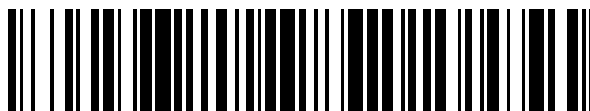


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 099**

51 Int. Cl.:

C07F 9/54 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 31/662 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2014 PCT/CZ2014/000035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2014 E 14721738 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2989110**

54 Título: **Derivados de tamoxifeno para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente con alto nivel de proteína HER2**

30 Prioridad:

24.04.2013 CZ 20130308
29.01.2014 CZ 20140066

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2019

73 Titular/es:

SMART BRAIN S.R.O. (25.0%)
Vídenská 1083
142 20 Praha 4, CZ;
BIOTECHNOLOGICKY USTAV AV CR, V.V.I.
(25.0%);
NEUZIL, JIRÍ (25.0%) y
SPRINGTIDE VENTURES S.R.O. (25.0%)

72 Inventor/es:

NEUZIL, JIRÍ;
STURSA, JAN y
WERNER, LUKÁS

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

ES 2 699 099 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de tamoxifeno para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente con alto nivel de proteína HER2

5

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos derivados de tamoxifeno dirigidos mitocondrialmente para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente tumores con alto nivel de proteína HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), que influye en la división espontánea de las células y el crecimiento de los tumores.

Antecedentes de la invención

15 El reciente avance en medicina molecular ha conducido a ciertas mejoras en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades neoplásicas. A pesar de este éxito parcial, estas patologías siguen siendo un desafío considerable. Para ciertos tipos de cánceres, la terapia actual en algunos casos falla por varias razones. Por un lado, es la resistencia inherente de las células tumorales, su capacidad de mutación constante y la evasión de la terapia, por otro lado, también es la heterogeneidad del entorno tumoral (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144:646-674). Se demostró que los tumores del mismo tipo son muy diferentes para los sujetos individuales desde el punto de vista de su perfil genómico (Jones S et al. Core signalling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science 2008; 321:1801-1806. Parsons DW et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008; 321:1807-1812), lo que indica la necesidad de llamada terapia "personal". Incluso un problema mayor es la heterogeneidad de las mutaciones en el mismo tumor, como se ha demostrado recientemente para los tumores renales (Gerlinger M et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med 2012; 366:883-892.), y esta situación se puede esperar también para otros tipos de tumores. Por esta razón, es necesario buscar nuevos enfoques y un punto o puntos de intervención invariables comunes para todas o la mayoría de las células neoplásicas en el tumor y que preferiblemente afectan a las funciones esenciales en las células cancerosas. Parece que tal punto de intervención podrían ser las mitocondrias, es decir, orgánulos que son fundamentales para la generación de energía necesaria para todos los procesos fisiológicos y patofisiológicos en las células. Aunque las células tumorales utilizan, desde una parte importante, la llamada glucólisis aerobia para la generación de energía, la respiración mitocondrial (es decir, el consumo de oxígeno vinculado a la formación de ATP) es inherente a la mayoría de los tipos de tumores (si no todos) (Ralph SJ et al. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. Mol Aspects Med 2010; 31:145-170).

Un grupo de sustancias con actividad anticancerosa se definió con el nombre de "mitocans" (derivado de "mitocondria y cáncer") (Neuzil J et al. Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. FEBS Lett 2008:580:5125-5129. Neuzil J et al. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. Mitochondrion 2013; 13:199-208.). Estas sustancias se dividen en varios grupos según el mecanismo molecular de su actividad. Estos son: (1) inhibidores de la hexocinasa; (2) agentes dirigidos a proteínas de la familia Bcl-2; (3) agentes activos redox que actúan como inhibidores de tiol; (4) agentes dirigidos a las proteínas VDAC y ANT; (5) agentes dirigidos a la cadena redox de electrones; (6) lipófilos dirigidos a la membrana mitocondrial interna; (7) agentes dirigidos al ciclo de Krebs; (8) agentes dirigidos al ADN mitocondrial; (9) agentes que no pertenecen a ninguno de estos grupos. En la figura 1 se muestran ejemplos de estos agentes y sus dianas.

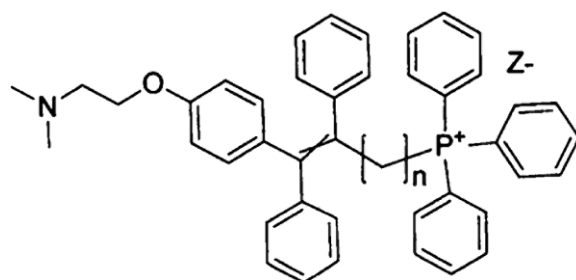
El cáncer de mama es una enfermedad neoplásica que es muy difícil de tratar y que actualmente se diagnostica en una de cada ocho mujeres durante su vida. El tratamiento del cáncer de mama comúnmente se basa en la terapia con tamoxifeno (TAX). Aproximadamente el 30% de los pacientes con cáncer de mama son diagnosticados con un alto nivel de proteína HER2, que pertenece al grupo de receptores tirosina cinasas y que aumenta la capacidad proliferativa de las células, aumentando su potencial neoplásico (Arteaga CL et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol. 2011; 9:16-32.). La terapia establecida (donde el principal fármaco usado es el TAX) es ineficaz porque los tumores con niveles altos de HER2 son bastante resistentes a esta terapia. El TAX afecta a los receptores de estrógeno en la membrana plasmática de las células de cáncer de mama, por lo que inhibe los procesos importantes relacionados con la capacidad de proliferación de las células cancerosas. Recientemente se ha publicado que, a concentraciones más altas, el TAX actúa no solo a través del receptor de estrógenos, sino que también se mueve hacia la membrana mitocondrial interna, donde interactúa con el complejo I de la cadena respiratoria (Moreira PI et al. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin

mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. J Biol Chem 2006; 281:10143-10152.). Esto ocurre, sin embargo, a dosis que no son fáciles de lograr desde un punto de vista farmacológico. Además, es posible esperar un aumento de la toxicidad del TAX en caso de dosis tan altas.

- 5 En la actualidad, el cáncer de mama con alta proteína HER2 se trata con el anticuerpo humanizado "trastuzumab", que inhibe la actividad de HER2. Esta terapia es económicamente muy exigente y presenta una toxicidad secundaria; además, un gran porcentaje de sujetos con la proteína HER2 alta son resistentes al trastuzumab (se estima que es aproximadamente el 30%). También constituye un reto el fármaco lapatinib recientemente introducido que inhibe las tirosina cinasas receptoras (Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. Nat Rev Cardiol 2010;7:564-575. Lin SX et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. Nat Rev Endocrinol 2010;6:485-493. Ahn ER et al. Is the improved efficacy of trastuzumab and lapatinib combination worth the added toxicity? Breast Cancer 2012;6:191-207.). Un problema en este contexto es que el lapatinib no es un inhibidor específico de HER2, lo que puede conducir también a la inhibición de otras tirosina cinasas receptoras, y a una toxicidad secundaria, y también es posible anticipar el desarrollo de resistencia a esta terapia (Wetterskog D et al. Identification of novel determinants of resistance to lapatinib in ERBB2-amplified cancers. Oncogene 2013; 1-11).

Resumen de la invención

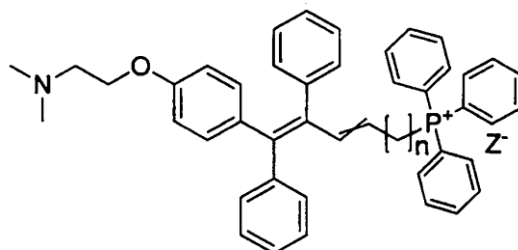
- 20 Por las razones mencionadas anteriormente, se han diseñado y sintetizado un grupo de agentes eficaces contra tumores con altos niveles de la proteína HER2, que se dirigen directamente a las mitocondrias y que pueden superar las complicaciones mencionadas anteriormente. Estas desventajas asociadas con el tamoxifeno (TAX) se eliminan etiquetándolas con un trifenilfosfonio a través de una cadena alifática (denominada MitoTAX), donde la cadena es alquilo o alquenilo, y sus correspondientes sales de aminas terciarias, seleccionadas del grupo de sales orgánicas, tales como citrato, acetato, lactato, tartrato, oxalato, ascorbato, mesilato, tosilato o sales inorgánicas, tales como sulfato, halogenuro, fosfato y/o sus mezclas, derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno, tienen la fórmula general I,



I,

- 30 donde $n = 8$ a 12 , y donde Z se selecciona del grupo de sales orgánicas, tales como citrato, acetato, lactato, tartrato, oxalato, ascorbato, mesilato, tosilato o sales inorgánicas, tales como, por ejemplo, sulfato, halogenuro, fosfato y en la que el doble enlace cruzado en la fórmula general I, situado en el resto TAX, indica que el doble enlace puede tener una configuración E y/o Z,

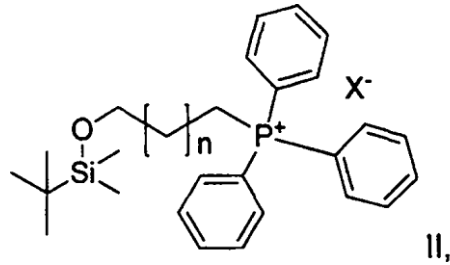
- 35 y los derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno tienen la fórmula general IA



IA

- 40 donde $n = 6$ a 10 , y donde Z tiene el significado indicado anteriormente, y en la que el doble enlace cruzado en la fórmula general IA, situado en la cadena lateral, indica que el doble enlace puede tener una configuración E y/o Z.

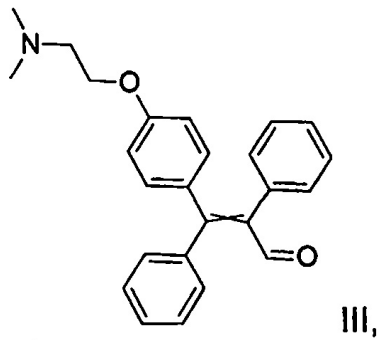
El método de preparación de derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general I se basa en una reacción de iluro generado a partir de terc-butildimetilsilil-oxi-alquil-trifenilfosfonio con la fórmula general II,



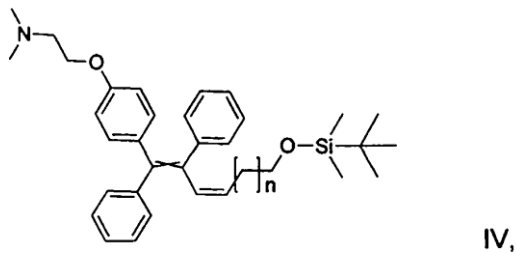
5

donde $n = 5$ a 9
y X es I, Br, Cl o mesilo,

10 bajo el tratamiento de base orgánica (preferiblemente butil litio) en tetrahidrofurano (THF) en una atmósfera de argón a una temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y condensación posterior con aldehído, de la fórmula III,



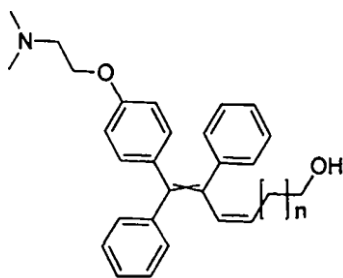
15 proporcionando un derivado sililado de la fórmula general IV,



donde $n = 5$ a 9 .

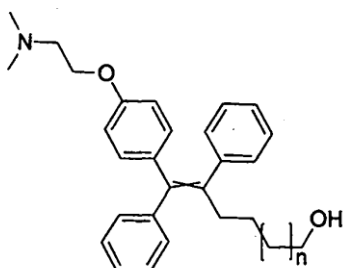
20

El derivado sililado de la fórmula general IV se trata con fluoruro de tetrabutilamonio que proporciona alquenol de la fórmula general V,



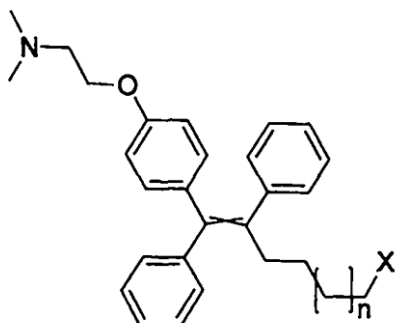
V,

donde $n = 5$ a 9 ,
 que se reduce en la atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador para dar alcohol de la fórmula general
 5 VI,



VI,

donde $n = 5$ a 9 ,
 10 el alcohol de la fórmula general VI se sustituye por el derivado correspondiente de la fórmula general VII,



VII,

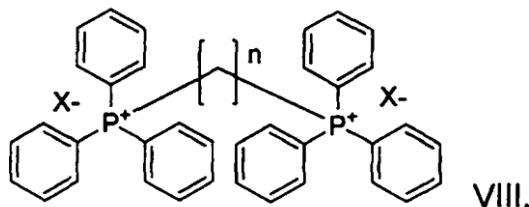
15 donde $n = 5$ a 9
 y X es I, Br, Cl o mesilo,

que se convierte en el derivado de alquil-trifenilfosfonio dirigido mitocondrialmente de tamoxifeno de la fórmula
 20 general I por calentamiento junto con trifenilfosfina.

El alquenol de la fórmula general V puede prepararse también directamente a partir del aldehído III por reacción con
 el bromuro de (hidroxialquil)trifenilfosfonio correspondiente bajo el tratamiento de la base (ventajosamente
 hexametildisilazano de litio) a temperatura ambiente y en la mezcla de THF y dimetilsulfóxido (DMSO), lo que
 25 aumenta la solubilidad del bromuro de (hidroxialquil)trifenilfosfonio. Esto acelera y abarata considerablemente la
 síntesis.

Cuando el alquenol de la fórmula general V se usa en forma de una sal de nitrógeno terciario, es posible aumentar el
 rendimiento del alcohol de la fórmula general VI adquirido mediante el procedimiento mencionado anteriormente,
 proporcionando la correspondiente sal de amina terciaria del derivado de trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula
 30 general I sin aislar el compuesto de la fórmula general VII.

El método de preparación de derivados de alquenil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general IA se basa en la preparación de iluro generado a partir de alquil bis(trifenilfosfonio) de la fórmula general VIII



5

donde $n = 7$ a 11

y X es I, Br, Cl o mesilo o una combinación de los mismos,

10 en la mezcla de tetrahidrofurano (THF) y dimetilsulfóxido (DMSO) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente bajo el tratamiento de una base orgánica (ventajosamente hexametildisilazano de litio) y su posterior condensación con aldehído de la fórmula III.

El alquil bis(trifenilfosfonio) de la fórmula general VIII se prepara mediante una reacción del alquilo correspondiente con trifenilfosfina a una temperatura aumentada.

15

El grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺) permite la interacción del derivado del alquil o alquenil trifenilfosfonio de TAX, el agente de la fórmula general I o IA, con mitocondrias. Estos compuestos se prepararon mediante la adición del grupo catiónico de alquil-TPP⁺ a la molécula TAX. En el entorno biológico, la carga positiva en el fósforo del grupo TPP⁺ está deslocalizada, lo que significa que la sustancia se comporta de manera neutra. La única excepción

20 son las estructuras celulares con potencial negativo, que es la superficie interna de la membrana plasmática y, en particular, la membrana mitocondrial interna. En este entorno, la carga se localiza en el fósforo y el grupo TPP⁺ cargado positivamente actúa como un anclaje, causando una concentración considerable de derivados de alquil o alquenilo TPP⁺ de TAX de la fórmula general I o IA (MitoTAX) en la interfase de la matriz mitocondrial y la membrana interior de las mitocondrias.

25

La molécula de MitoTAX está orientada de tal manera que la parte teísta con el grupo TPP⁺ se posiciona dentro de la matriz mitocondrial, y la parte biológicamente activa está en la membrana mitocondrial interna, que es la ubicación de la diana molecular de MitoTAX, que es el complejo mitocondrial I. Para la interacción física de la parte biológicamente activa de MitoTAX con el complejo mitocondrial I, un componente de la membrana mitocondrial

30 interna, es necesario que una cadena alifática de cierta longitud esté situada entre la parte biológicamente activa de MitoTAX y el grupo TPP⁺, y parece que no es esencial si la cadena alifática es alquilo o alquenilo; véase el ejemplo 24. Desde el punto de vista de las propiedades biológicas y físico-químicas de la membrana mitocondrial, parece que una longitud ideal de la cadena alifática es de 8 a 12 carbonos.

35 MitoTAX es notablemente más eficiente en la eliminación de las células de cáncer de mama que el TAX original. Otro hallazgo muy importante es que MitoTAX elimina las células de cáncer de mama más eficientemente en el caso de las células con alta expresión de la proteína HER2 que las células con baja expresión de la proteína HER2. Sin embargo, es lo contrario para TAX, y por esta razón, el TAX es clínicamente ineficiente contra el cáncer de mama con HER2 alto. El motivo del aumento de la sensibilidad de las células de cáncer de mama con un alto nivel de

40 proteína HER2 a MitoTAX es probablemente debido a la ubicación de la proteína HER2 también en las mitocondrias, y para las células con baja o muy baja expresión de HER2, esta oncoproteína se localiza en la membrana plasmática de las células tumorales.

La sustancia conocida como trastuzumab (Herceptin), que se usa como terapia para el cáncer de mama con alto

45 contenido de proteína HER2, es ineficiente en varios casos. Una posible razón es que, en el caso de la proteína HER2 alta, su porción significativa está localizada en las mitocondrias y durante los efectos de trastuzumab en las células tumorales, la transferencia de la proteína HER2 a las mitocondrias se intensifica aún más. Por lo tanto, las células cancerosas "ocultan" HER2 de trastuzumab, que es un inhibidor de su actividad. La asociación mitocondrial de HER2 también cambia el metabolismo mitocondrial de tal manera que la célula cancerosa avanza hacia la

50 glucólisis y sobrevive mejor en un ambiente que es pobre en nutrientes y oxígeno.

A diferencia del trastuzumab, MitoTAX entra en la célula y se acumula en las mitocondrias sobre la base del potencial negativo en la superficie interna de la membrana mitocondrial interna. Las células de cáncer de mama con

proteína HER2 alta, en muchos casos resistentes al trastuzumab, son más sensibles a MitoTAX.

Una propiedad importante de MitoTAX es su eficaz inhibición del crecimiento del cáncer de mama espontáneo con alta proteína HER2 en un modelo de ratón cuando el crecimiento se inhibe en un 90%, y la eficacia de TAX es 5 aproximadamente de 20 a 30 veces menor. Además, MitoTAX no es tóxico para los ratones.

Los cánceres de mama son heterogéneos desde el punto de vista de la expresión de la proteína HER2. Es posible esperar que solo una parte del tumor responda al tratamiento con trastuzumab, mientras que MitoTAX será eficiente, ya que elimina las células con una expresión de proteína HER2 tanto alta como baja.

- 10 El succinato de vitamina E se describió como un mitocan que afecta al complejo mitocondrial II (Dong LF et al. α -Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene* 2008; 27:4324-4335. Dong LF et al. Suppression of tumour growth in vivo by the mitocan α -tocopheryl succinate requires respiratory complex II. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1593-1600.). Recientemente, se ha preparado y
- 15 ensayado una sustancia que surgió a través de la adición del grupo TPP⁺ al succinato de vitamina E. Esta nueva sustancia está dirigida al mismo sitio molecular, su actividad es, sin embargo, superior a la actividad del succinato de vitamina E parental, debido al aumento de la concentración de esta sustancia en la interfase de la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial. (Dong LF et al. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J Biol Chem* 2011;286:3717-3728. Dong LF et al.
- 20 Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: A new paradigm of efficient anti-cancer therapy. *Free Radic Biol Med* 2011;50:1546-1555. Rohlena J et al Mitochondrially targeted α -tocopheryl succinate is antiangiogenic: Potential benefit against tumour angiogenesis but caution against wound healing. *Antiox Redox Signal* 2011;15:2923-2935.). De manera similar al succinato de vitamina E con la adición del grupo TPP⁺, MitoTAX se acumula en gran medida en la interfase de la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial.
- 25 Sin embargo, MitoTAX afecta, según la invención, al complejo mitocondrial I, por lo que surge un cambio en su espectro de efectos en comparación con el TAX, que afecta predominantemente a los receptores de estrógeno en la membrana plasmática de las células de cáncer de mama, y, por lo tanto, inhibe su actividad importante para las propiedades proliferativas de las células cancerosas.
- 30 MitoTAX se acumula en las mitocondrias, desencadena la muerte celular selectivamente en las células cancerosas, cuyas mitocondrias presentan un potencial negativo más alto en comparación con las mitocondrias de las células normales. Elimina, de manera muy eficiente, las células de cáncer de mama con HER2 alta y es eficaz contra el cáncer de mama con HER2 alta, donde el sitio diana de MitoTAX es el complejo mitocondrial I (véase la figura 1).
- 35 MitoTAX puede usarse para la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias, es decir, para enfermedades seleccionadas del grupo: astrocitoma, neuroblastoma, glioblastoma, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello del útero, osteosarcoma, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, leucemia.

40 Lista de abreviaturas

DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
ER α	receptor de estrógeno α
ESI MS	Espectrometría de masas de ionización por electronebulización
HER2	receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
IBX	Ácido 2-yodoxibenzoico
LiHMDS	hexametildisilazano de litio
MitoTAX	tamoxifeno dirigido mitocondrialmente
MitoVES	succinato de vitamina E mitocondrialmente dirigido
RMN	resonancia magnética nuclear
TAX	tamoxifeno
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía de capa fina

Resumen de las figuras

- 45 La figura 1: ilustra la clasificación de las clases individuales de mitocans, sustancias potencialmente anticancerosas que actúan sobre las mitocondrias.

La figura 2: ilustra la preparación de sublíneas de cáncer de mama humano MCF7.

La figura 3: ilustra los efectos de MitoTAX y TAX en el crecimiento de tumores experimentales con alta expresión de HER2.

La figura 4: ilustra la apoptosis inducida por MitoTAX y TAX en diferentes líneas celulares.

- 5 La figura 5: ilustra la inducción dependiente de la concentración de la apoptosis por MitoTAX en diversas líneas celulares de cáncer de mama con alto nivel de HER2.

La figura 6: ilustra cómo MitoTAX en diferentes concentraciones afecta a la respiración a través del complejo mitocondrial I y II en células tumorales.

- 10 La figura 7: muestra la comparación de la formación de radicales de oxígeno en células de cáncer de mama expuestas a MitoTAX y TAX.

La figura 8: ilustra la disminución del potencial mitocondrial en respuesta a MitoTAX y TAX.

La figura 9: muestra que HER2 se localiza preferiblemente en mitocondrias de células de cáncer de mama con alta expresión de HER2.

La figura 10: ilustra el efecto del nivel de proteína HER2 en la longitud de las mitocondrias.

- 15 La figura 11: muestra la influencia del nivel de proteína HER2 en la formación de lactato y la respiración mitocondrial.

La figura 12: muestra que las células con alto nivel de proteína HER2 presentan una mayor captación de glucosa.

La figura 13: muestra que MitoTAX, pero no TAX, reduce la expresión del receptor de estrógeno ER α .

La figura 14: muestra que la proteína HER2 está localizada en mitocondrias de células cancerosas en tumores espontáneos con un nivel alto de HER2.

- 20 La figura 15: muestra que las áreas individuales del cáncer de la glándula mamaria en el ratón transgénico FVB/N *c-neu* difieren en la expresión de genes importantes para el desarrollo y tratamiento del cáncer de mama (HER2, ER α , GATA3, Ki67).

La figura 16: ilustra secciones de áreas individuales del cáncer de mama teñidas utilizando el método de eosina-hematoxilina para revelar la morfología tumoral de las secciones.

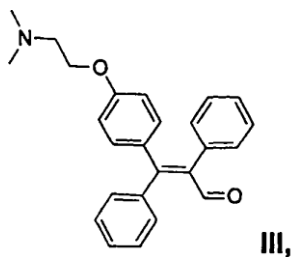
- 25 La figura 17: muestra secciones de partes individuales de los mismos tumores con niveles de proteína HER2 marcadamente diversos.

La figura 18: ilustra el nivel de apoptosis en células MCF7 (A) y MCF7 HER2⁺ (B) expuestas a diversos derivados de MitoTAX

30 Ejemplos

El aldehído de la fórmula III, que se preparó según el procedimiento publicado en 2003 ((Z)-Tamoxifen and Tetrasubstituted Alkenes and Dienes via a Regio- and Stereospecific Three-Component Magnesium Carbometalation Palladium(0) Cross-Coupling Strategy; Pierre E. Tessier, Andrea J. Penwell, Fabio E. S. Souza, and Alex G. Fallis*;

- 35 ORGANIC LETTERS, 2003, Vol. 5, N.º 17, 2989-2992.), se usa como material de partida para la preparación de derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general I y/o IA (MitoTAX),



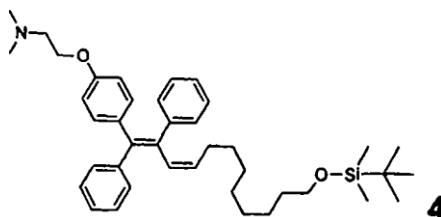
- 40 El aldehído de partida III, tal como los autores de la invención presentada descubrieron, puede prepararse con el uso de otro agente de oxidación distinto del utilizado en la publicación mencionada anteriormente. Descubrieron que la aplicación del ácido 2-yodobenzoico (IBX), en lugar de los agentes de Dess-Martin, forma solo un isómero de doble enlace. El rendimiento es comparable.

- 45 IBX (12,460 g, 44,498 mmol) y el alcohol alílico de partida (5,54 g, 14,833 mmol) (véase la publicación mencionada anteriormente) se disolvieron en acetato de etilo (120 ml). La suspensión se sometió a reflujo durante 3 horas en agitación constante. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con éter dietílico (1 l) y se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio (3 x 100 ml). Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo (3 x 80 ml) de nuevo. Las capas de acetato de etilo combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio.
- 50 El desecante se filtró y la solución se concentró a presión reducida para producir 4,850 g (88%) de aldehído III en forma de un sólido de color parduzco.

Ejemplo 1

Se disolvió bromuro de (9-((terc-butildimetilsilil)oxi)nonil)trifenilfosfonio (634 mg, 1,057 mmol) en tetrahidrofurano seco (THF) (6 ml), se cubrió con una atmósfera de argón y se enfrió a -78 °C. Se añadió lentamente gota a gota butil litio (1,2 ml, solución 0,9 M en THF) a la mezcla de reacción en una atmósfera de argón. La solución se dejó calentar hasta 0 °C, el color se cambió a rojo oscuro, se enfrió de nuevo a -78 °C y se añadió gota a gota aldehído de la fórmula III (160 mg, 0,430 mmol) disuelto en THF seco (3 ml). Después, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura del laboratorio y se agitó durante 16 horas en una atmósfera de argón. El progreso de la reacción se controló con cromatografía en capa fina (TLC) en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). Después, se añadió una solución saturada de cloruro de amonio y agua a la mezcla de reacción y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía del concentrado en la columna de gel de sílice en el sistema de diclorometano (DCM)/metanol (gradiente del 0 al 10% de metanol) produjo 147 mg de producto de la fórmula 4 (rendimiento del 56%).

15



¹H RMN (500 MHz, cdcl₃) δ 7,42-7,36 (m, 5H), 7,18-7,28 (m, 5H), 6,94 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,73 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,19 (d, *J* = 11,5, 1H), 5,47 (dt, *J* = 11,5, 7,4, 1H), 4,09 (t, *J* = 5,8, 2H), 3,72 (t, *J* = 6,6, 2H), 2,80 (t, *J* = 5,8, 2H), 2,42 (s, 6H), 1,69 - 1,57 (m, 4H), 1,48 - 1,13 (m, 10H), 1,03 (s, 9H), 0,18 (s, 6H). Espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI MS): 612.

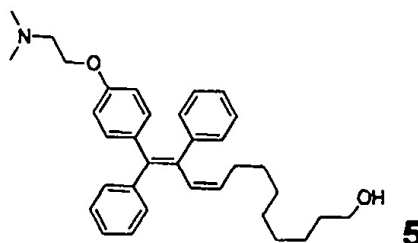
Se preparó bromuro de (9-((terc-butildimetilsilil)oxi)nonil)trifenilfosfonio según el procedimiento publicado en la bibliografía. (Tetrahedron Letters, 2010, 51,49, 6426-6428.)

25

Ejemplo 2

El derivado sililado de la fórmula 4 (147 mg, 2,240 mmol) se disolvió en THF (5 ml), luego se cubrió con una atmósfera de argón y se añadió gota a gota fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) (260 µl, solución 1 M en THF) a una temperatura de 0 °C con agitación. Después, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura del laboratorio y se agitó durante 6 horas más. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). Después, se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con una solución saturada de sosa y salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. El desecante se filtró y la solución se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó con la cromatografía en columna sobre gel de sílice en el sistema cloroformo/metanol (gradiente del 0 al 10% de metanol) para producir 115 mg (rendimiento del 96%) del alquenol requerido de la fórmula 5.

35

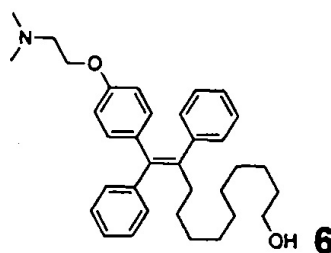


¹H RMN (500 MHz, cdcl₃) δ 7,43 - 7,14 (m, 5H), 6,94 (d, *J* = 8,5, 2H), 6,72 (d, *J* = 8,5, 2H), 6,20 (d, *J* = 11,5, 1H), 5,48 (dt, *J* = 11,5, 7,4, 1H), 4,12 (t, *J* = 5,9, 2H), 3,72 (t, *J* = 6,6, 2H), 2,86 (t, *J* = 5,9, 2H), 2,46 (s, 6H), 1,71-1,58 (m, 4H), 1,51 - 1,10 (m, 10H). ESI MS: 498.

Ejemplo 3

45

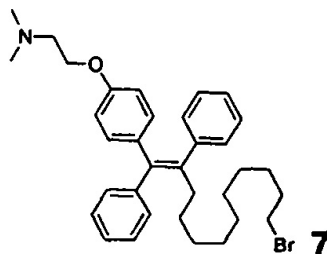
El derivado de alquenol de la fórmula 5 (115 mg, 0,231 mmol) se disolvió en etanol absoluto (6 ml) y se cubrió con una atmósfera de argón. Se añadió Pd al 10%/C (10 mg) a la mezcla y el matraz con la suspensión de reacción se evacuó y se cubrió con una atmósfera de hidrógeno varias veces. Después, la mezcla de reacción se agitó a la temperatura del laboratorio en la atmósfera de hidrógeno durante 24 horas. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La mezcla se filtró a través de una capa de Celite y se lavó varias veces con etanol. El etanol se evaporó para producir 101 mg (rendimiento del 87%) del alcohol requerido de la fórmula 6, que se utiliza sin ninguna purificación adicional para la siguiente etapa de la síntesis.



10 ^1H RMN (500 MHz, cd_3od) δ 7,40 - 7,01 (m, 10H), 6,85 (d, $J = 8,1$, 2H), 6,68 (d, $J = 8,1$, 2H), 4,20 (s, 2H), 3,55 (t, $J = 6,4$, 2H), 3,46 (s, 2H), 2,89 (s, 6H), 2,42 (t, $J = 7,8$, 2H), 1,57 - 1,48 (m, 2H), 1,38 - 1,11 (m, 12H). ESI MS: 500.

Ejemplo 4

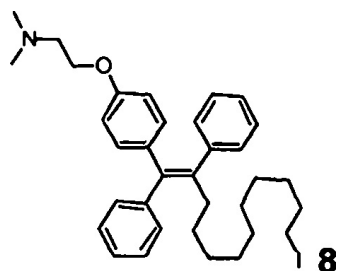
15 Se disolvió el alcohol de la fórmula 6 (230 mg, 0,460 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió CBr_4 (480 mg, 1,447 mmol) a la mezcla a la temperatura de laboratorio en una atmósfera de argón. Después se añadió gota a gota trifenilfosfina (400 mg, 1,525 mmol) disuelta en DCM (3 ml). La mezcla se agitó a la temperatura del laboratorio durante 2 horas y luego se concentró a presión reducida. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La cromatografía del concentrado en la columna de gel de sílice en el sistema de DCM/metanol (gradiente del 0-10%) produjo 273 mg (rendimiento del 92%) del bromuro requerido de la fórmula 7. El bromuro se sometió a la siguiente reacción sin ningún almacenamiento prolongado.



25 ^1H RMN (400 MHz, cdcl_3) δ 7,46 - 6,96 (m, 10H), 6,78 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,53 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 4,29 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,47 - 3,28 (m, 4H), 2,82 (s, 6H), 2,38 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 1,80 (c, $J = 7,8$ Hz, 2H), 1,46 - 0,98 (m, 14H). ESI MS: 561.

30 Ejemplo 5

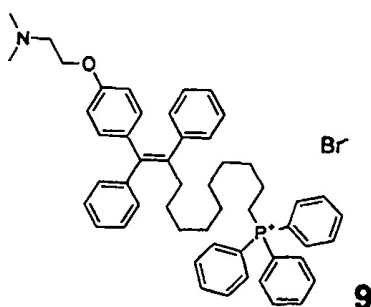
Se disolvió el alcohol de la fórmula 6 (102 mg, 0,204 mmol) en DCM (6 ml). Se añadieron a la mezcla trifenilfosfina (83 mg, 0,316 mmol) e imidazol (27 mg; 0,397 mmol) a temperatura de laboratorio, y la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo a 4 °C. Se añadió yodo (76 mg, 0,302) a la mezcla de reacción enfriada y se agitó a la temperatura de laboratorio durante el tiempo de 4 horas. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se extrajo con tiosulfato. La fase orgánica se lavó adicionalmente con una solución saturada de sosa y salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. La cromatografía del concentrado en la columna de gel de sílice en el sistema de DCM/metanol (gradiente del 0 al 10%) proporcionó 100 mg (rendimiento del 80%) del yoduro requerido de la fórmula 8. El yoduro se sometió a la siguiente reacción sin un almacenamiento prolongado.



¹H RMN (400 MHz, cdcl₃) δ 7,40 - 7,32 (m, 2H), 7,31 - 7,22 (m, 4H), 7,22 - 7,08 (m, 4H), 6,78 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,57 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 3,95 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,19 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,47 - 2,37 (m, 2H), 2,31 (s, 6H), 1,81 (c, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,52 - 1,00 (m, 14H). ESI MS: 610.

Ejemplo 6

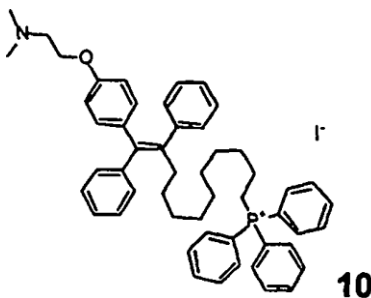
- Se añadió trifenilfosfina (300 mg, 1,144 mmol) al bromuro de la fórmula 7 (273 mg, 0,425 mmol), y la mezcla se agitó a la temperatura de 85 °C en una atmósfera de argón durante 12 horas. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La mezcla de reacción se enfrió a la temperatura del laboratorio, se disolvió en la cantidad mínima de DCM y se añadió gota a gota a la solución de hexano (50 ml) en agitación constante a la temperatura de 0 °C. El precipitado formado se filtró, se disolvió en una cantidad mínima de DCM de nuevo y se añadió gota a gota a la solución de éter dietílico (50 ml), en agitación constante a la temperatura de 0 °C. El precipitado se filtró y se secó al vacío para obtener 281 mg (rendimiento del 73%) del compuesto requerido de la fórmula 9 en forma de polvo de color amarillento.



¹H RMN (500 MHz, cd₃od) δ 7,89 - 7,74 (m, 15H), 7,37 - 7,05 (m, 10H), 6,85 (d, *J* = 8,7, 2H), 6,71 (d, *J* = 8,7, 2H), 4,24 (t, *J* = 5,0, 2H), 3,57 (t, *J* = 5,0, 2H), 3,43 (m, 2H), 2,97 (s, 6H), 2,40 (t, *J* = 7,9, 2H), 1,74 - 1,60 (m, 2H), 1,59 - 1,49 (m, 2H), 1,36 - 1,05 (m, 12H). ESI MS: 744.

Ejemplo 7

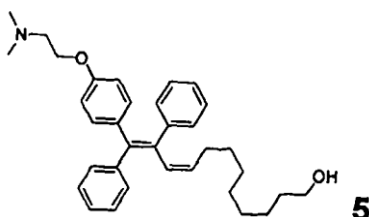
- La aplicación de un procedimiento similar al indicado en el ejemplo 6 permite obtener el compuesto de la fórmula 10 a partir del yoduro de la fórmula 8.



Ejemplo 21

El compuesto de la fórmula 5 se puede obtener directamente a partir del aldehído de la fórmula III por reacción con bromuro de (9-hidroxinonil)trifenilfosfonio en lugar de bromuro de (9-((terc-butildimetilsilil)oxi)nonil)trifenilfosfonio. Dicha síntesis es más corta y más rentable. El cambio principal es el uso de la mezcla de THF y DMSO para aumentar la solubilidad y la reacción se puede realizar directamente con bromuro de (9-hidroxinonil)trifenilfosfonio, que era imposible en el THF real. El procedimiento se realiza a temperatura ambiente en lugar de - 78 °C. Este procedimiento conduce también a una reducción significativa del tiempo total de preparación del compuesto requerido.

10 Preparación del compuesto de la fórmula 5



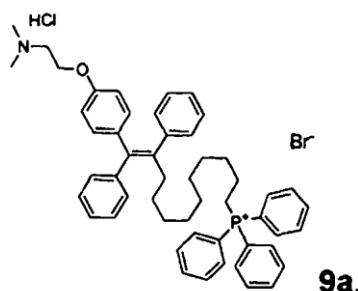
Se disolvió bromuro de (9-hidroxinonil)trifenilfosfonio (3,920 g, 8,082 mmol) en DMSO (10 ml) y después se añadió THF (30 ml). Se añadió gota a gota solución de LiHMDS (14,800 ml, 1 M en THF) a la mezcla de reacción durante 3 minutos. El color de la mezcla de reacción cambió a naranja brillante. Después, se añadió gota a gota una solución de aldehído de la fórmula III (1,000 g, 2,694 mmol) en THF (15 ml) a la mezcla de reacción, y la reacción se agitó durante diez minutos más a temperatura de laboratorio. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La mezcla de reacción se vertió en una solución fría saturada de cloruro de amonio (100 ml) y se extrajo con éter dietílico (5 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio. El desecante se filtró y el producto se concentró al vacío. La materia prima se disolvió en éter dietílico (10 ml) y se añadió gota a gota una solución saturada de éter de HCl (5 ml). El producto precipitado se filtró y se extrajo con una solución de NaOH (5 ml, 1 M) y éter dietílico (25 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio. El desecante se filtró y el producto se concentró al vacío para producir 1.102 g (82%) del producto de la fórmula 5 en forma de un aceite de color ligeramente amarillento que estaba así listo para reacciones adicionales.

Ejemplo 22

A partir del compuesto de la fórmula 6, es posible preparar el compuesto de la fórmula 9a (clorhidrato de amina terciaria) sin la necesidad de aislar el compuesto 7. El tiempo de preparación se reduce y el rendimiento es mayor.

Preparación del compuesto de la fórmula 9a

Se añadió una solución de éter saturada de HCl (6 ml) al alcohol de la fórmula 6 (300 mg, 0,600 mmol) disuelto en éter dietílico (6 ml). La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en DCM (6 ml). Se añadió CBr₄ (298 mg, 0,901 mmol) a la mezcla de reacción y, después de su completa disolución, se añadió trifenilfosfina (252 mg, 960 mmol). La reacción se interrumpió después de 5 minutos con la adición de metanol (1 ml) y una solución saturada de éter de HCl (3 ml). La solución se concentró al vacío y se añadió trifenilfosfina (2,000 g, 7,625 mmol). La mezcla de reacción se mezcló durante una noche a la temperatura de 100 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y luego se disolvió en DCM (10 ml). Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se disolvió en DCM (10 ml) y se añadió gota a gota a un éter dietílico frío y agitado vigorosamente (100 ml). El precipitado se filtró y se secó al vacío para producir 334 mg del producto (74%) de la fórmula 9a en forma de un sólido de color blanco, ligeramente aceitoso. El producto se puede volver a purificar mediante disolución recurrente en DCM (2 ml) y la posterior precipitación en éter dietílico (20 ml).



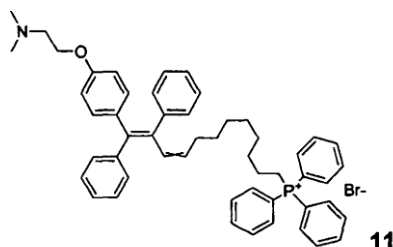
Ejemplo 23

5 Preparación del compuesto de la fórmula 11- derivado isomérico de alquencil trifenilfosfonio de tamoxifeno

Se preparó bromuro de nonan-1,9-diilbis(trifenilfosfonio) a partir de 1,9-dibromnonano y la mezcla de trifenilfosfina se agitó en la solución de dimetilformamida a la temperatura de 100 °C durante 16 horas y posterior cristalización en acetato de etilo.

10

Se disolvió bromuro de nonan-1,9-diilbis(trifenilfosfonio) (545 mg, 674 mmol) en DMSO (1 ml) y después se añadió THF (3 ml). Se añadió gota a gota una solución de LiHMDS (670 μ l, 1 M en THF) a la mezcla de reacción durante 3 minutos. El color de la mezcla de reacción cambia a naranja brillante. Después, se añadió gota a gota una solución de aldehído de la fórmula III (100 mg, 0,269 mmol) en THF (1 ml) a la mezcla de reacción y la reacción se agitó durante diez minutos más a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló con TLC en la mezcla de cloroformo - metanol (10:1). La mezcla de reacción se vertió en una solución fría saturada de cloruro de amonio (10 ml) y se extrajo con diclorometano (5 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio. El desecante se filtró y el producto se concentró al vacío. La cromatografía del concentrado en la columna de gel de sílice en el sistema de cloroformo/metanol (gradiente del 0-10%) produjo 56 mg (30%) del producto requerido de la fórmula 11.



^1H RMN (400 MHz, cdCl_3) δ 8,00 -7,52 (m, 15H), 7,25 - 7,11 (m, 6H), 7,11 - 6,96 (m, 4H), 6,72 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,53 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,00 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 5,26 (dt, $J = 11,5, 7,4$ Hz, 1H), 4,02 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 3,80 - 3,53 (m, 2H), 2,88 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H), 2,42 (s, 6H), 2,06 - 1,79 (m, 2H), 1,64 - 1,36 (m, 4H), 1,38 - 1,05 (m, 4H), 1,06 - 0,73 (m, 4H). ESI MS: 742.

30 Ensayos biológicos del derivado alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno mitocondrialmente dirigido (MitoTAX), estudio comparativo con tamoxifeno (TAX)

Los siguientes ejemplos 8-20 se realizaron con la sustancia MitoTAX de la fórmula general I, donde $n = 10$.

Ejemplo 8

35

MitoTAX preparado según el ejemplo 6 se ensayó para determinar su efecto sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Líneas con diferentes niveles de expresión de proteínas HER2 y receptores de estrógeno α . Se usaron (ER α). La línea celular MCF7 presenta una expresión relativamente baja de la proteína HER2. Para la prueba de destrucción de células de cáncer de mama con diferentes niveles de proteína HER2 por MitoTAX, se prepararon 40 células HER2 y HER $^+$ MCF7. Las células MCF7 se transfectaron con el vector con una secuencia "no silenciadora" (NS), con una secuencia "de horquilla corta" que atenuaba la expresión de HER2 (sh) y con el vector con un gen

para HER2. La figura 2 muestra la expresión de la proteína HER2 en diversas sublíneas utilizando el método de inmunoblot. En el trabajo posterior, se utilizaron las sublíneas NS, Sh1 26 (clon 26) y +11 (clon 11).

Ejemplo 9

5

Se evaluaron los valores de CI_{50} para TAX y MitoTAX para diversas líneas celulares de cáncer de mama. Los valores individuales se determinaron a partir de las curvas de supervivencia de las células a diversas concentraciones de ambas sustancias utilizando el método del cristal violeta. Se usaron líneas celulares con diversos niveles de la proteína HER2 y ER α ER α ⁺/HER2^{low} (MCF7_{par}), ER α ⁺/HER2⁺ (MCF7_{HER2+}, BT474, NeuTL -
10 línea murina de cáncer de glándula mamaria), ER α ⁺/HER2⁻ (MCF7_{HER2-}, T47D, ZR75-1), ER α /HER2⁺ (SK-BR-3), ER α /HER⁻ (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-436). A partir de la tabla I, resulta evidente que el valor de CI_{50} es significativamente menor para MitoTAX, aproximadamente en un orden de magnitud. La más sensible es la sublínea MCF7_{HER2+} con el genotipo ER α ⁺/HER2⁺. Las líneas correspondientes con el genotipo ER α ⁺/HER2⁻(MCF7_{HER2-}) y ER α ⁺/HER2^{low} (MCF7_{par}) presentan valores de CI_{50} que son aprox. dos veces más altos, lo que apunta al hecho de
15 que el aumento del nivel de proteína HER2 conduce a un aumento en la sensibilidad a MitoTAX. Por otro lado, y al contrario que con MitoTAX, la sensibilidad de las células con alta HER2 al TAX disminuye. Esto indica una propiedad única de MitoTAX que (hasta donde se sabe) no se ha notificado por ninguna otra sustancia anticancerosa.

Tabla I. Valores de CI_{50} (μ M) para líneas celulares de cáncer de mama con diferentes expresiones de la proteína HER2 y ER α .

20

Línea celular	Estado	TAX	MitoTAX
MCF7 _{par}	ER α ⁺ /HER2 ^{low}	15,2	1,25
MCF7 _{HER2-}	ER α ⁺ /HER2 ⁻	14,1	1,45
MCF7 _{HER2+}	ER α ⁺ /HER2 ⁺	21,6	0,65
T47D	ER α ⁺ /HER2 ⁻	17,3	3,4
MDA-MB-231	ER α /HER ⁻	35,8	6,2
MDA-MB-453	ER α /HER ⁻	17,5	2,5
MDA-MB-436	ER α /HER ⁻	12,6	3,4
ZR75-1	ER α ⁺ /HER2 ⁻	16,9	2,7
SK-BR-3	ER α /HER2 ⁺	28,3	3,5
BT474	ER ⁺ /HER2 ⁺	29,8	2,4
NeuTL	ER α ⁺ /HER2 ⁺	35,6	4,5

Ejemplo 10

También se investigó si MitoTAX suprime el crecimiento de tumores. La eficacia anticancerosa de MitoTAX se probó
25 utilizando la cepa de ratón transgénico FVB/N *c-neu* que nace sin tumores y que en la edad adulta aumenta la expresión de la proteína HER2 debido a la acción del estrógeno (Guy CT et al. Expression of the neu proto-oncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:10578-10582.). Estos ratones desarrollan displasia y luego hiperplasia en la región de la glándula mamaria a los 3 a 4 meses después del nacimiento y forman tumores palpables después de 6 meses. Es importante destacar que
30 esto ocurre en el contexto del sistema inmunológico funcional. Este modelo de cáncer de mama (glándula mamaria) es una muy buena aproximación del cáncer de mama humano con un alto nivel de proteína HER2 del tipo "ductal *in situ*". Estos resultados (Figura 3) indican una muy buena eficacia de MitoTAX en el crecimiento de estos tumores. A los ratones se les administró una dosis de 3 μ mol de TAX y 0,5 μ mol de MitoTAX dos veces por semana durante dos semanas. El volumen de los tumores se cuantificó utilizando imágenes de ultrasonido que pueden visualizar tumores
35 con alta precisión y de forma no invasiva, incluidas las partes incrustadas. Resulta evidente que MitoTAX es aproximadamente 20 a 30 veces más eficiente que el TAX, y las diferencias entre la acción de ambos agentes son altamente significativas. El símbolo "*" indica diferencias significativas entre los animales tratados y de referencia, el símbolo "***" indica diferencias significativas entre los animales tratados con TAX y los tratados con MitoTAX. No se observó toxicidad aparente en los animales experimentales. Las fotografías debajo de la tabla muestran tumores
40 representativos de grupos individuales de animales.

Ejemplo 11

Un aspecto importante de MitoTAX es su mayor actividad supresora del crecimiento hacia las líneas con expresión
45 aumentada del oncogén HER2. Esto se muestra en la figura 4, que también documenta que la línea con expresión reducida del oncogén HER2 (clon 26) es menos sensible a MitoTAX, mientras que es exactamente lo opuesto a TAX. Para estos experimentos, también se preparó una sublínea MCF7 resistente al TAX mediante la exposición a

largo plazo de las células MCF7 parentales a dosis crecientes de TAX. Es posible ver que estas células, resistentes al TAX, eran sensibles a MitoTAX (figura 4). Los resultados en la figura 4 ilustran la supervivencia de las sublíneas de cáncer de mama derivadas de células MCF7 con diversos genotipos ($ER\alpha^+/HER2^{low}$, MCF7_{par}; $ER\alpha^+/HER2^+$, MCF7^{HER2+} - clon 26; $ER\alpha^+/HER2^-$, MCF7^{HER2-} - clon 11; $ER\alpha^+/HER2^{low}$, MCF7^{TAX-R}). Los resultados se obtuvieron mediante el método del cristal violeta, que permite discriminar las células vivas y muertas, en presencia de diversas concentraciones de MitoTAX y TAX.

Ejemplo 12

Una característica importante de las sustancias anticancerosas que causan la muerte de las células cancerosas es el modo de muerte celular. Por esta razón, se ensayó si MitoTAX causa apoptosis, es decir, la muerte celular programada cuando una célula muere de forma controlada y sus cuerpos apoptóticos residuales son eliminados del tejido por células fagocíticas sin reacciones inflamatorias. La figura 5 muestra que el agente, de hecho, causó la apoptosis. La apoptosis se evaluó sobre la base de la evaluación del porcentaje de células con anexina V en la parte externa de la membrana plasmática mediante citometría de flujo. Una vez más, los resultados documentan una mayor eficacia de MitoTAX para las células con alto contenido de proteína HER2, mientras que las células con un nivel reducido de proteína HER2 son más resistentes (aunque aún experimentan apoptosis).

Ejemplo 13

La publicación anterior (Moreira PI et al. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. *J Biol Chem* 2006; 281:10143-10152.) indicó que el objetivo de TAX en la mitocondria es, a un alto nivel del agente, el complejo I. Se ha descubierto que esto también es válido para MitoTAX, que se documenta en la figura 6. Esto se documenta también en el efecto inhibitorio de TAX (a la izquierda) y MitoTAX (a la derecha) en la respiración a través de los complejos mitocondriales I y II. Es posible ver que TAX inhibe preferiblemente el complejo I al complejo II, a concentraciones que exceden los 20 μ M. MitoTAX también inhibe el complejo I preferiblemente al complejo II, pero a concentraciones significativamente más bajas de aproximadamente 1 a 2 μ M. Para estos ensayos, se colocaron células MCF7 en la cámara del instrumento Oxygraf y se determinó la respiración a dosis crecientes de TAX (a la izquierda) y MitoTAX (a la derecha). La respiración (consumo de oxígeno vinculado a la formación de ATP) está relacionada con 10^6 células, y se muestra como un valor relativo con el nivel inicial de respiración marcado con el valor relativo de 1.

Ejemplo 14

Una propiedad asociada típicamente a un número de mitocans es su capacidad para aumentar el estrés oxidativo (formación de especies reactivas de oxígeno, ROS), selectivamente en células cancerosas, especialmente asociadas con su acción sobre complejos mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa. Esto normalmente está relacionado con una disminución en el potencial mitocondrial (Neuzil J et al. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 2013; 13:199-208. Kluckova K et al. Mitochondrial complex II, a novel intriguing target for anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1827:552-564.). También se ensayó la formación de ROS para MitoTAX. La figura 7 muestra la generación de ROS para las sublíneas MCF7 de niveles diferentes de HER2, después de 1 h de exposición a TAX o MitoTAX (ambos a 5 μ M). Es posible ver que el TAX es notablemente menos eficaz en la misma concentración que MitoTAX. Otro hallazgo importante es que MitoTAX induce la formación de más ROS en células con niveles altos de HER2, mientras que una menor producción de ROS se produce en células con baja HER2. TAX no sigue esta tendencia. En todos los casos, el desacoplador de la respiración mitocondrial (CCCP) reduce el potencial mitocondrial a su valor inicial. La figura 8 muestra que MitoTAX (pero no TAX) reduce el potencial mitocondrial ya a la concentración de 5 μ M y en 1 h.

Ejemplo 15

En las células de cáncer de mama con alto nivel de la proteína HER2, la proteína se localiza preferiblemente en las mitocondrias. Esto se muestra en la figura 9, donde se representa el inmunoblot de la línea original MCF7, así como las sublíneas HER2⁺ MCF7 (clon 11), HER2-MCF7 (clon 26), y donde se ve que las sublíneas reales son resistentes a TAX (clon TAM-R). Es posible ver que las células del clon 11 presentan una mayor expresión de la proteína HER2 (marcada con una flecha) en la fracción mitocondrial, citoplasmática (contiene membrana plasmática), así como las fracciones nucleares. La figura inferior muestra la fracción mitocondrial cuando la membrana estuvo expuesta durante un periodo de tiempo más largo, de modo que puede resultar evidente que, en las mitocondrias, aunque a un nivel significativamente más bajo, la proteína HER2 también está presente en las células MCF7 parentales y en las células resistentes al TAX, pero no en las células con HER2 reducido (clon 26). Este sorprendente resultado apoya el trabajo publicado recientemente (Ding Y et al. Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into

mitochondria and regulates cellular metabolism. Nat Commun 2012; 3:1271). Esta publicación también muestra que las células de cáncer de mama con alta expresión de la proteína HER2 localizada predominantemente en las mitocondrias, son resistentes al trastuzumab. Durante la aplicación de trastuzumab a las células cancerosas, se movilizó más proteína HER2 con respecto a las mitocondrias (Ding Y et al. Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism. Nat Commun 2012; 3:1271.). Es posible que las células de cáncer de mama movilicen la proteína HER2 lejos de su superficie (membrana plasmática), de modo que la proteína no pueda verse afectada por trastuzumab. Uno de los resultados de la inhibición de HER2 es la activación de la proteína p27, que es un inhibidor del ciclo celular, que reduce la naturaleza neoplásica de las células (Yang HY, Shao R, Hung MC, Lee MH. p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. Oncogene 2001; 20:3695-3702.). Esto tiene un impacto negativo en las células cancerosas con alto nivel de la proteína HER2, porque las células cancerosas están programadas evolutivamente para mantener un alto estado proliferativo (Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70). Por lo tanto, se puede especular que, dado que la proteína HER2, la diana de trastuzumab, no está presente en la membrana a gran escala, la célula adquirirá resistencia al trastuzumab. Sin embargo, durante este proceso aumentará su sensibilidad a MitoTAX, que puede penetrar en las mitocondrias, lo que destaca aún más su naturaleza excepcional.

Ejemplo 16

Una de las razones para una mayor sensibilidad de las células de cáncer de mama con alto contenido de proteína HER2 es su cambio en la bioenergética y morfología mitocondrial. El alto nivel de la proteína HER2 en las mitocondrias cambia su morfología, así como su función. La figura 10 muestra que las mitocondrias en las células HER2⁺ (clon 11) son aproximadamente dos veces más cortas que las de las células HER2⁻ (clon 26). La longitud mitocondrial se estimó con la ayuda de microscopía confocal de líneas celulares transfectadas por la proteína GFP dirigida mitocondrialmente (que visualiza las mitocondrias mediante fluorescencia verde). La longitud se determinó mediante el análisis de mitocondrias en 50 celdas seleccionadas de manera aleatoria utilizando el software Fiji Freehand Lines Measurement Tools. Esto está relacionado con la reducción de la respiración mitocondrial y se asocia con un potencial mitocondrial más bajo y una mayor producción de lactato (un síntoma de un cambio hacia el metabolismo glucolítico aerobio) (figura 11). Se muestra que, en este caso, las células con niveles elevados de proteína HER2 producen aproximadamente el doble de lactato que las células precursoras y las células con niveles reducidos de proteína HER2. En el caso de la respiración, es exactamente lo opuesto. Las células con niveles elevados de proteína HER2 respiran menos (la producción de ATP se asocia con un menor consumo de oxígeno). Una mayor proporción de la glucólisis en la generación de ATP para las células que presentan un mayor nivel de proteína HER2 se asocia también con su mayor captación de glucosa (figura 12).

35 Ejemplo 17

Otra posible razón para el aumento de la sensibilidad de las células HER2⁺ con altos niveles de proteína HER2 a MitoTAX es el efecto de este agente en el receptor de estrógeno ER α , que tiene efectos antiapoptóticos (Thomas C, Gustafsson J. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer 2011; 11:597-608. Deblouis D, Giguere V. Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond. Nat Rev Cancer 2013; 13:27-36.). Esto se muestra en la Figura 13, donde es posible ver que MitoTAX reduce la expresión de ER α ya a una concentración de 1 μ M aproximadamente tres veces, mientras que TAX es ineficaz. Estos resultados se obtuvieron utilizando la metodología de PCR en tiempo real.

45 Ejemplo 18

La alta eficacia mencionada anteriormente de MitoTA contra tumores con alta expresión de la proteína HER2 en la cepa murina FVB/N *c-neu* es de gran importancia. Este tumor, que corresponde a tumores humanos con alta expresión de la proteína HER2, se analizó para determinar la expresión de la proteína HER2 y varios genes diferentes. La figura 14 muestra un ratón FVB/N *c-neu* representativo con un tumor (la figura superior a la izquierda) y también el tumor extirpado (la figura en la esquina inferior izquierda). Los resultados del análisis del tumor mediante inmunoblot documentan que el tumor contiene un alto nivel de proteína HER2, que es casi indetectable en el tejido normal de la glándula mamaria. La figura también muestra los resultados del análisis de las fracciones mitocondrial (Mito) y citosólica (Cyto). Los anticuerpos contra proteínas específicas se utilizan como marcadores para la fracción mitocondrial. Resulta evidente que la mayoría absoluta de la proteína HER2 está localizada en las mitocondrias. Estos resultados obtenidos de un tumor experimental corresponden a resultados de células de cáncer de mama con alta expresión de HER2.

Ejemplo 19

60

Se ha demostrado recientemente en tumores renales que el mismo tumor contiene áreas que difieren en su perfil de mutación (Gerlinger M et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-892.). La heterogeneidad tumoral (Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:791-799.), y este fenómeno también se identificó en el caso de los carcinomas de mama. Esto se relaciona, de manera interesante, con el hallazgo de que los tumores espontáneos de la glándula mamaria en el ratón transgénico FVB/N *c-neu* contienen áreas con diferentes expresiones de varios genes importantes a nivel de ARNm, lo que puede afectar considerablemente al tratamiento del cáncer de mama. Esto se refiere a los genes ERa, HER2, Ki67, un marcador de proliferación que es mayor en el caso de niveles más altos de HER2) y GATA3 (activador de transcripción que afecta positivamente a la expresión de HER2). Esto se muestra en la figura 15. En este experimento, dos tumores se dividieron en varias partes, que se analizaron usando PCR en tiempo real para la expresión de los genes mencionados anteriormente. Los resultados ilustran la expresión muy diferente de los genes en las áreas individuales del tumor, variando hasta 5 veces. Otra prueba de la expresión diferente del gen HER2 en partes individuales del tumor en los ratones FVB/N *c-neu* experimentales se muestra en las siguientes figuras, donde es posible ver la morfología del tumor sobre la base de la tinción con hematoxilina y eosina (figura 16), así como un análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína HER2 (figura 17). Estas diferencias inequívocas corresponden a una expresión diferente de HER2 en partes individuales del tumor a nivel de ARNm y son consistentes con los datos publicados sobre la heterogeneidad intratumoral (Gerlinger M et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-892. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:791-799.). La figura 17 muestra que hay diferencias muy grandes en la expresión de la proteína HER2 entre la parte externa del tumor (parte 1a), la parte media (parte 1b) y la parte interna (parte 1c). Esto significa que algunas áreas tumorales serán resistentes a la terapia con TAX (áreas con alta expresión de proteína HER2), otras serán resistentes a la terapia con trastuzumab (áreas con niveles bajos de proteína HER2). Además, es posible esperar que la acción del trastuzumab esté acompañada por una mayor transferencia de la proteína HER2 a las mitocondrias, por lo que las áreas tumorales con alta expresión de la proteína HER2 adquieren resistencia a este tipo de terapia. Por otro lado, MitoTAX, que actúa sobre las mitocondrias y destruye las células que presentan una alta expresión de la proteína HER2 de manera más eficiente que las células con una baja expresión de esta proteína, es capaz de hacer frente a las áreas de tumores resistentes al trastuzumab.

30 Ejemplo 20

MitoTAX, que destruye eficazmente las células de cáncer de mama, también es eficaz contra otros tipos de células de cáncer. Esto se muestra en la tabla 2, donde es posible ver los valores de CI_{50} para MitoTAX y TAX para destruir diversos tipos de cáncer, incluidos carcinomas, sarcomas y leucemias. Los valores de CI_{50} fueron más bajos para MitoTAX que para TAX en todos los casos.

Tabla 2

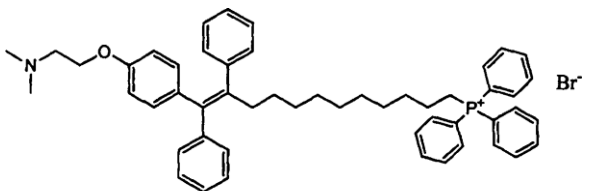
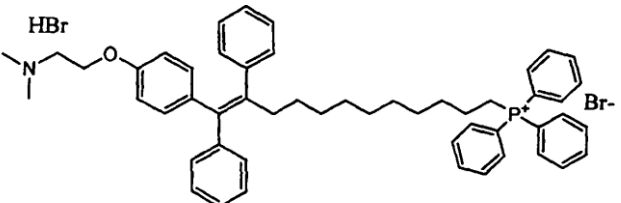
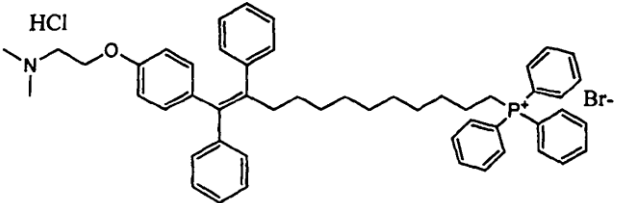
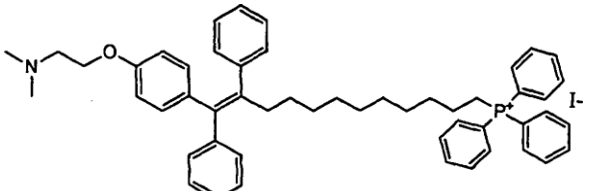
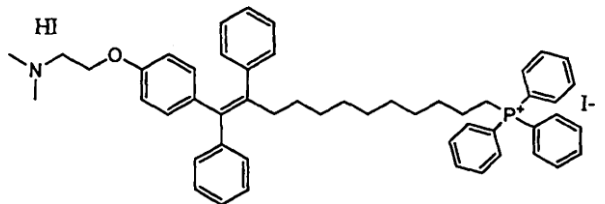
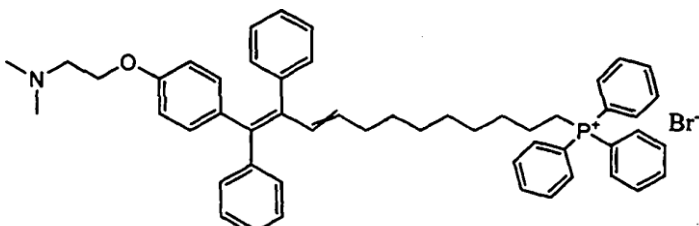
Línea celular - tipo de tumor	TAX	MitoTAX
1321 n1 - astrocitoma	17,97	1,54
SHSY5Y - neuroblastoma	11,16	1,76
U87 - glioblastoma	32,44	1,96
H28 - mesotelioma	39,74	2,53
LnCAP - cáncer de próstata	36,70	0,86
H1299 - cáncer de pulmón de células no pequeñas	38,53	1,80
Hela - cáncer de cuello del útero	30,28	2,68
MG-63 - osteosarcoma	19,94	1,47
HCT116 - cáncer colorrectal	28,91	1,81
HepG2 - hepatocarcinoma	17,56	1,05
MOLT-4 - leucemia	12,9	0,37

40 Ejemplo 24

La Figura 18 muestra la inducción de la apoptosis por el efecto de los derivados de alquil y alqueniil trifenilfosfonio de MitoTAX, como se documenta en la tabla 3, en las células de cáncer de mama MCF7 (A) y la sublínea de células MCF7 con un aumento del nivel de proteína HER2 (B). El porcentaje de células apoptóticas se determinó utilizando el ensayo de apoptosis específico basado en la evaluación del nivel de anexina V externalizada mediante el uso de citometría de flujo. Las células MCF7 y MCF7 HER2⁺ se expusieron a derivados de MitoTAX individuales a la concentración de 2 μ M durante 24 h. La columna "CTRL" indica el porcentaje de células apoptóticas en la población

celular sin la adición de las sustancias analizadas, y, por lo tanto, corresponde al nivel inicial de apoptosis. Todos los derivados ensayados de MitoTAX indujeron la apoptosis.

Tabla 3

<p>El compuesto de la fórmula 9</p>	
<p>El compuesto de la fórmula 9a</p>	
<p>El compuesto de la fórmula 9b</p>	
<p>El compuesto de la fórmula 10</p>	
<p>El compuesto de la fórmula 10a</p>	
<p>El compuesto de la fórmula 11</p>	

5

En conclusión, es posible resumir que se han preparado compuestos completamente nuevos que se basan en TAX, que es un fármaco de uso frecuente para el tratamiento del cáncer de mama, es decir, una enfermedad con una

incidencia creciente (DeSantis C et al. Breast cancer statistics, 2011. CA Cancer J Clin 2011; 1:409-4018.). Los derivados de alquil y alquenil trifenilfosfonio de tamoxifeno (MitoTAX) descritos anteriormente según la invención se acumulan preferiblemente en las mitocondrias, donde se localiza su sitio diana, el complejo mitocondrial I. La interacción de MitoTAX con el complejo I dará como resultado una interrupción del flujo de electrones que después interactúan con el oxígeno molecular. Esto conduce a la formación mejorada de ROS que, a su vez, desencadena la muerte celular. MitoTAX es eficaz para el cáncer de mama con niveles tanto bajos como altos de la proteína HER2 que complica considerablemente los métodos de tratamiento existentes. Por lo tanto, MitoTAX puede complementar o reemplazar tanto el TAX como el trastuzumab en las terapias contra el cáncer.

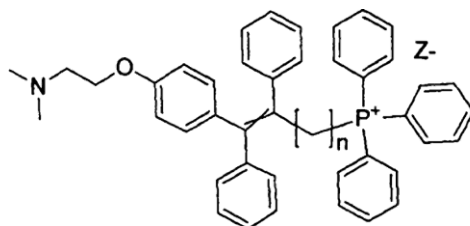
10 Uso de la invención

Los nuevos derivados de tamoxifeno, de las fórmulas generales I y IA según la invención, son aplicables para el tratamiento del cáncer en el entorno clínico y en la industria farmacéutica para la preparación de fármacos para el tratamiento eficaz del cáncer.

15

REIVINDICACIONES

1. Isómeros E y Z dirigidos mitocondrialmente con una cadena alifática marcada con trifenilfosfonio derivado de tamoxifeno, donde la cadena alifática es alquilo o alqueno, y sus correspondientes sales de aminas terciarias, seleccionadas de un grupo de sales orgánicas, tales como citrato, acetato, lactato, tartrato, oxalato, ascorbato, mesilato, tosilato o sales inorgánicas como, por ejemplo, sulfato, halogenuro, fosfato y/o su mezclas, los derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno tienen la fórmula general I,

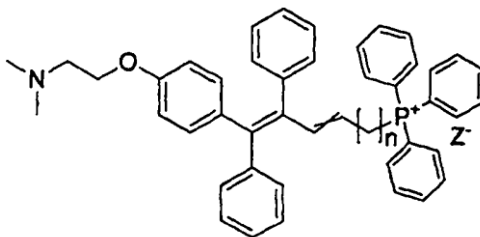


I,

10

donde $n = 8$ a 12 , y donde Z se selecciona de un grupo de sales orgánicas, tales como citrato, acetato, lactato, tartrato, oxalato, ascorbato, mesilato, tosilato o sales inorgánicas, tales como sulfato, halogenuro o fosfato y en la que el doble enlace cruzado en la fórmula general I, situado en el resto de tamoxifeno, indica que el doble enlace puede tener una configuración E y/o Z

- 15 y los derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno tienen la fórmula general IA,



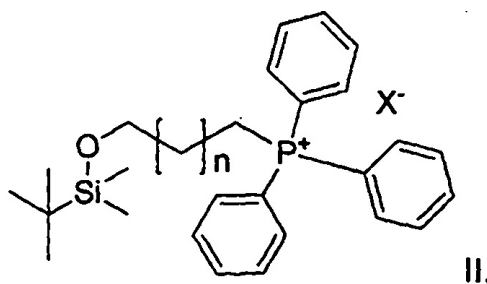
IA

donde $n = 6$ a 10 , y donde Z tiene el significado indicado anteriormente

- 20 y en la que el doble enlace cruzado en la fórmula general IA, situado en la cadena lateral indica que el doble enlace puede tener una configuración E y/o Z.

2. Un método de preparación de derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general I según la reivindicación n.º 1, **caracterizado porque** el iluro generado a partir de terc-butildimetilsilil-oxi-alquil-

- 25 trifenilfosfonio de la fórmula general II,

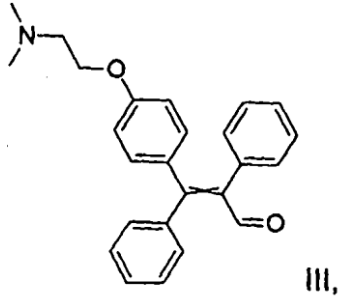


II,

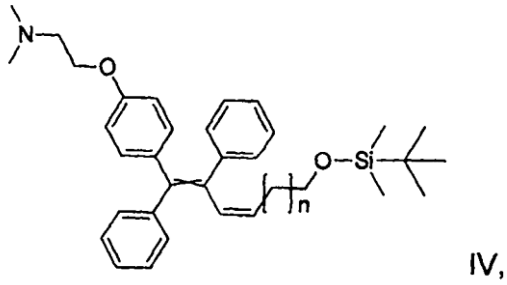
donde $n = 5$ a 9

- 30 y X es I, Br, Cl o mesilo,

bajo el tratamiento de la base orgánica en tetrahidrofurano en una atmósfera de argón a una temperatura de -78 °C, se condensa con el aldehído de la fórmula III,



proporcionando el derivado sililado de la fórmula general IV,

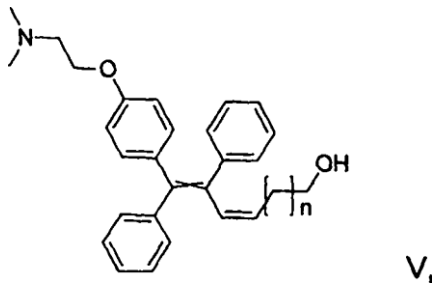


5

donde $n = 5$ a 9 ,

y el derivado sililado de la fórmula general IV se trata con fluoruro de tetrabutilamonio que proporciona alquenol de la fórmula general V,

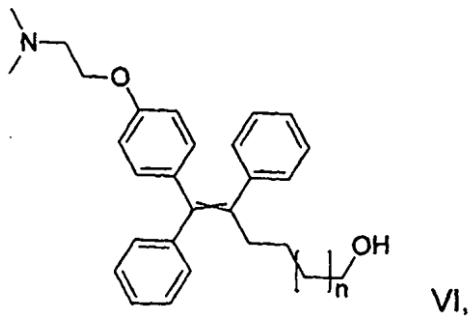
10



donde $n = 5$ a 9 ,

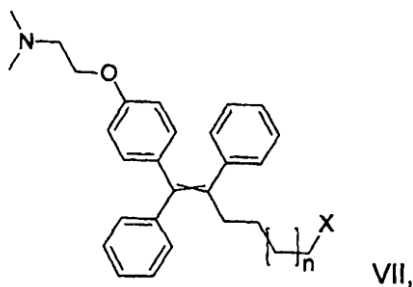
que se reduce en la atmósfera de hidrógeno en presencia de un catalizador para dar alcohol de la fórmula general VI,

15



donde $n = 5$ a 9 ,

el alcohol de la fórmula general VI se sustituye por el derivado apropiado de la fórmula general VII,

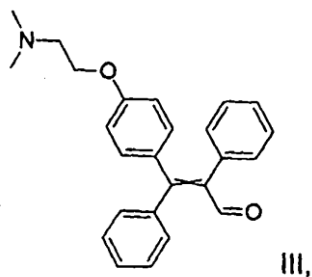


5 donde $n = 5$ a 9
y X es I, Br, Cl o mesilo,

que se convierte en el derivado de alquil trifenilfosfonio dirigido mitocondrialmente de tamoxifeno de la fórmula general I por calentamiento con trifenilfosfina.

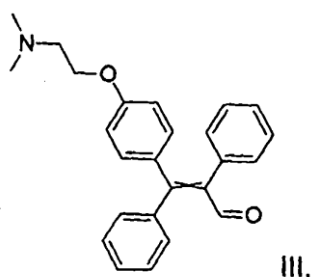
10

3. Un método de preparación de derivados de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general I según la reivindicación n.º 1 **caracterizado porque** el bromuro de (hidroxialquil)trifenilfosfonio correspondiente se trata con una base y se condensa con el aldehído de la fórmula III



15

a temperatura ambiente en la mezcla de tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido, proporcionando el alquenol de la fórmula general V,

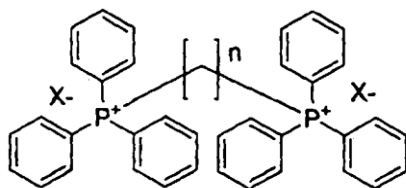


20

a partir del cual el derivado de alquil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general I se obtiene usando el método descrito en la reivindicación n.º 2.

25 4.

Un método de preparación del derivado de alquenil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general IA según la reivindicación n.º 1, **caracterizado porque** el iluro generado a partir de alquil bis(trifenilfosfonio) con la fórmula general XII



XII,

donde $n = 7$ a 11

y X es I, Br, Cl o mesilo o su combinación,

5

en la mezcla de tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido en una atmósfera de argón a temperatura ambiente bajo el tratamiento de la base orgánica, se condensa posteriormente con el aldehído de la fórmula III proporcionando los derivados de alquenil trifenilfosfonio de tamoxifeno de la fórmula general IA.

10 5. Uso del isómero E y/o Z dirigido mitocondrialmente del derivado de trifenilfosfonio alifático de tamoxifeno o su mezcla de la fórmula general I y/o IA para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

6. Uso según la reivindicación n.º 5 para la preparación de un fármaco para el tratamiento de carcinoma, sarcoma, linfoma y leucemia.

15

7. Uso según la reivindicación n.º 5 para la preparación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades neoplásicas incluyendo, pero sin limitación: astrocitoma, neuroblastoma, glioblastoma, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello del útero, osteosarcoma, cáncer colorrectal, hepatocarcinoma, leucemia.

20

8. Uso del isómero E y/o Z dirigido mitocondrialmente del derivado trifenilfosfonio alifático de tamoxifeno o su mezcla de la fórmula general I y/o IA para la preparación de un fármaco para destruir células cancerosas en diversas regiones de tumores de mama, independientemente de los diferentes niveles de expresión de las proteínas HER2, ER α , GATA3 o Ki67.

25

9. Uso del isómero E y/o Z dirigido mitocondrialmente del derivado de trifenilfosfonio alifático de tamoxifeno o su mezcla de la fórmula general I y/o IA para la preparación de un fármaco para la supresión del receptor de estrógenos ER α .

30 10. Uso del isómero E y/o Z dirigido mitocondrialmente del derivado de trifenilfosfonio alifático de tamoxifeno o su mezcla de la fórmula general I y/o IA para la preparación de un fármaco para la inhibición de la respiración a través del complejo mitocondrial I.

11. Un fármaco para el tratamiento de enfermedades neoplásicas **caracterizado porque** contiene al menos un isómero E/Z del derivado de trifenilfosfonio alifático de tamoxifeno de la fórmula general I y/o IA, según la reivindicación n.º 1.

12. Un fármaco según la reivindicación n.º 11, **caracterizado porque** la enfermedad neoplásica es cáncer de mama con niveles altos de proteína HER2.

40

13. Un fármaco según la reivindicación n.º 11, **caracterizado porque** la enfermedad neoplásica es cáncer de mama con niveles bajos de proteína HER2.

14. Un fármaco según la reivindicación n.º 11, **caracterizado porque** es eficaz contra las enfermedades neoplásicas distintas del cáncer de mama con niveles de proteína HER2 bajos y altos.

45

Fig 1.

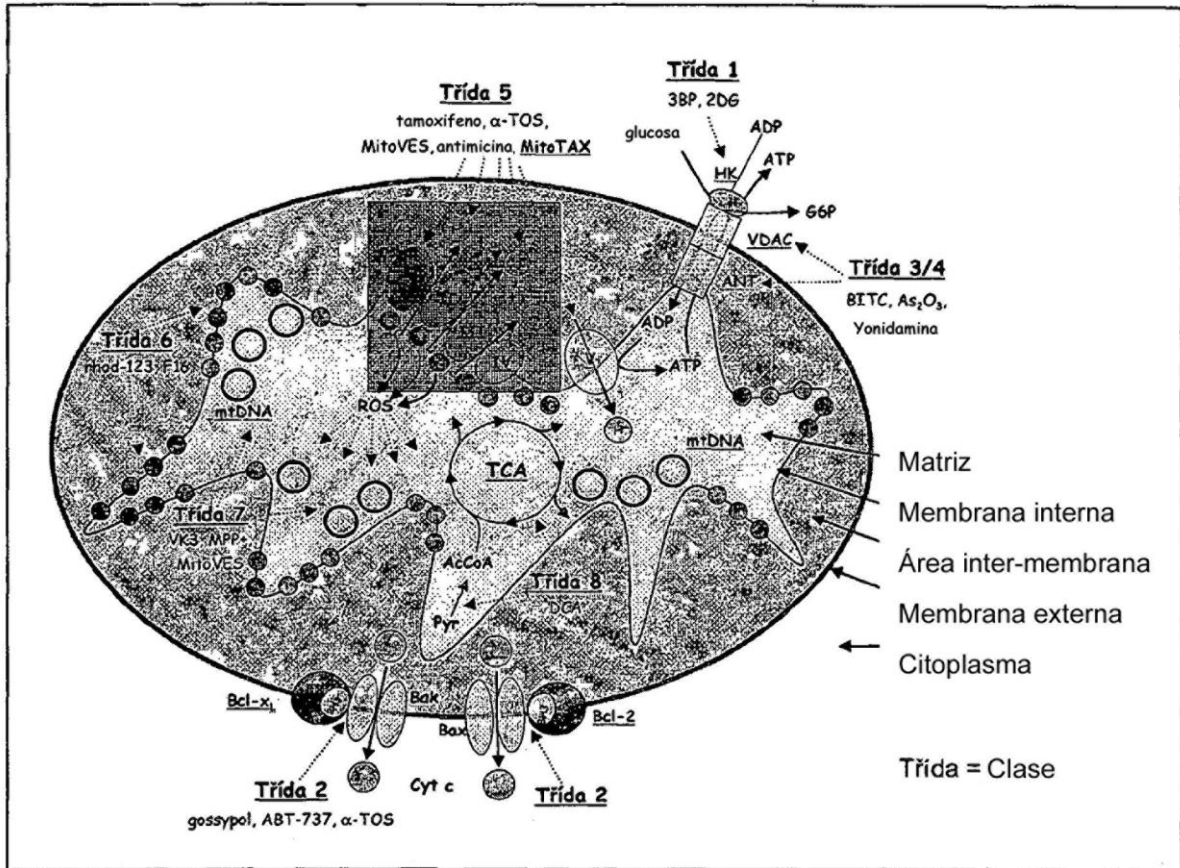


Fig. 2.

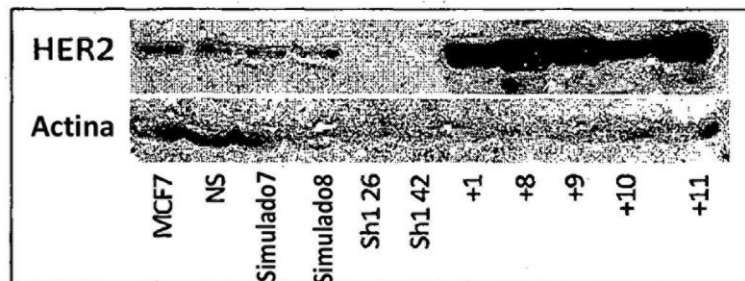


Fig. 3

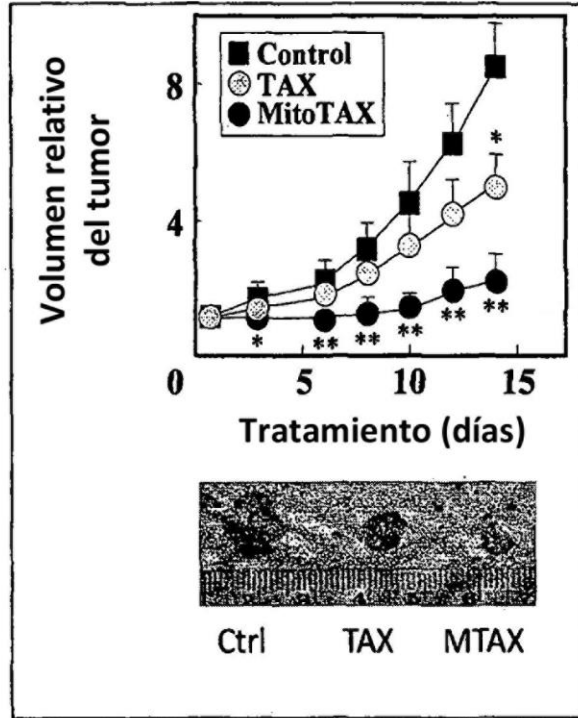


Fig. 4

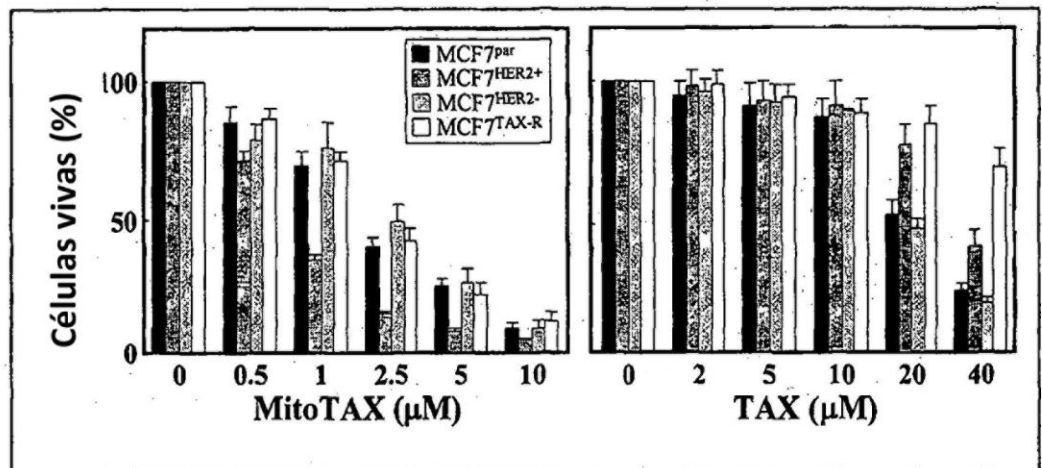


Fig. 5

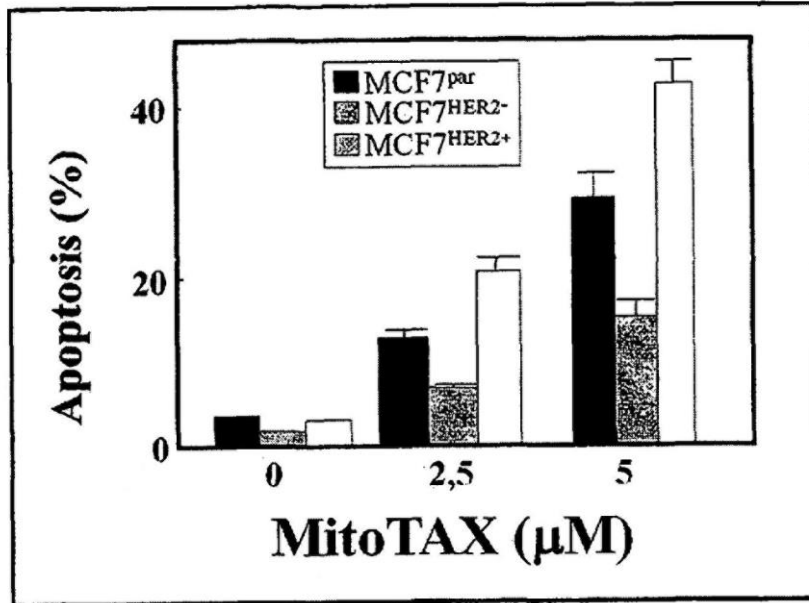


Fig. 6

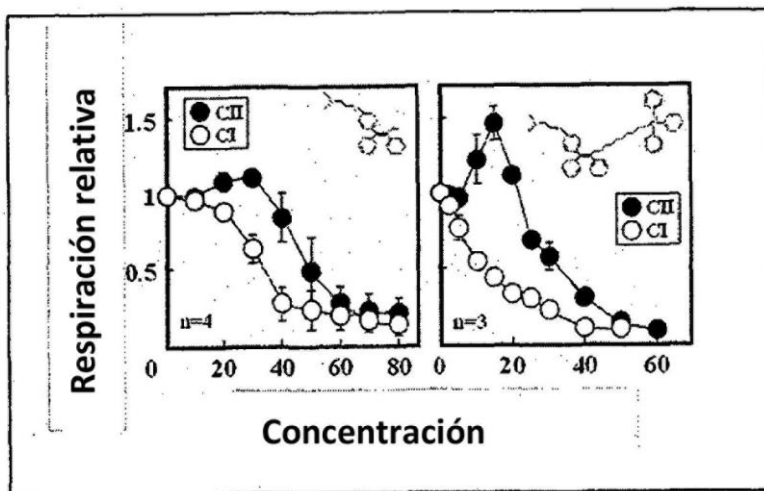


Fig. 7.

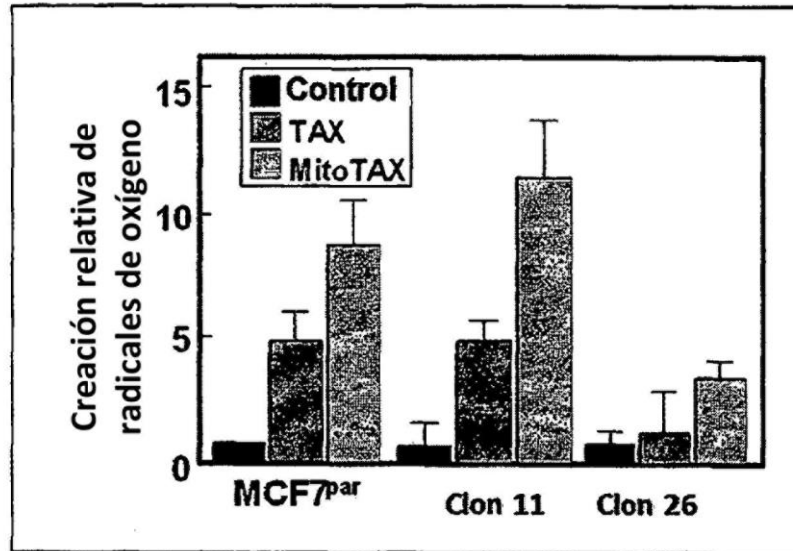


Fig. 8.

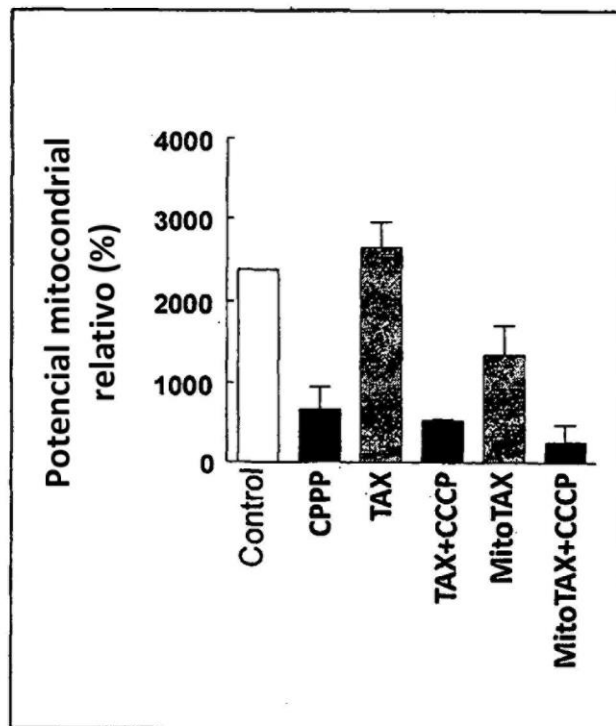


Fig. 9

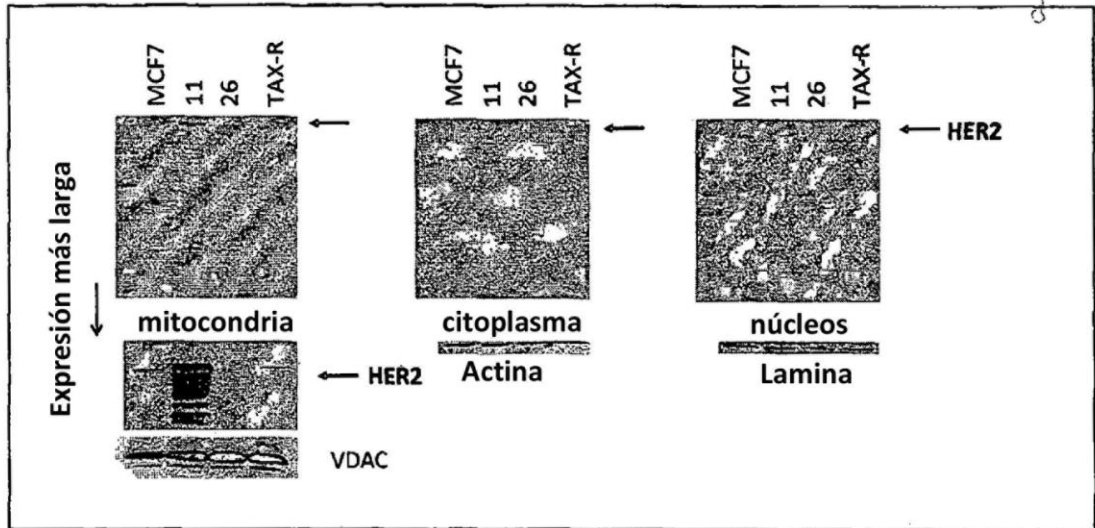


Fig. 10

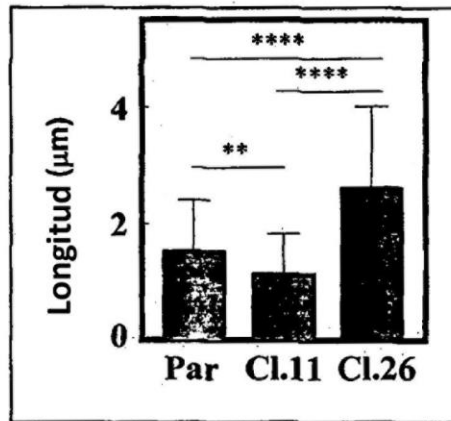


Fig. 11

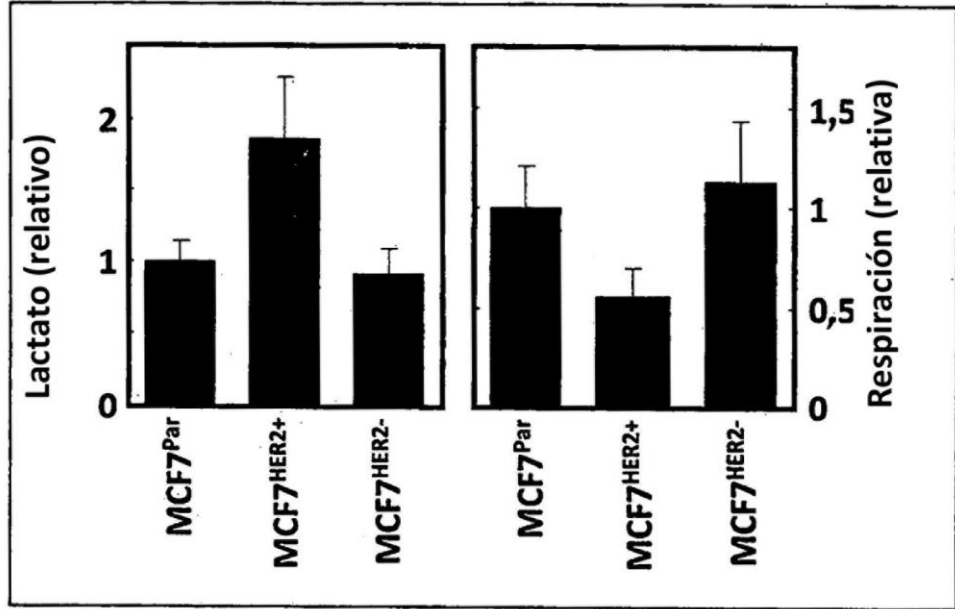


Fig. 12

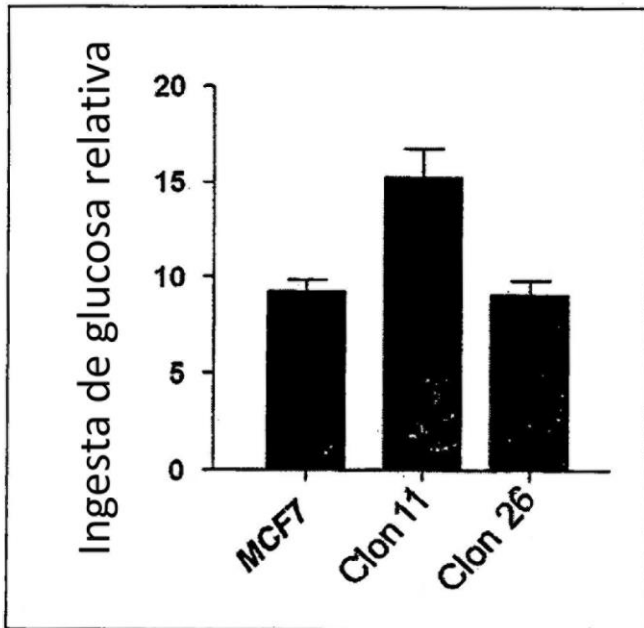


Fig. 13

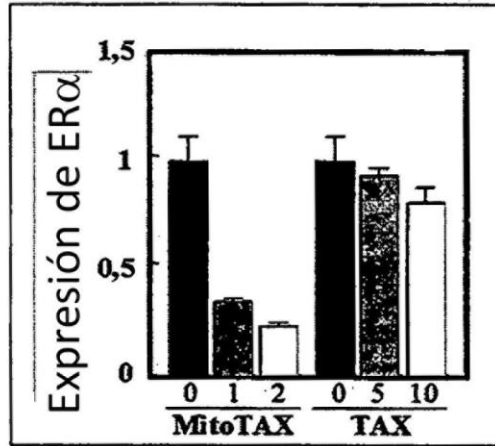


Fig. 14

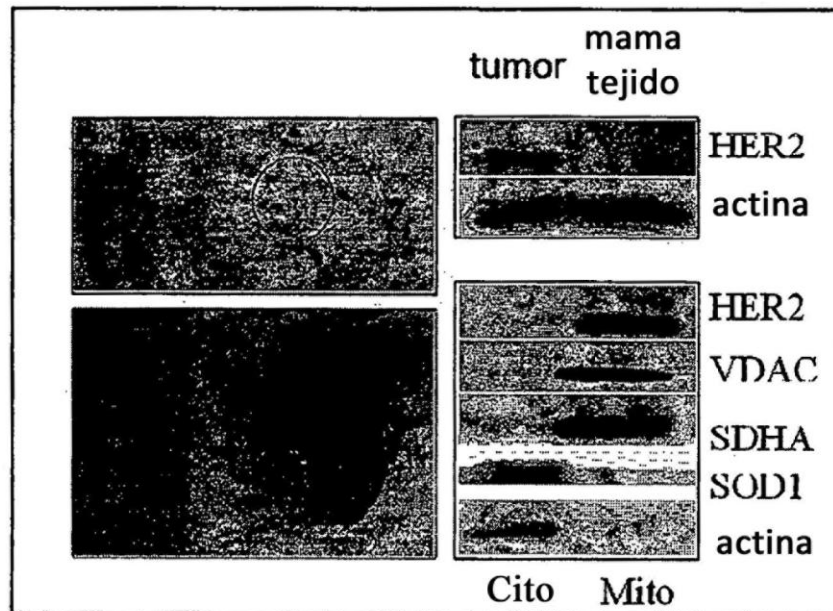


Fig. 15

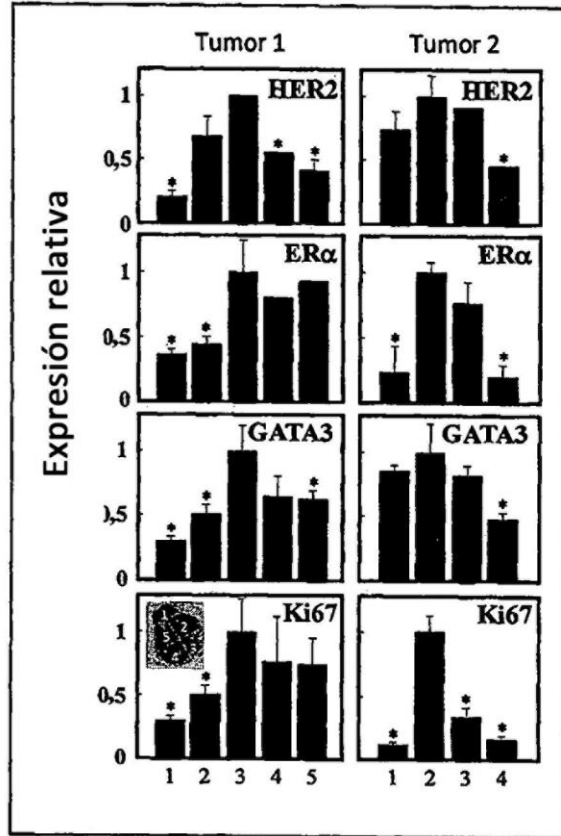


Fig.16

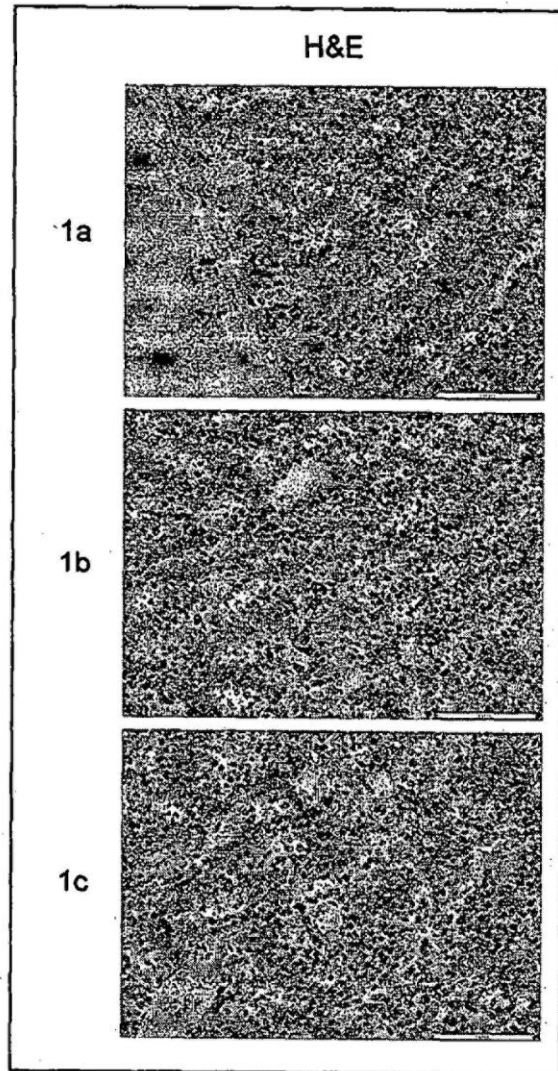


Fig. 17

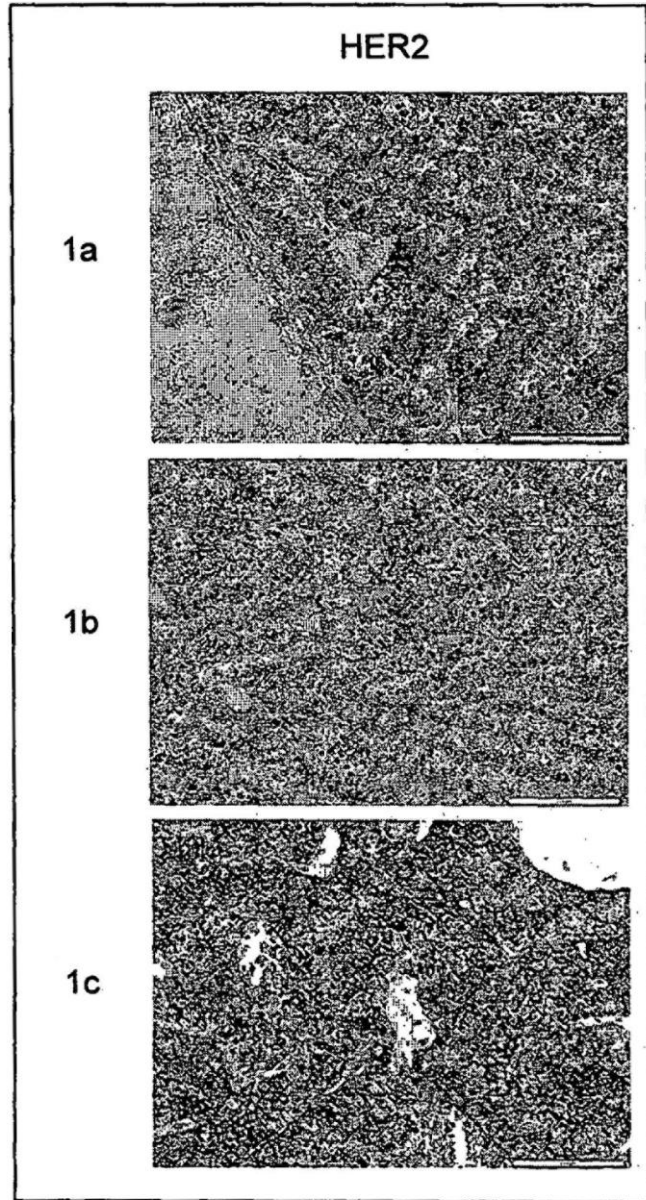


Fig.18

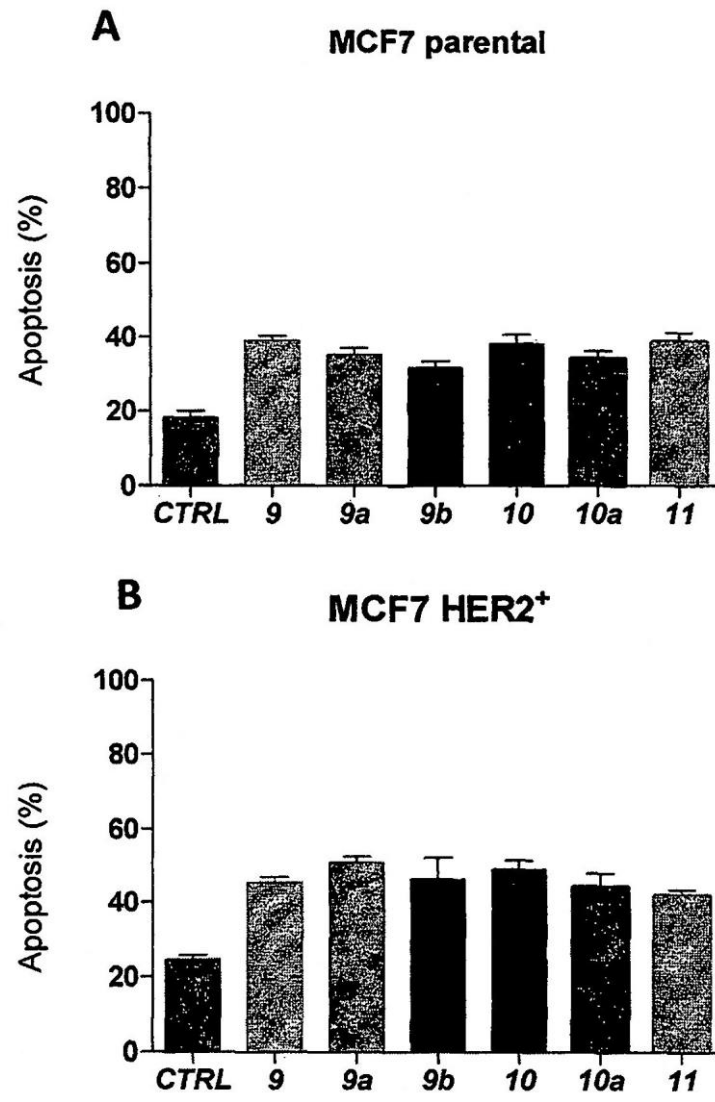


Fig. 19

