7
					6,15		1 ± 2	
1	65,60 ± 3,40 <sup>Δ</sup>	60,66 ± 4,02 <sup>Δ</sup>	52,90 ± 4,04 <sup>Δ</sup>	7,76 ± 0,12 <sup>Δ</sup>	53,59 ± <sup>Δ</sup>	4,15 ± 0,11	308,7	23,7
					5,36		8 ± 4	
10	151,0	138,1	120,2	1,69*	9,95	0,14	353,8	
	0 ± 8,80* <sup>Δ</sup>	3 ± 8,37* <sup>Δ</sup>	1 ± 7,18* <sup>Δ</sup>	17,92 ± <sup>Δ</sup>	84,45 ± *	3,86 ± *	6 ± 2,99	

Tamoxifeno + EE (0,5 µg/kg/día) (mg/kg/día)	238,1	190,5	157,8	32,71 ± 2,83	98,63 ± 8,55	4,02 ± 0,05	350,8	22,2
0,01	6 ± 8,40†	1 ± 6,73†	0 ± 4,52				0 ± 3	
	207,5	173,9	139,9		11,9		334,5	32,4
0,1	7 ± †	8 ± †	7 ± 6,28†	34,01 ± 5,65	97,97 ± 6	3,93 ± 0,26	8 ± 4	
	176,2	165,8	133,5		10,4		338,6	17,3
1	8 ± 4,23†	6 ± 3,07†	2 ± 2,89†	32,34 ± 3,46	78,72 ± 1	4,20 ± 0,19	6 ± 1	
	196,0	186,3	149,1				328,8	28,5
10	0 ± †	8 ± †	8 ± 9,39†	37,20 ± 3,58	94,16 ± 7,84	4,04 ± 0,04	8 ± 0	



**FLUTAMOX+****EE (0,5****µg/kg/día)**

(mg/kg/día)

0,01	314,9	255,7	208,0	116,7	348,3	10,3
	4 ± 18,07	0 ± 17,95	1 ± 14,04	6 ± 7,83	4,06 ± 0,10	1 ± 3
0,1	290,9	232,6	194,3	104,1	279,0	84,2
	5 ± 21,56	4 ± 16,02	8 ± 11,23	9 ± 7,01	4,37 ± 0,10	2 ± 7
1	235,5	203,6	167,7		323,8	21,5
	2 ± 34,40	8 ± 28,32	1 ± 21,29	99,28 ± 5,94	4,09 ± 0,08	8 ± 5
10	216,2	190,6	157,1		0,15	337,1
	4 ± †	5 ± 11,50	8 ± 11,02	98,62 ± 4,99	3,86 ± *	5 ± 9

32

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  $p < 0,05$ . <sup>Δ</sup> 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  
10 ensayada (Tabla 2).

15

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  $\mu\text{m}$ ,  
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  $\mu\text{m}^2$ . 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  
20 anticuerpo secundario biotinilado acoplado a peroxidasa utilizando  
diaminobenzidina como sustrato. Se determinó el número de células positivas a  
PCNA en áreas de 300  $\mu\text{m}^2$  en secciones consecutivas de la porción media del  
cuerno uterino. (Figura 4).

25

30

En ratonas inmaduras, tanto el tamoxifeno como el 17- $\beta$ 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%).

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.

5

**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.**

10 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  
15 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 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  
20 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).

25 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,  
30 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.**

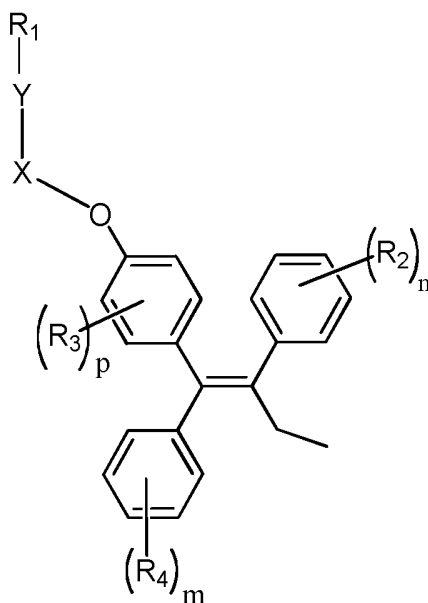
La emisión láser del FLTX1 se consigue iluminando el material (una disolución del FLTX1 entre 1  $\mu\text{M}$  y 50 mM disuelto en un solvente orgánico no polar  
5 adecuado como acetona, metanol o aceite vegetal) con luz pulsada de una longitud de onda entre 425 nm y 520 nm, correspondientes a la banda 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  
10 mínima para obtener emisión láser es de 0,6  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . 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 produce en el medio material en ausencia de espejos adicionales. (Figura 6A).

15 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  
20 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.

25

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



5

(I)

o cualquiera de sus sales, donde:

X representa un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ) o acilo:

10 Y representa un grupo que se selecciona de la lista que comprende amino, amonio, tiol, éter, alquilo( $C_1-C_3$ ), alquenilo( $C_2-C_3$ ) y alquinilo( $C_2-C_3$ );

$R_1$  representa un fluoróforo, que puede estar unido al grupo Y directamente o mediante un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ );

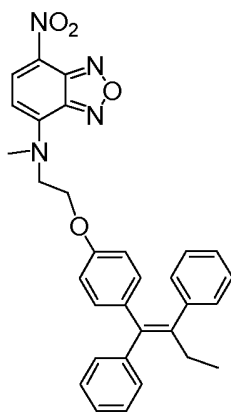
15  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$ , representan de manera independiente, un grupo que se selecciona de la lista que comprende H, OH,  $NH_2$ , SH, O-alquilo, O-acilo, NH-alquilo, NH-acilo, S-alquilo, alquilo, acilo y arilo;

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

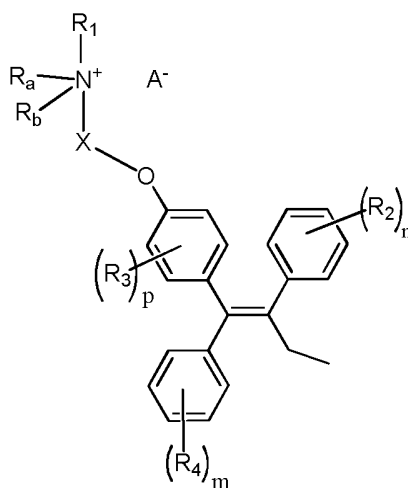
p tiene un valor de entre 1 a 4.

20 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde  $R_2$  y  $R_3$  son H.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde  $R_4$  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
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*-dimetilaminoftalimido.
- 10
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde X es un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_3$ ).
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X es un alquilo  $C_2$ .
- 15
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde Y es un grupo amino.
- 20
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho compuesto es de fórmula (II):



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



5

(III)

donde: X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, n, m y p se han descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

10 R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> representan, de manera independiente, un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>); y

A<sup>-</sup> representa un anión.

11. Compuesto según la reivindicación 10, donde el anión es un ión haluro o sulfato.

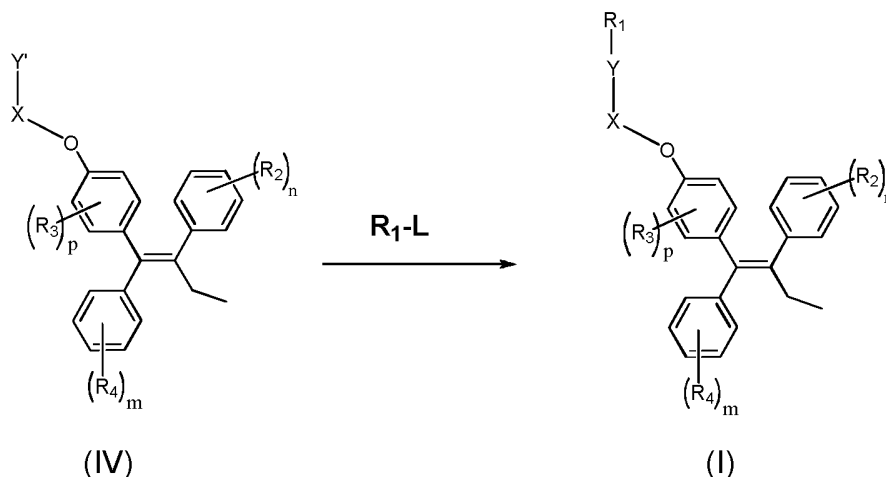
15

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde R<sub>a</sub> o R<sub>b</sub> representan, de manera independiente, un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>).

20 13. Compuesto según la reivindicación anterior, donde R<sub>a</sub> o R<sub>b</sub> son un grupo metilo.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde R<sub>1</sub> es un fluoróforo unido al grupo amonio mediante un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>).

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  $R_1-L$ :



5

donde: X,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , 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.

10

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  $CH_2-CH_2$ , Y es un grupo amino, y  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son hidrógeno, el precursor es el N-desmetiltamoxifeno.

15

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

20

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.

25

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.
- 5
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.
- 10
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
- 15
- 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.
- 20
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.
- 25
27. Composición según la reivindicación anterior, donde el disolvente orgánico es un alcohol, dimetilsulfóxido, lípido graso, cetona o cualquiera de sus combinaciones.
- 30
28. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, donde el compuesto de fórmula (I) se encuentra en una concentración de entre 1  $\mu$ M 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para aplicaciones en optoelectrónica, optofluídica, 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.
- 20 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.

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

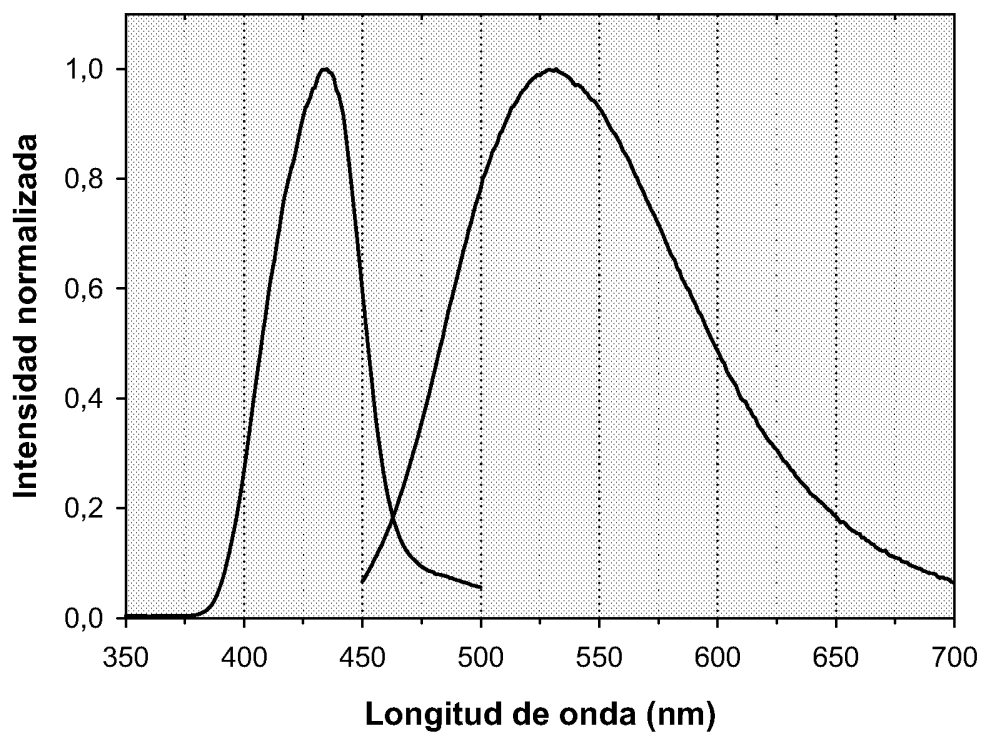
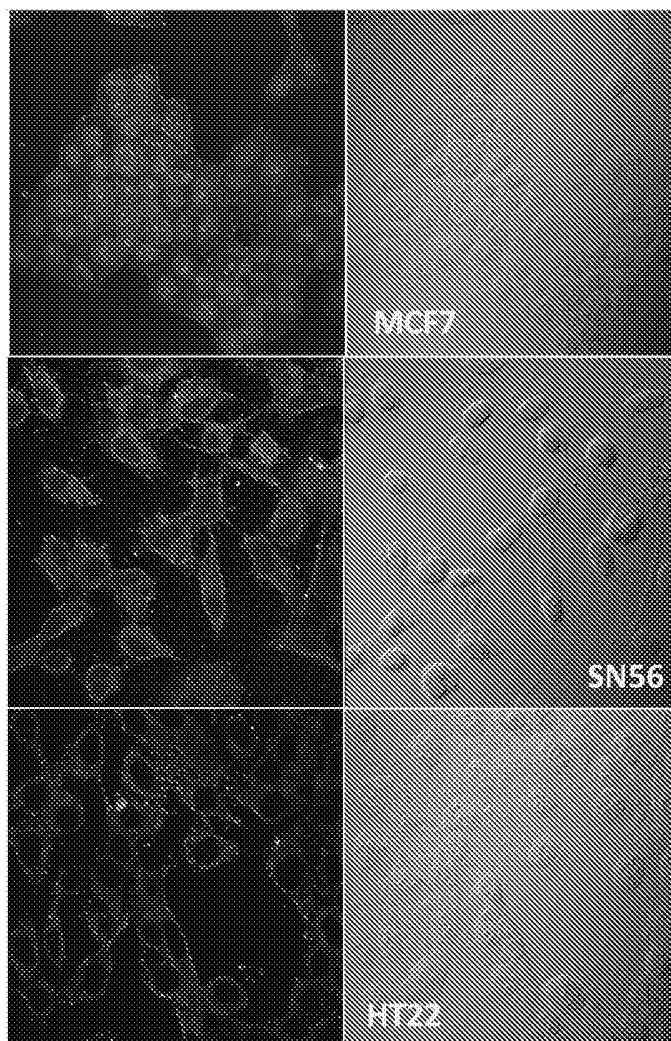


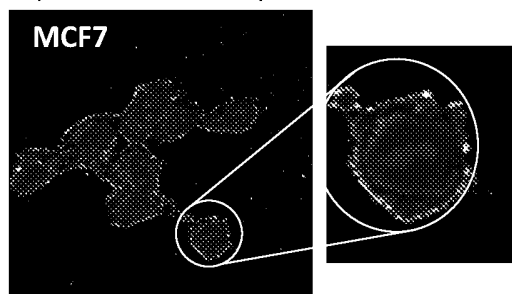
Figura 1A

*B) Condiciones permeabilizantes*



**Figura 1B**

*C) Condiciones no permeabilizantes*



**Figura 1C**

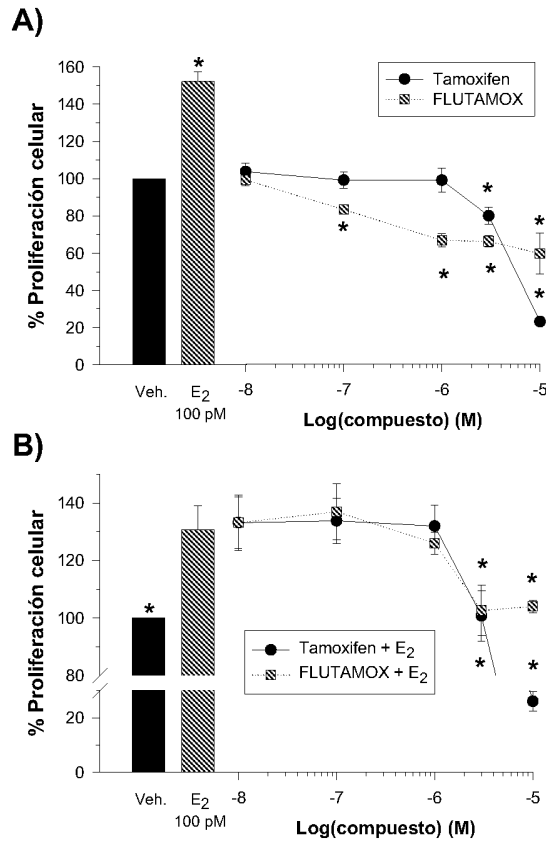


Figura 2

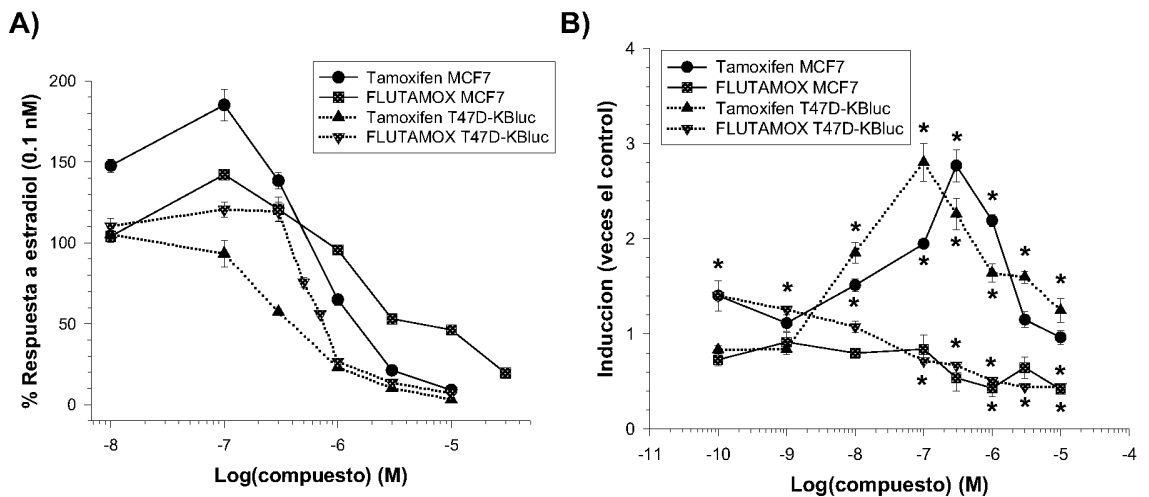


Figura 3

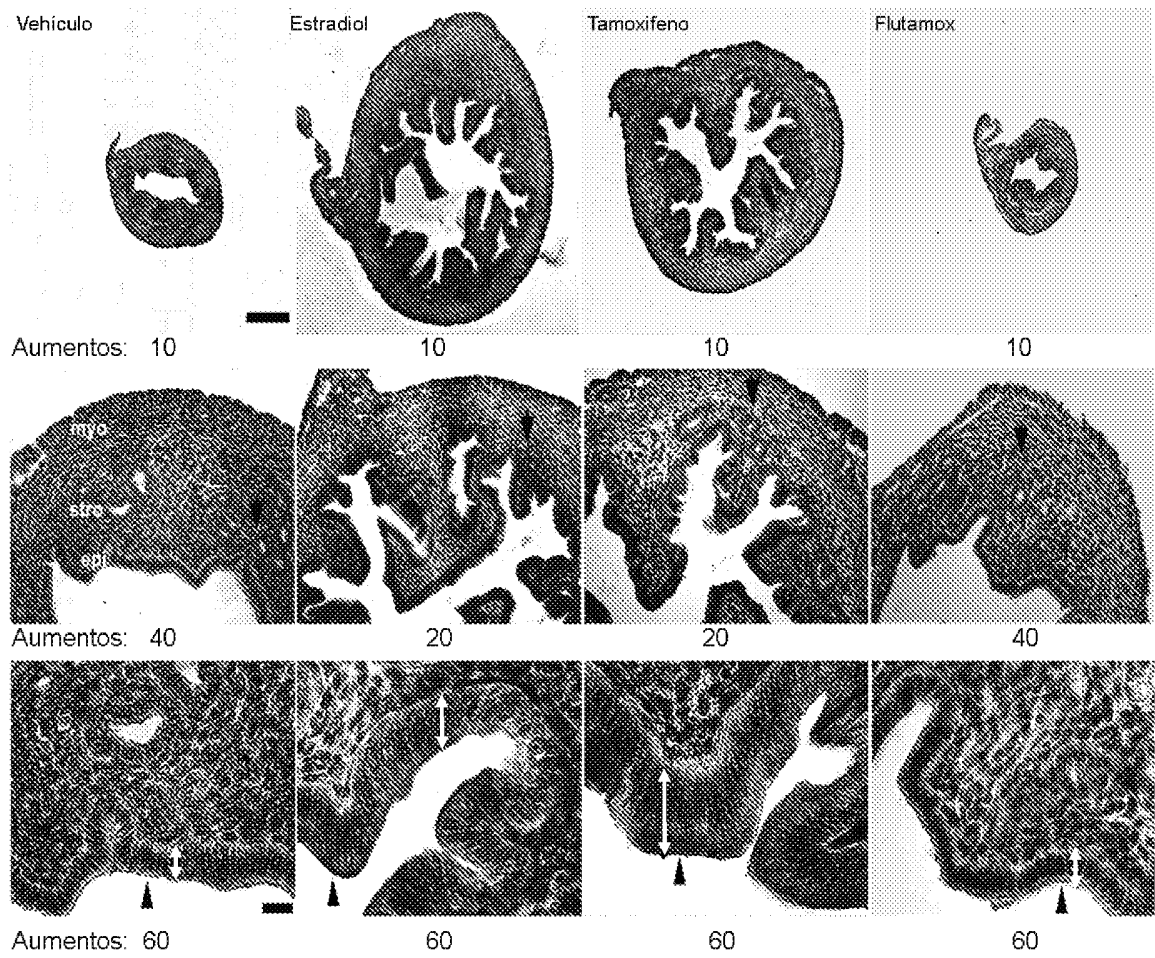


Figura 4

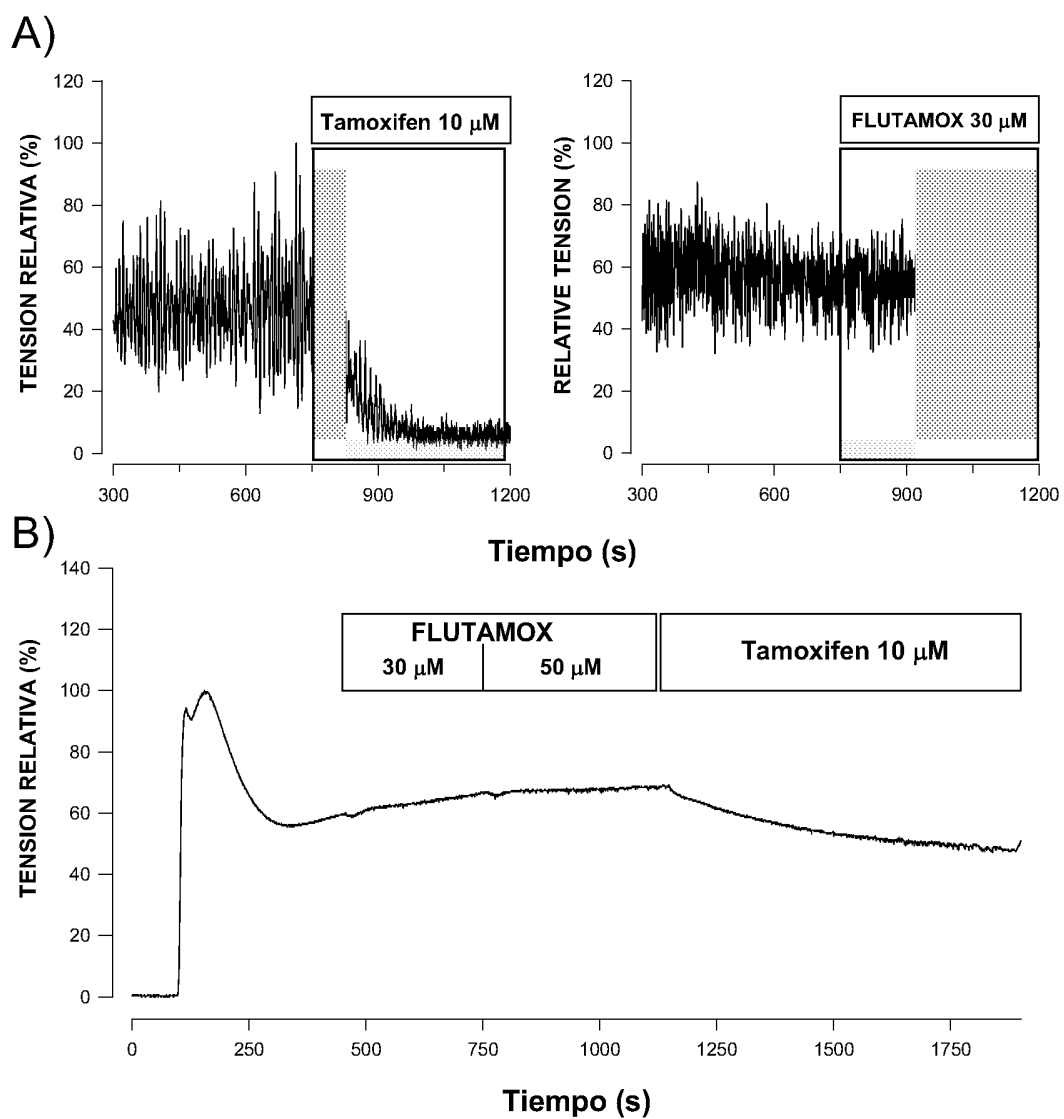


Figura 5

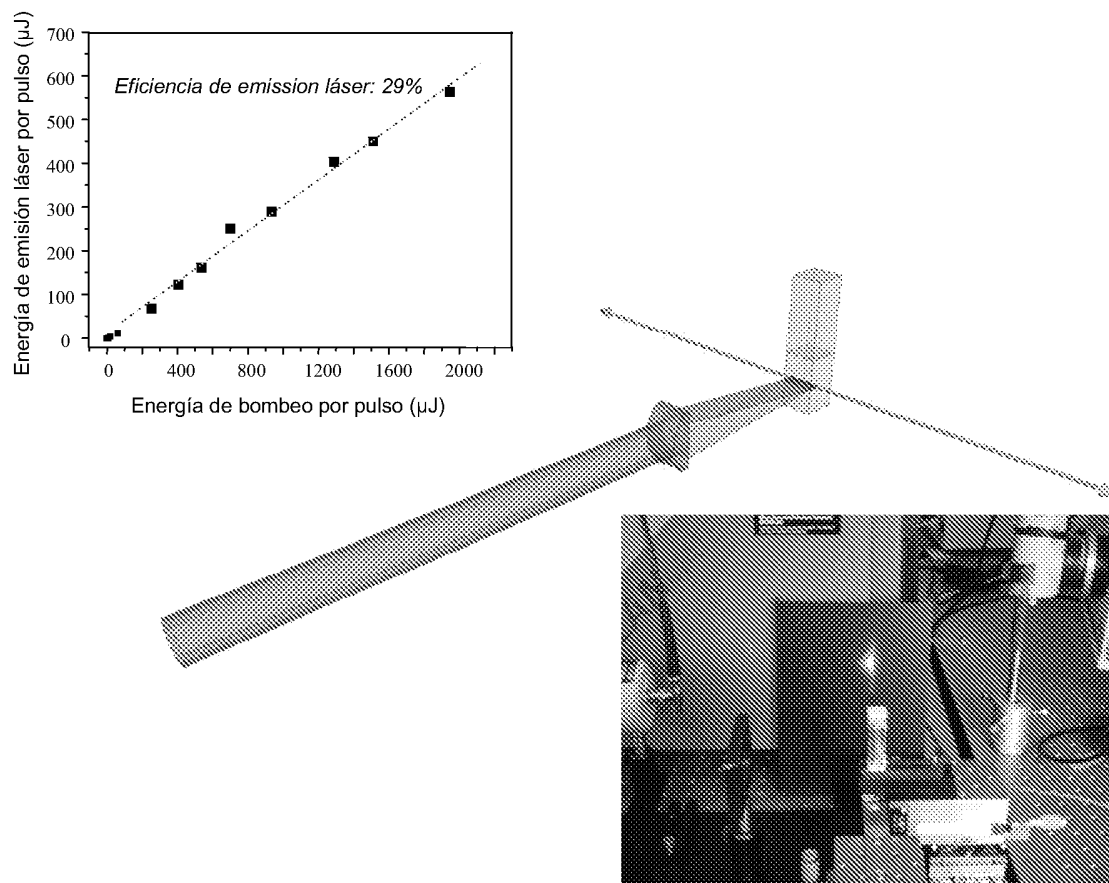


Figura 6

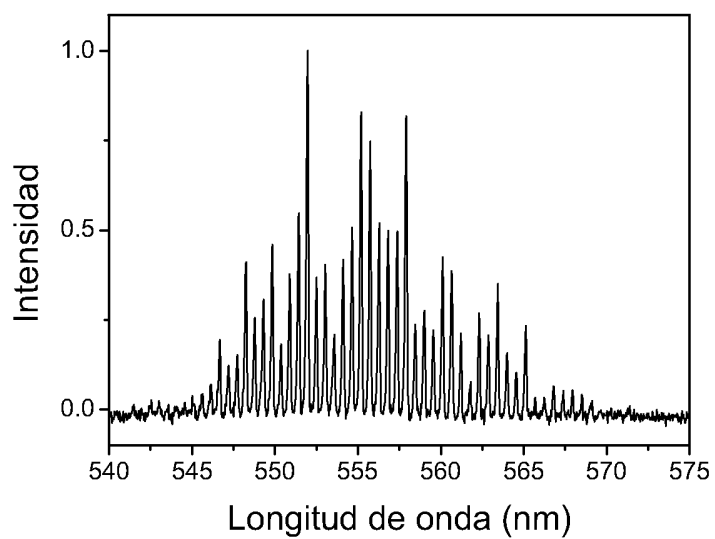


Figura 7



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

**PCT/ES2013/070280**

**A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

INV. C07D271/12

ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

**B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA**

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

**C07D**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data**

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
<b>X</b>	<p><b>EMILY L. RICKERT ET AL: "Synthesis and Characterization of Fluorescent 4-Hydroxytamoxifen Conjugates with Unique Antiestrogenic Properties", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 21, no. 5, 19 May 2010 (2010-05-19), pages 903-910, XP055083672, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc900461h todo el documento</b></p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<b>1-8, 10-34</b>

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional <b>14 OCT 2013 (14.10.2013)</b>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <b>23 OCT 2013 (23.10.2013)</b>
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional <p style="text-align: center;"><b>EPO</b></p>	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/ES2013/070280
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07D271/12 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMILY L. RICKERT ET AL: "Synthesis and Characterization of Fluorescent 4-Hydroxytamoxifen Conjugates with Unique Antiestrogenic Properties", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 21, no. 5, 19 May 2010 (2010-05-19), pages 903-910, XP055083672, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc900461h the whole document -----	1-8, 10-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> See patent family annex.</span>		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 October 2013	23/10/2013	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  O'Sullivan, Paul	