

2f



Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No 07-22394

54 TITULO 6"H [1] BENZOPIRANO [4,3 b] QUINOLINAS, Y SU USO
COMO AGENTES ESTROGENICOS

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 31/47
A61P 35/00

71 SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, Estados Unidos

74 APODERADO Alvaro Correa Ordoñez
TP No 20281

22 BOGOTA, D C, Marzo 6, 2007

SS

PETITORIO

00001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-022384-00000-0000
FIC: 2007-05-05 11:30:10 Usp. 2007-05-05 11:30:10
100 T1 PATENTE
EVE: 3/0 FALENALMALI
AD 411 PRESENTACION
FIC: 101

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos

Teléfono:

Fax:

E-Mail:

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-82 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 378 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.388 de

Usaquén

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VU, An-Thien

Dirección: 1212 Chestershire Drive, Pottstown, Pennsylvania 19485, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/031696

Fecha 08-SEP-05

Publicación Internacional No. WO 2006/029146

Fecha 18-MAR-06

⑥

Título (54)

6H-[1]BENZOPIRANO[4,3-b]QUINOLINAS, Y SU USO COMO AGENTES ESTROGENICOS

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07D 491/06, A61P 35/00, A61K 31/47

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

07-SEP-04

(31) Número de Solicitud

60/607.766

⑨

Comprobante de pago No.

06-85244, 06-85245, 07-8702 y
07-2707Fecha 3-nov-6, 3-nov-6, 30-ene-7 y
12-ene-7

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

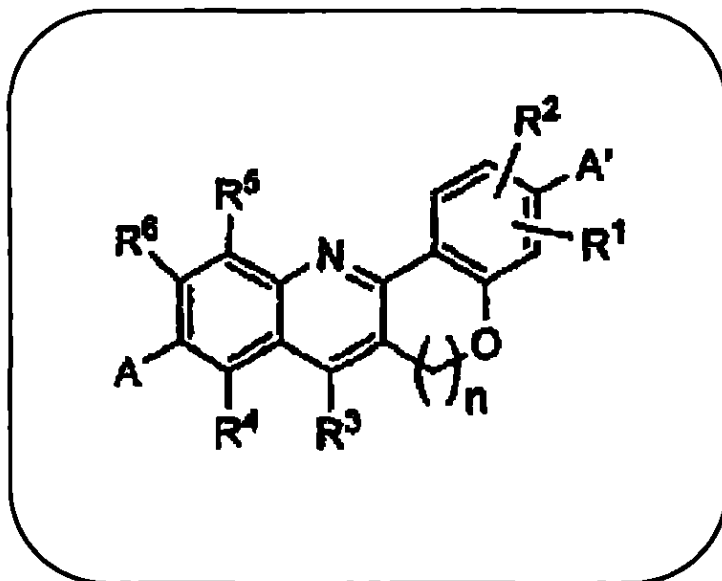
ANEXOS

00002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Reporte internacional de búsqueda, copia de solicitud internacional republicada y notificación de presentación de documento de prioridad

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.388 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

EF 025
000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 85,244
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Hed: 07-022384-00000-0000
Pec: 2800-0900 1/30000 Lsp. 2800 NUCHEALAJONES
TEL 11 PATENTE 11
Evo: 3/0 FABENALAJUNALI
Act 411 PRESENTACION Folio: 101

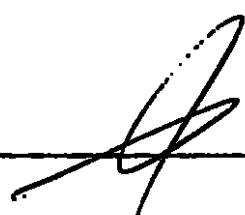
***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54663178	03/11/2006	126,285,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13
		HOMBRES Y EMBENAS COMERCIALES,MMR	234,000.00
		TOTAL :	234,000.00

SOM: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

00004

NIT : BGC176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-022394-00000-0000
Tel: 2401-0305 1/2 JCTO LOP. 2400 MUECRAJUNES
IM. 11 PRESENTIA
EVE: 3/8 FASENATIONAL
AG 411 PRESENTIAJUN
FEBRE 1971

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINAREZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-4	54643178	03/11/2004	126.285.000.00

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06	REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13 NOMBRES Y ENSEÑAS COMERCIALES,NAR
			234,000.
		TOTAL :	\$ 234,000.00

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

77-002

000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-022304-00000-0000
Pec: 2004-03-08 17:00:10 Dep. 2004 NUCHE-ALCANTARAS
IMP. 11 PATENTE
EVS: 3/8 FASE NACIONAL
AEL 411 PRESENTACION FOLIO: 101

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 8,702
: ENERO 30 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64180719	30/01/2007	58,635,000.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I 21 CERTIFICACIONES	11,000.
TOTAL :	\$ 11,000.00

! ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEIENTE No. _____

000001

000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-022394- -00000-0000
Pec: 2007-03-09 17:00:10 Dep. 2007 NUEBOLALUMES
100.11 PATENTE
Evo: 370 FASE NACIONAL
Act 011 PRESENTACION 1-00000-000

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 7 - 2,707
FECHA : ENERO 12 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64321256	11/01/2007	71,059,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA AÑO ANTR
		TOTAL :	\$ 3,000.00

SON: TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 046/07 de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 1 de marzo de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= = = = =

Poder otorgado por la compañía WYETH con respecto a la solicitud de patente titulada "6H-[1]BENZOPIRANO[4,3-b]QUINOLINAS Y SU USO COMO AGENTES ESTROGÉNICOS". Certificación notarial suscrita por Michelle L. McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, E.U.A., y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER NO SE TRADUCE POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

ESTADO DE NUEVA JERSEY)
) SS:
 CONDADO DE MORRIS)

A los 10 días del mes de enero de 2007, ante mí personalmente compareció William H. Calnan, Secretario Asistente de Wyeth, a quien conozco y de quien me consta que es la persona descrita en el instrumento anterior y quien lo suscribió, y reconoció ante mí haber otorgado el mismo.

(Fdo.) Michelle L. McGowan
 Notario Público

(Sello notarial
 en relieve)

[Sello] MICHELLE L. MCGOWAN
 Notario Público, Estado de Nueva Jersey
 No. 2108903
 Habilitada en el Condado de Morris
 La comisión expira el 9 de febrero de 2011


 MARIA TERESA LARA R.
 TRADUCTORA OFICIAL
 RESOLUCION No. 01016
 DE JUSTICIA

AP STILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

CERTIFICADO

- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 16 de enero de 2007
- 7. por Bradley Abelow, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A280643

9. Sello/Timbre:

10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) Bradley Abelow

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

= = = = =

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.



María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

APOSTILLE

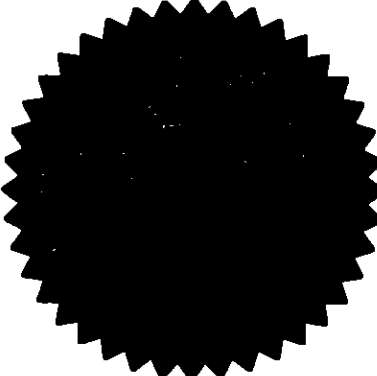
(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 16TH DAY OF JANUARY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A280643
9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE:


Bradley Abelow

Desolada R.

LARA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
REVOLUCION DEL PUEBLO
DE ARGENTINA

096/02

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHAall members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2005/031696 and entitled "6H-[1]BENZOPYRANO[4,3-b]QUINOLINES AND THEIR USE AS ESTROGENIC AGENTS"and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following:
a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

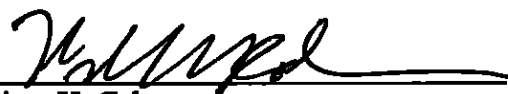
I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 16th day of January of 2007

Signature of the person issuing the Power

WYETH


William H. Calnan
Assistant Secretary**PODER DE ABOGADO**

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/031696 y titulada "

y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 16 días del mes de Enero de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NTT: 880.088.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 378 2211
www.baker.net.com

000010

POWER OF ATTORNEY

PODER DE ABOGADO

The undersigned.

La abajo firmada,

WYETH

WYETH

with offices at

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declares that it hereby grants to

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 – 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2005/031696 and entitled “6H-[1]BENZOPYRANO[4.3-b]QUINOLINES AND THEIR USE AS ESTROGENIC AGENTS”

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/031696 y titulada “

and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

” y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de trasposos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Done and subscribed in

Dado y firmado en

On the 10th day of January of 2007

A los 10 días del mes de Enero de 2007

Signature of the person issuing the Power

Firma de la persona que firma el Poder

WYETH


William H. Calnan
Assistant Secretary

STATE OF NEW JERSEY)
) SS:
COUNTY OF MORRIS)

On this 10th day of January 2007, before me personally appeared William H. Calnan, Assistant Secretary of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and he acknowledged to me that he executed the same.

Michelle L. McGowan

Notary Public

MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 047/07 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 1 de marzo de 2007 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión a WYETH de solicitud de patente para el invento "6H-[1]BENZOPIRANO[4,3-b]QUINOLINAS Y SU USO COMO AGENTES ESTROGÉNICOS". Certificación de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos y legalizaciones subsiguientes.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODO AQUEL QUE VIERE EL PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

26 de enero de 2007

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ADJUNTA SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL TOMADA DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 5 de octubre de 2004

Por autoridad del

**Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos**

(Sello de la Oficina de
Patentes y Marcas de los
Estados Unidos de América)

(Fdo.) W. Montgomery

W. MONTGOMERY
Funcionario Certificador

MARIA TERESA LARA L.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

Expediente No: **WYTH0085-001 (AM100545L1)**

**CARÁTULA DE FORMULARIO DE REGISTRO
PATENTES ÚNICAMENTE**

Para el Honorable Comisionado de Patentes y Marcas: Favor registrar los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.

1. Nombre de la(s) parte(s) que efectúa(n) el traspaso:

An Thien VU / Septiembre 28, 2004
Primer Cedente / Fecha de Firma

Segundo Cedente / Fecha de Firma

Tercer Cedente / Fecha de Firma

Cuarto Cedente / Fecha de Firma

Quinto Cedente / Fecha de Firma

Sexto Cedente / Fecha de Firma

Se adjunta(n) nombre(s) adicional(es)
de parte(s) que efectúe(n) el traspaso? [] SI [X] No

2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora(s):

Nombre: Wyeth

Dirección: 5 Giralda Farms

Ciudad: Madison

Estado: Nueva Jersey

Zip: 07940

Se adjunta(s) nombre(s) y dirección(es) adicional(es): [] SI [X] No

3. Naturaleza del traspaso:

☒ Nueva Cesión

☐ Fusión

☐ Acuerdo de Garantía

☐ Contrato de Licencia

☐ Cambio de Nombre

☐ Otro

☐ Referencia cruzada de Cesión presentada en la Solicitud de los Estados Unidos No.

YANA TERESA LADA E.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01079
DE 2007

4. Identificación del(los) número(s) de Solicitud, número(s) de patente O fecha de firma de la solicitud a la cual se refiere la cesión:

Nos. de Solicitud: 60/607,766 presentada 09/07/04	Nos. de Patente:	Fecha de firma de la solicitud por el primer Inventor firmante (Diligenciar esta fecha únicamente si la cesión se presenta junto con una nueva solicitud)
---	------------------	---

5. Nombre y dirección de la parte a la cual se debe enviar la correspondencia relativa a los documentos:

Nombre: Michael P. Straher
COZEN O'CONNOR
1800 Market Street
Philadelphia, Pennsylvania 19103-3508
215.665.2000

6. Número total de solicitudes y patentes Incluidas: **Una**

7. Derechos totales (37 CFR 1.21(h) & 3.41)

US\$ 40

☐ Adjuntos

☒ Autorización para cargarlos a la Cuenta de Depósito Número 50-1275

8. **Favor cargar cualquier faltante o acreditar cualquier sobrante a la Cuenta de Depósito Número 50-1275**

(Adjuntar duplicado de esta página si se paga mediante cuenta de depósito)

NO UTILIZAR ESTE ESPACIO

9. Declaración de firma

Según mi leal saber y entender, la información anterior es verídica y correcta y cualquier copia adjunta es fiel copia del documento original.

Janet S. Jiullanti
Nombre de la
persona que firma

(Fdo.) Janet S. Jiullanti
Firma

Octubre 5, 2004
Fecha

Número total de páginas incluyendo cubierta, anexos y documentos: 4

Enviar documentos para registro con Información requerida en la carátula a:
Commisioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

AREA TRFCA IADA E
TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION 200-07-0105
DE 2007/07/04

Expediente No: WYTH0085-001 (AM101545 L1)
Patente

Cesión de Invento

En virtud del pago por la CESIONARIA al CEDENTE de contraprestación válida, el recibo de la cual se reconoce por la presente, el CEDENTE:

- (1) Nombre Completo del Inventor: An Thien VU
Residencia: 1212 Chestershire Drive, Pottstown, Pennsylvania 19465
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

UNIA TERPA I UNA L
TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION No. 047/07
DE MINISTROS

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y todos los países extranjeros, incluyendo todo los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

6H-[1]BENZOPIRANO[4,3-b]QUINOLINAS Y SU USO COMO AGENTES ESTROGÉNICOS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes Inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/607,766 presentada el: 7 de septiembre de 2004

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de las mismas en un país extranjero, debiendo insertarse aquí la fecha de presentación y el número de dicha solicitud de los E.U., una vez se conozcan, incluyendo el derecho a reclamar

prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho Invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho Invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pactan y acuerdan suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho Invento y cualquier Patente que pueda expedirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier Interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho Invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo, a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta del mismo, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho Invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre el mismo son por la presente

ADIA TERESA I. ALA L.
TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION 145-07
DE 2007

9-28-2004
Fecha

RECONOCIMIENTO

**Estado de Pennsylvania }
Condado de Montgomery } ss:**

A los 28 días del mes de septiembre de 2004, compareció personalmente ante mí An Thien VU, a quien conozco como la misma persona descrita en el Instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Judith A. Johnston
Notario Público

[Sello] SELLO NOTARIAL
JUDITH A. JOHNSTON, Notario Público
Mpio. de Collegeville, Condado de Montgomery
MI comisión expira Septiembre 19, 2006

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
- Este documento público
2. ha sido firmado por *W. Montgomery*

- 3. actuando en calidad de Funcionario Certificador
- 4. lleva el sello/tímbre de Oficina de Patentes y Marcas

Certificado

- 5. en Washington, D.C.
- 6. el día treinta y uno de enero de 2007
- 7. por el *Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos*
- 8. No. 07011782-4
- 9. Sello/Tímbre
- 10. Firma

(Sello en relieve del
Departamento de Estado
de los
Estados Unidos de América)

(Fdo.) Denitra T. Hawkins

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

ADJUNTA, AL FINAL DEL DOCUMENTO, HOJA DE TRANSMISIÓN DE FAX BAJO LA CUAL SE REMITE LA CARÁTULA DEL FORMULARIO DE REGISTRO, TRADUCIDA EN LA PÁGINA 2 DE ESTE DOCUMENTO.

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.


María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by W. Montgomery

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the thirty-first of January, 2007

7. by Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 07011782-4

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Denitra T. Hawkins

Dereza Larra R.
ARLA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 000-0197
DE MINISTRE 047/07

A 1570207



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

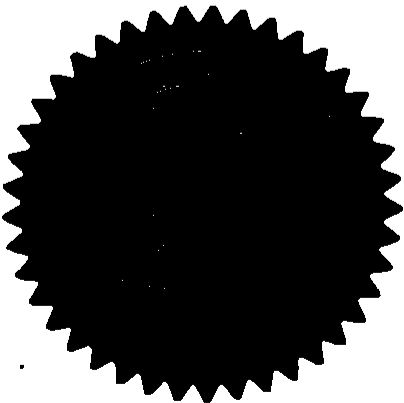
United States Patent and Trademark Office

January 26, 2007

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
October 5, 2004.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**

W. Montgomery
W. MONTGOMERY
Certifying Officer



00021

Docket No: WYTH0085-001(AM100545L1)

**RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY**

To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please Record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies): <u>An Thien YU / September 28, 2004</u> First Assignor / Date of Execution _____ Second Assignor / Date of Execution _____ Third Assignor / Date of Execution _____ Fourth Assignor / Date of Execution _____ Fifth Assignor / Date of Execution _____ Sixth Assignor / Date of Execution Additional name of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No		2. Name and address of receiving party(ies): Name: Wyeth Street Address: 5 Giraldi Farms City: Madison State: New Jersey Zip: 07940 Additional Name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No 3. Nature of conveyance: ☒ New Assignment ☐ Merger ☐ Security Agreement ☐ License Agreement ☐ Change of Name ☐ Other ☐ Cross-reference of Assignment filed in United States Application No. _____				
4. Identification of Application number(s), patent number(s) OR date of execution of application to which assignment refers: <table border="1"><tr><td>Patent Application Nos.: 60/697,766 filed 09/07/04</td><td>Patent Nos.: </td><td>Date application was signed by the first named Executing Inventor: (Fill in this date only if assignment is filed together with a new application)</td></tr></table>				Patent Application Nos.: 60/697,766 filed 09/07/04	Patent Nos.: 	Date application was signed by the first named Executing Inventor: (Fill in this date only if assignment is filed together with a new application)
Patent Application Nos.: 60/697,766 filed 09/07/04	Patent Nos.: 	Date application was signed by the first named Executing Inventor: (Fill in this date only if assignment is filed together with a new application)				
5. Name and address of party to whom correspondence concerning this document should be mailed: Name: Michael P. Straher COZEN O'CONNOR 1900 Market Street Philadelphia, Pennsylvania 19103-3508 215.865.2000		6. Total number of applications and patents involved: <u>One</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41)\$ 40 ☐ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account number 50-1275 8. Please charge any deficiency or credit any overpayment to Deposit account number 50-1275 (Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)				
DO NOT USE THIS SPACE						
9. Statement and signature. <i>To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.</i> <table border="0"><tr><td><u>Janet S. Juliano</u> Name of Person Signing</td><td> Signature</td><td><u>October 5, 2004</u> Date</td></tr></table> Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: 4				<u>Janet S. Juliano</u> Name of Person Signing	 Signature	<u>October 5, 2004</u> Date
<u>Janet S. Juliano</u> Name of Person Signing	 Signature	<u>October 5, 2004</u> Date				

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:
Commissioner for Patent, P.O. Box 1480, Alexandria, VA 22313-1480

700120216

PATENT
REEL: 016217 FRAME: 0654

Docket No: WYTH0085-001(AM101546 L1)
Patent

nnn22

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

- (1) Full Name of Inventor: An Thien VU
Residence: 1212 Chestershire Drive, Pottstown, Pennsylvania 19465
Citizenship: United States of America

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giraldi Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
6H-[1]BENZOPYRANO[4,3-b]QUINOLINES AND THEIR USE AS ESTROGENIC AGENTS

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/607,766 filed on: September 7, 2004

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned].

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

the date of filing and application number of said U.S. application when known, to be inserted above, including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may

PATENT
REEL: 015217 FRAME: 0555

Docket No: WYTH0085-001(AM101545 L1)
Patent

00023

be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

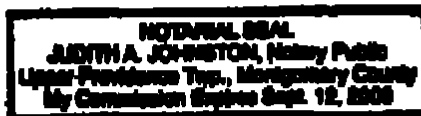
ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

An Thien VU 9-28-2004
An Thien VU Date

ACKNOWLEDGMENT

State of PENNSYLVANIA)
County of MONTGOMERY) ss:

On the 28th day of SEPTEMBER, 2004, An Thien VU personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



Judith A. Johnston
Notary Public

00024

PHILADELPHIA
ATLANTA
CHARLOTTE
CHERRY HILL
CHICAGO
DALLAS
DENVER
LAS VEGAS
LONDON
LOS ANGELES



NEWARK
NEW YORK
SAN DIEGO
SAN FRANCISCO
SEATTLE
TRENTON
WASHINGTON, DC
WEST CONSHOHOCKEN
WICHITA
WILMINGTON

A PROFESSIONAL CORPORATION

1900 MARKET STREET PHILADELPHIA, PA 19103-3508 215.665.2000 800.523.2900 215.665.2013 FAX www.cozen.com

FACSIMILE

FROM: Janet S. Juliani TIMEKEEPER NO.: 2375
SENDER'S PHONE: 215.665.2165 SENDER'S FAX: 215.701.2098
OF PAGES (INCLUDING COVER): 5 FILE NAME: WYTH0085-001
DATE: October 5, 2004 FILE #: 145872.000

RECIPIENT(S)	PHONE	FAX
U.S. Patent and Trademark Office (Assignment Division)	1-703-308-4357	1-703-306-5995

MESSAGE: RE: SERIAL NO. 60/607,766 FILED September 7, 2004; INVENTOR:
An Thien VU

IF YOU DO NOT RECEIVE ALL PAGES, PLEASE CALL [215.665.2000] or [800.523.2900] IMMEDIATELY.

THIS TRANSMISSION IS ALSO BEING SENT VIA:

- ☐ Regular Mail
☐ Certified Mail
☐ Hand Delivery
☐ Overnight Mail
☐ Federal Express
☐ E-Mail

NOTICE

The information contained in this transmission is privileged and confidential. It is intended for the use of the individual or entity named above. If the reader of this message is not the intended addressee, the reader is hereby notified that any consideration, dissemination or duplication of this communication is strictly prohibited. If the addressee has received this communication in error, please return this transmission to us at the above address by mail. We will reimburse you for postage. In addition, if this communication was received in the U.S., please notify us immediately by phoning and asking for the Fax Center.

PATENT
REEL: 015217 FRAME: 0667

From the INTERNATIONAL BUREAU

mps/maP

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

• 000025

STRAHER, Michael, P.
Cozen O'Connor
1900 Market Street
Philadelphia, PA 19103-3508
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
16 March 2006 (16.03.2006)Applicant's or agent's file reference
AM101545

with 0085-500 (167682)

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/031696International filing date (day/month/year)
06 September 2005 (06.09.2005)Priority date (day/month/year)
07 September 2004 (07.09.2004)

Applicant

WYETH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 16 March 2006 (16.03.2006) under
No. WO 2006/029146☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under
No. WOFor an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.RECEIVED
COZEN IP DEPT

MAR 24 2006

DUE DATE N/AMAX DATE DOCKETED BY A-TThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Philippe Becamel

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 70 90

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



PCT



(43) International Publication Date
16 March 2006 (16.03.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/029146 A2

(51) International Patent Classification:
C07D 491/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/031696

(22) International Filing Date:
6 September 2005 (06.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/607,766 7 September 2004 (07.09.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; A corporation of the State of Delaware, Five Gl-
ralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): VU, An-Taken
[US/US]; 1212 Chestershire Drive, Pottstown, PA 19465
(US).

(74) Agents: STRAHKER, Michael, P. et al.; Coren O'Connor,
1900 Market Street, Philadelphia, PA 19103-3508 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

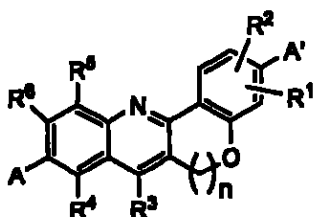
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: 6H-[1]BENZOPYRANO[4,3-b]QUINOLINES AND THEIR USE AS ESTROGENIC AGENTS



(57) Abstract: This invention provides 6H-[1]benzopyrano[4,3-b]quinoline
compounds having the formula I: The invention further provides compositions
including the compounds, methods for the use of the compounds, and the
methods of preparation of the compounds.

WO 2006/029146 A2

**6H-[1]BENZOPYRANO[4,3-b]QUINOLINES AND THEIR USE
AS ESTROGENIC AGENTS**

FIELD OF THE INVENTION

- 5 This invention relates to 6H-[1]benzopyrano[4,3-b]quinoline compounds, their use as estrogenic agents, and methods of their preparation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 10 The pleiotropic effects of estrogens in mammalian tissues have been well documented, and it is now appreciated that estrogens affect many organ systems (see Mendelsohn and Karas, *New England Journal of Medicine* 340: 1801-1811 (1999), Epperson, et al., *Psychosomatic Medicine* 61: 676-697 (1999), Crandall, *Journal of Womens Health & Gender Based Medicine* 8: 1155-1166 (1999), Monk and Brodaty, *Dementia & Geriatric Cognitive Disorders* 11: 1-10 (2000), Hum and
15 Macrae, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20: 631-652 (2000), Calvin, *Maturitas* 34: 195-210 (2000), Finking, et al., *Zeitschrift fur Kardiologie* 88: 442-453 (2000), Brincat, *Maturitas* 35: 107-117 (2000), Al-Azzawi, *Postgraduate Medical Journal* 77: 282-304 (2001)). Estrogens can exert effects on tissues in several ways, and the most well characterized mechanism of action is their interaction with
20 estrogen receptors leading to alterations in gene transcription. Estrogen receptors are ligand-activated transcription factors and belong to the nuclear hormone receptor superfamily. Other members of this family include the progesterone, androgen, glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. Upon binding ligand, these receptors dimerize and can activate gene transcription either by directly binding to specific
25 sequences on DNA (known as response elements) or by interacting with other transcription factors (such as AP1), which in turn bind directly to specific DNA sequences (see Moggs and Orphanides, *EMBO Reports* 2: 775-781 (2001), Hall, et al., *Journal of Biological Chemistry* 276: 36869-36872 (2001), McDonnell, *Principles of Molecular Regulation* 351-381 (2000)). A class of "coregulatory" proteins can also
30 interact with the ligand-bound receptor and further modulate its transcriptional activity (see McKenna, et al., *Endocrine Reviews* 20: 321-344 (1999)). It has also been shown that estrogen receptors can suppress NF- κ B-mediated transcription in both a ligand-dependent and independent manner (see Quaedackers, et al., *Endocrinology*

142: 1158-1168 (2001), Bhat, et al., *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 87: 233-240 (1998), Petzer, et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 286: 1153-7 (2001)).

5 Estrogen receptors can also be activated by phosphorylation. This phosphorylation is mediated by growth factors such as EGF and causes changes in gene transcription in the absence of ligand (see Moggs and Orphanides, *EMBO Reports* 2: 775-781 (2001), Hall, et al., *Journal of Biological Chemistry* 276: 36869-36872 (2001)).

10 A less well-characterized means by which estrogens can affect cells is through a so-called membrane receptor. The existence of such a receptor is controversial, but it has been well documented that estrogens can elicit very rapid non-genomic responses from cells. The molecular entity responsible for transducing these effects has not been definitively isolated, but there is evidence to suggest it is at least related to the nuclear forms of the estrogen receptors (see Levin, *Journal of Applied Physiology* 91: 1860-1867 (2001), Levin, *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10: 374-377 (1999)).

20 Two estrogen receptors have been discovered to date. The first estrogen receptor was cloned about 15 years ago and is now referred to as ER α (see Green, et al., *Nature* 320: 134-9 (1986)). The second form of the estrogen receptor was found comparatively recently and is called ER β (see Kulper, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5925-5930 (1996)). Early work on ER β focused on defining its affinity for a variety of ligands and indeed, some differences with ER α were seen. The tissue distribution of ER β has been well mapped in the rodent and it is not coincident with ER α . Tissues such as the mouse and rat uterus express predominantly ER α , whereas other tissues such as the mouse and rat lung express predominantly ER β (see Couse, et al., *Endocrinology* 138: 4813-4821 (1997), Kulper, et al., *Endocrinology* 138: 863-870 (1997)). Even within the same organ, the distribution of ER α and ER β can be compartmentalized. For example, in the mouse ovary, ER β is highly expressed in the granulosa cells and ER α is restricted to the thecal and stromal cells (see Sar and Welsh, *Endocrinology* 140: 963-971 (1999), Fitzpatrick, et al., *Endocrinology* 140: 2581-2591 (1999)). However, there are examples where the receptors are

coexpressed and there is evidence from *in vitro* studies that ER α and ER β can form heterodimers (see Cowley, et al., *Journal of Biological Chemistry* 272: 19858-19862 (1997)).

5 A large number of compounds have been described that either mimic or block the activity of 17 β -estradiol. Compounds having roughly the same biological effects as 17 β -estradiol, the most potent endogenous estrogen, are referred to as "estrogen receptor agonists". Those which, when given in combination with 17 β -estradiol, block its effects are called "estrogen receptor antagonists". In reality there is a continuum between estrogen receptor agonist and estrogen receptor antagonist activity, and indeed, some compounds behave as estrogen receptor agonists in
10 some tissues and estrogen receptor antagonists in others. These compounds with mixed activity are called selective estrogen receptor modulators (SERMs) and are therapeutically useful agents (e.g., EVISTA[®]) (see McDonnell, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7: S10-S15 (2000), Goldstein, et al., *Human*
15 *Reproduction Update* 6: 212-224 (2000)). The precise reason why the same compound can have cell-specific effects has not been elucidated, but the differences in receptor conformation and/or in the milieu of coregulatory proteins have been suggested.

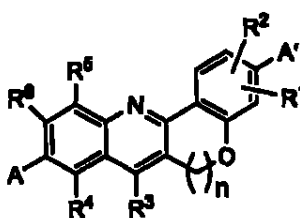
It has been known for some time that estrogen receptors adopt different
20 conformations when binding ligands. However, the consequence and subtlety of these changes have been only recently revealed. The three dimensional structures of ER α and ER β have been solved by co-crystallization with various ligands and clearly show the repositioning of helix 12 in the presence of an estrogen receptor antagonist, which sterically hinders the protein sequences required for receptor-
25 coregulatory protein interaction (see Pike, et al., *Embo* 18: 4808-4818 (1999), Shiau, et al., *Cell* 95: 927-937 (1998)). In addition, the technique of phage display has been used to identify peptides that interact with estrogen receptors in the presence of different ligands (see Paige, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 3999-4004 (1999)). For example, a peptide was
30 identified that distinguished between ER α bound to the full estrogen receptor agonists 17 β -estradiol and diethylstilbestrol. A different peptide was shown to distinguish between clomiphene bound to ER α and ER β . These data indicate that

each ligand potentially places the receptor in a unique and unpredictable conformation that is likely to have distinct biological activities.

As mentioned above, estrogens affect a panoply of biological processes. In addition, where gender differences have been described (e.g. disease frequencies, responses to challenge, etc.), it is possible that the explanation involves the difference in estrogen levels between males and females. Given the importance of these compounds, it can be seen that there is a need for new estrogenic agents. This invention is directed to these, as well as other, important ends.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides 6H-[1]benzopyrano[4,3-b]quinoline compounds that find use as estrogenic agents. In certain embodiments, the compounds have the formula I:



I

wherein:

- 15 A and A' are each independently OH, H or OR;
 each R is independently selected from the group consisting of C₁-C₈ alkyl, alkenyl, benzyl, acyl, aryl, -C(=O)-OR', sulfonyl and phosphoryl, wherein each R' is independently selected from C₁-C₈ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, or C₂-C₁₀ cycloalkyl, each of which are
 20 optionally substituted by 1 to 3 substituents selected from C₁-C₈ alkyl or halogen;
 R¹ and R² are independently selected from the group consisting of H, halogen, C₁-C₈ alkyl, C₁-C₈ perhaloalkyl, CF₃, C₂-C₇ alkenyl and C₁-C₈ alkoxy;
 R³, R⁴, R⁵ and R⁶ are each independently selected from the group consisting
 25 of H, halogen, CF₃, C₁-C₈ perhaloalkyl, C₁-C₈ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, C₂-C₇ cycloalkyl, C₁-C₈ alkoxy, CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl and heteroaryl;

wherein the alkyl or alkenyl moieties of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents independently selected from halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, NO_2 or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

5 wherein the alkynyl moiety of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, -CHO, acyl, trifluoroalkyl, trialkylsilyl or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

10 wherein the phenyl, aryl or heteroaryl moiety of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, alkyl, alkoxy, perfluoroalkyl or perfluoroalkoxy;

each R^{10} is independently selected from the group consisting of halogen, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, -OH, C_1 - C_6 alkoxy, -CN, -CHO, - NO_2 , amino, C_1 - C_6 alkylamino, di- $(C_1$ - $C_6)$ alkylamino, thiol, and C_1 - C_6 alkylthio; and

15 n is 0, 1, 2, or 3;

provided that:

at least one of A and A' is not H;

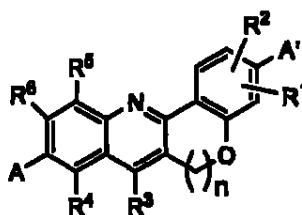
If n is 0, then R_3 is not halogen; and

20 at least one of R^3 , R^4 and R^5 is halogen, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, C_3 - C_7 cycloalkyl, C_1 - C_6 alkoxy, -CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl or heteroaryl; or an N-oxide thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof or a prodrug thereof.

The compounds of the invention are estrogen receptor modulators useful in the treatment or inhibition of conditions, disorders, or disease states that are at least partially mediated by an estrogen deficiency or excess, or which may be treated or inhibited through the use of an estrogenic agent. Thus, in some aspects, the invention is directed to the use of the compounds of the invention in the treatment or prevention of diseases such as osteoporosis, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, ulcerative proctitis, colitis, estrogen dependant cancers, hypercholesterolemia, hyperlipidemia, cardiovascular disease, atherosclerosis, senile dementias, Alzheimer's disease, anxiety disorders, neurodegenerative disorders, infertility, or arthritis.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides 6H-[1]benzopyrano[4,3-b]quinoline compounds, compositions containing the compounds, and methods for use of the compounds as estrogenic agents. The compounds of the invention are useful in the treatment and prevention of diseases associated with the estrogen receptor, particularly ER β . In some embodiments, the estrogenic compounds of the invention have the formula I:



I

wherein:

- 10 A and A' are each independently OH, H or OR;
 each R is independently selected from the group consisting of C₁-C₈ alkyl, alkenyl, benzyl, acyl, aryl, -C(=O)-OR', sulfonyl and phosphoryl, wherein each R' is independently selected from C₁₋₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, or C₃-C₁₀ cycloalkyl, each of which are
 15 optionally substituted by 1 to 3 substituents selected from C₁-C₆ alkyl or halogen;
 R¹ and R² are independently selected from the group consisting of H, halogen, C₁-C₈ alkyl, C₁-C₈ perhaloalkyl, CF₃, C₂-C₇ alkenyl and C₁-C₈ alkoxy;
 R³, R⁴, R⁵ and R⁶ are each independently selected from the group consisting
 20 of H, halogen, CF₃, C₁-C₈ perhaloalkyl, C₁-C₈ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₁-C₈ alkoxy, CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl and heteroaryl;
 wherein the alkyl or alkenyl moieties of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents independently selected from halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, NO₂ or phenyl, wherein said phenyl is
 25 optionally substituted with up to three independently selected R¹⁰ groups;
 wherein the alkynyl moiety of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, -CHO, acyl,

trifluoroalkyl, trialkylsilyl or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

wherein the phenyl, aryl or heteroaryl moiety of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, alkyl, alkoxy, perfluoroalkyl or perfluoroalkoxy;

each R^{10} is independently selected from the group consisting of halogen, C_1 - C_8 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, -OH, C_1 - C_8 alkoxy, -CN, -CHO, -NO₂, amino, C_1 - C_8 alkylamino, di(C_1 - C_8)alkylamino, thiol, and C_1 - C_8 alkylthio; and

n is 0, 1, 2, or 3;

provided that:

at least one of A and A' is not H;

If n is 0, then R_3 is not halogen; and

at least one of R^3 , R^4 and R^5 is halogen, C_1 - C_8 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, C_2 - C_7 cycloalkyl, C_1 - C_8 alkoxy, -CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl or heteroaryl;

or an N-oxide thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof or a prodrug thereof.

In some embodiments, A and A' are each OH. In some further embodiments, one of A and A' is OH, and the other of A and A' is OR. In some further embodiments, one of A and A' is OH, and the other of A and A' is O- C_1 - C_8 alkyl. In some further embodiments, A and A' are each OR. In still further embodiments, A and A' are each -O- C_1 - C_8 alkyl. In still further embodiments, one of A and A' is H, and the other of A and A' is OH or OR. In further embodiments, one of A and A' is H, and the other of A and A' is OH or O- C_1 - C_8 alkyl.

In some embodiments, R^3 and R^5 are each, independently, H, halogen, C_1 - C_8 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, -CN, -CHO, acyl or optionally substituted phenyl, as previously described. In some such embodiments, R^3 is other than H.

In some embodiments, R^3 is halogen, C_1 - C_8 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, -O- C_1 - C_8 alkyl (i.e., C_1 - C_8 alkoxy), perfluoroalkyl and CN; and R^5 is H, halogen, C_1 - C_8 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1 - C_8 alkoxy, perfluoroalkyl and CN. In some such embodiments, the phenyl of R^3 is optionally substituted with up to three substituents selected from F, Cl, Br, CN, OCH₃ and CF₃.

In some embodiments, R^3 is halogen, C_2-C_7 alkynyl or $-CN$. In some further embodiments, R^3 and R^4 are each independently halogen, C_2-C_7 alkynyl or $-CN$.

In some embodiments, one of R^1 and R^2 is halogen. In some preferred embodiments, one of R^1 and R^2 is fluorine. In some further embodiments, one of R^1 and R^2 is fluorine, and the other of R^1 and R^2 is H. In some further embodiments, one of R^1 and R^2 is fluorine, and the other of R^1 and R^2 is H. In some further embodiments, R^1 and R^2 are each independently halogen. In some further embodiments, R^1 and R^2 are each fluorine. In some further embodiments, R^1 and R^2 are each H.

10 In some embodiments, R^4 is H, halogen or $-CN$, preferably H.

In some embodiments, R^3 is halogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, $-CN$, $-CHO$, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_8 alkoxy, perfluoroalkyl and CN ; R^5 is H, halogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, $-CN$, $-CHO$, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_8 alkoxy, perfluoroalkyl and CN ; and one of R^1 and R^2 is halogen; and R^4 is H, halogen or $-CN$.

In some embodiments, preferably those wherein A and A' are each OH, R^1 , R^2 , R^4 , R^6 and R^8 are hydrogen, and R^3 is halogen, or R^3 is OH, or R^3 is C_2-C_7 alkenyl, or R^3 is CN, or R^3 is C_2-C_7 alkynyl, or R^3 is C_1-C_8 alkyl, or R^3 is optionally substituted phenyl, preferably wherein the substituents of the phenyl are halogen, C_1-C_8 alkoxy, perfluoroalkyl or CN .

20 In some embodiments of each of the foregoing, n is 1.

In some embodiments, the invention provides compositions containing one or more compounds of the invention, or pharmaceutically acceptable salts, chelates, complexes or prodrugs thereof.

It is to be understood that, when the compounds according to the present invention may be present either in their free base forms, as depicted in the formulae set forth herein, or as salts and/or hydrates thereof, and in particular as pharmaceutically acceptable salts thereof. Pharmaceutically acceptable salts are known in the art, as are hydrates, and the person having skill in the art will find it conventional to prepare such salts using art-recognized techniques. Pharmaceutically acceptable salts can be formed from organic and inorganic acids, for example, acetic, propionic, lactic, citric, tartaric, succinic, fumaric, maleic, malonic,

mandelic, malic, phthalic, hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, nitric, sulfuric, methanesulfonic, naphthalenesulfonic, benzenesulfonic, toluenesulfonic, camphorsulfonic, and similarly known acceptable acids when a compound of this invention contains a basic moiety. Salts may also be formed from organic and
5 inorganic bases, such as alkali metal salts (for example, sodium, lithium, or potassium), alkaline earth metal salts, ammonium salts, alkylammonium salts containing 1-8 carbon atoms or dialkylammonium salts containing 1-8 carbon atoms in each alkyl group, and trialkylammonium salts containing 1-8 carbon atoms in each alkyl group, when a compound of this invention contains an acidic moiety.
10 Exemplary salts further include acid-addition salts, e.g., HCl, H₂SO₄, HBr, HI, HNO₃, H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₃PO₃, NaH₂PO₃, Na₂HPO₃, H₂SO₄, NaHSO₄, carboxylic acids, such as acetic acid, malonic acid, capric acid, lauric acid, dichloroacetic acid, trichloroacetic acid, etc., and other pharmacologically tolerated salts. Hydrates include hemihydrates, monohydrates, dihydrates, etc. Unless
15 otherwise modified herein, the use of a free base formula is intended to include the salt and/or hydrate thereof.

The instant invention also encompasses N-oxide derivatives of the compounds disclosed herein. These N-oxides can be prepared by methods known for preparing analogous compounds. For example, the compounds may be oxidized
20 with a peracid, hydrogen peroxide, an alkali metal peroxide or an alkyl peroxide. One useful N-oxide derivative is a composition where the nitrogen atom of the quinoline ring forms the N-oxide group.

The instant invention also encompasses prodrug derivatives. "Prodrug derivative" or "prodrug" means derivatives of the instant compounds that are
25 converted *in vivo* to the corresponding non-derivatized form of the instant compounds.

The term "alkyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to an aliphatic hydrocarbon chain and includes, but is not limited to, straight and branched chains containing from 1 to 12 carbon atoms, preferably 1 to 6
30 carbon atoms, unless explicitly specified otherwise. For example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, etc. are encompassed by the term "alkyl."

The number of carbon atoms as used in the definitions herein refers to the carbon backbone and carbon branching of the moiety, but does not include carbon atoms of the substituents, such as alkoxy substituents and the like, of the moiety.

The term "alkenyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to an aliphatic hydrocarbon chain and includes, but is not limited to, straight and branched chains having 2 to 8 carbon atoms, e.g., 2-7 carbon atoms and containing at least one double bond. Preferably, the alkenyl moiety has 1 or 2 double bonds. For example, vinyl, allyl, 1-methyl vinyl, etc. are encompassed by the term "alkenyl". Such alkenyl moieties may exist in the E or Z conformations and the compounds of this invention include both conformations.

The term "alkynyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to an aliphatic hydrocarbon chain and includes, but is not limited to, straight and branched chains having 2 to 8 carbon atoms, e.g., 2-7 carbon atoms and containing at least one triple bond. Preferably, the alkynyl moiety has 1 or 2 triple bonds. For example, ethynyl, propynyl, etc. are encompassed by the term "alkynyl".

The term "acyl" refers to alkylcarbonyl groups, e.g., where alkyl is as defined herein. The term "benzyl" has its accustomed meaning as a phenylmethyl group. The term "aroyl" refers to an aryl moiety connected through a carbonyl group, such as a benzoyl group.

The alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, cycloalkyl, heteroaryl, aroyl, acyl and phenyl groups that are described herein for variables R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , A and A' can be optionally substituted with one or more substituents, preferably, with up to three substituents. The substituents are independently selected, and include nitro, cyano, halo, hydroxy, carboxy, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, heteroaryl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, alkylalkoxy, alkoxyalkoxy, perfluoroalkyl, perfluoroalkoxy, arylalkyl, alkylaryl, hydroxyalkyl, alkoxyalkyl, alkylthio, $S(O)_s$ -aryl (where $s=0-2$) $S(O)_s$ -heteroaryl (where $s=0-2$), or $-C(=O)-OR'$, where R' is as previously described. In certain embodiments of the invention, preferred substituents include halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, perfluoroalkyl, perfluoroalkoxy, arylalkyl, alkylaryl, NO_2 and phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups as described herein.

For example, when alkyl or alkenyl moieties are substituted, they can typically be mono-, di-, tri- or persubstituted. Examples for a halogen substituent include 1-

bromo vinyl, 1-fluoro vinyl, 1,2-difluoro vinyl, 2,2-difluorovinyl, 1,2,2-trifluorovinyl, 1,2-dibromo ethane, 1,2-fluoro ethane, 1-fluoro-2-bromo ethane, CF_2CF_3 , $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$, and the like.

The term "halogen" includes fluorine, chlorine, bromine, and iodine.

5 Exemplary cycloalkyl groups include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, adamantyl, etc. In some embodiments, the cycloalkyl groups have 3-10 carbon atoms. Preferably cycloalkyl groups have 3-7 carbon atoms. As used herein, cycloalkyl further includes unsaturated cycloalkyl groups, i.e., cycloalkenyl groups. Exemplary unsaturated cycloalkyl groups include

10 cyclopentenyl, cyclohexenyl, cycloheptenyl, etc.

Aryl groups are moieties that possess at least one aromatic ring containing no hetero (i.e., non-carbon) ring atoms. The term "aryl" includes mono- and polycyclic aromatic ring systems, e.g., of 6-15 carbon atoms, for example, phenyl, naphthyl, etc. Aryl groups can have fully or partially saturated rings fused to the aromatic ring.

15 Thus, exemplary aryl groups include phenyl, naphthyl, pyrenyl, 5,6,7,8-tetrahydronaphth-1-yl, and the like.

The term heteroaryl is intended to mean an aromatic ring system that contains at least one non-carbon ring atom (e.g., one to three heteroatoms) selected from O, N and S and having for example five to 14 ring atoms. Exemplary heteroaryl

20 groups include pyrrolyl, imidazolyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, pyrazinyl, quinolyl, quinoxalyl, quinoxalinyl, thiofenyl, furanyl, oxazolyl, thiazolyl, thienyl, pyranyl, thiopyranyl, benzofuranyl, indolyl, indazolyl, benzimidazolyl, benzothiazolyl, benzopyranyl, benzothienopyranyl, indazolyl, pyridopyrrolyl, and the like.

In some embodiments, the R' group of the $-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}'$ moiety of A or A', is

25 C_1-C_6 alkyl. In some embodiments, R' is C_{1-4} alkyl. In some embodiments, the $-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}'$ moiety is t-butoxycarbonyl (BOC).

As used in accordance with this invention, the term "providing," with respect to providing a compound or substance covered by this invention, means either directly administering such a compound or substance, or administering a prodrug,

30 derivative, or analog that will form the effective amount of the compound or substance within the body.

Based on the results obtained in the standard pharmacological test procedure, as described below, the compounds of the invention are estrogen

receptor modulators useful in the treatment or inhibition of conditions, disorders, or disease states that are at least partially mediated by an estrogen deficiency or excess, or which may be treated or inhibited through the use of an estrogenic agent. The compounds of this invention are particularly useful in treating a peri-menopausal, menopausal, or postmenopausal patient in which the levels of endogenous estrogens produced are greatly diminished. Menopause is generally defined as the last natural menstrual period and is characterized by the cessation of ovarian function, leading to the substantial diminution of circulating estrogen in the bloodstream. As used herein, menopause also includes conditions of decreased estrogen production that may be caused surgically, chemically, or by a disease state that leads to premature diminution or cessation of ovarian function.

Accordingly, the compounds of this invention are useful in treating or inhibiting osteoporosis and in the inhibition of bone demineralization, which may result from an imbalance in formation of new bone tissues and the resorption of older tissues in an individual, leading to a net loss of bone. Such bone depletion results in a range of individuals, particularly in post-menopausal women, women who have undergone bilateral oophorectomy, those receiving or who have received extended corticosteroid therapies, those experiencing gonadal dysgenesis, and those suffering from Cushing's syndrome. Special needs for bone replacement, including teeth and oral bone, can also be addressed using these compounds in individuals with bone fractures, defective bone structures, and those receiving bone-related surgeries and/or the implantation of prosthesis. In addition to those problems described above, these compounds can be used in treatment or inhibition for osteoarthritis, spondyloarthropathies, hypocalcemia, hypercalcemia, Paget's disease, osteomalacia, osteochondromas, multiple myeloma and other forms of cancer having deleterious effects on bone tissues.

The compounds of this invention are further useful in treating or inhibiting joint damage secondary to arthroscopic or surgical procedures.

The compounds of this invention are also useful in treating or inhibiting benign or malignant abnormal tissue growth, including prostatic hypertrophy, uterine leiomyomas, breast cancer, endometriosis, endometrial cancer, polycystic ovary syndrome, endometrial polyps, benign breast disease, adenomyosis, ovarian cancer,

melanoma, prostate cancer, cancers of the colon, CNS cancers, such as glioma or astroblastoma.

The compounds of this invention are cardioprotective and they are useful in lowering cholesterol, triglycerides, Lp(a) lipoprotein, and low density lipoprotein (LDL) levels; inhibiting or treating hypercholesterolemia; hyperlipidemia; cardiovascular disease; atherosclerosis; peripheral vascular disease; restenosis, and vasospasm; and inhibiting vascular wall damage from cellular events leading toward immune mediated vascular damage. These cardiovascular protective properties are of great importance when treating postmenopausal patients with estrogens to inhibit osteoporosis and in the male when estrogen therapy is indicated.

The compounds of this invention are also antioxidants, and therefore, are useful in treating or inhibiting free radical induced disease states. Specific situations in which antioxidant therapy is indicated to be warranted are with cancers, central nervous system disorders, Alzheimer's disease, bone disease, aging, inflammatory disorders, peripheral vascular disease, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases, respiratory distress, emphysema, asthma, pleurisy, uveitis, sepsis, hemorrhagic shock, prevention of reperfusion injury, viral hepatitis, chronic active hepatitis, tuberculosis, psoriasis, systemic lupus erythematosus, adult respiratory distress syndrome, central nervous system trauma and stroke.

The compounds of this invention are also useful in providing cognition enhancement, and in treating or inhibiting senile dementias, Alzheimer's disease, cognitive decline, neurodegenerative disorders, providing neuroprotection or cognition enhancement.

The compounds of this invention are also useful in treating or inhibiting inflammatory bowel disease, ulcerative proctitis, Crohn's disease, and colitis; menopausal related conditions, such as vasomotor symptoms, including hot flashes, vaginal or vulvar atrophy, atrophic vaginitis, vaginal dryness, pruritus, dyspareunia, dysuria, frequent urination, urinary incontinence, urinary tract infections, myalgia, arthralgia, insomnia, irritability, and the like; male pattern baldness; skin atrophy; acne; type II diabetes; dysfunctional uterine bleeding; and infertility.

The compounds of this invention are useful in disease states where amenorrhea is advantageous, such as leukemia, endometrial ablations, chronic renal or hepatic disease or coagulation diseases or disorders.

The compounds of this invention can be used as a contraceptive agent, particularly, when combined with a progestin.

When administered for the treatment or inhibition of a particular disease state or disorder, it is understood that the effective dosage may vary depending upon the particular compound utilized, the mode of administration, the condition being treated, and severity thereof, as well as, the various physical factors related to the individual being treated. Effective administration of the compounds of this invention may be given at an oral dose of from about 0.1 mg/day to about 1,000 mg/day. Preferably, administration will be from about 10 mg/day to about 600 mg/day, more preferably from about 50 mg/day to about 600 mg/day, in a single dose or in two or more divided doses. The projected daily dosages are expected to vary with route of administration.

Such doses may be administered in any manner useful in directing the active compounds herein to the recipient's bloodstream, including orally, via implants, parenterally (including intravenous, intraperitoneal and subcutaneous injections), rectally, intranasally, vaginally, and transdermally.

Oral formulations containing the active compounds of this invention may comprise any conventionally used oral forms, including tablets, capsules, buccal forms, troches, lozenges and oral liquids, suspensions or solutions. Capsules may contain mixtures of the active compound(s) with inert fillers and/or diluents such as the pharmaceutically acceptable starches (e.g., corn, potato or tapioca starch), sugars, artificial sweetening agents, powdered celluloses, such as crystalline and microcrystalline celluloses, flours, gelatins, gums, etc. Useful tablet formulations may be made by conventional compression, wet granulation or dry granulation methods and utilize pharmaceutically acceptable diluents, binding agents, lubricants, disintegrants, surface modifying agents (including surfactants), suspending or stabilizing agents, including, but not limited to, magnesium stearate, stearic acid, talc, sodium lauryl sulfate, microcrystalline cellulose, carboxymethylcellulose calcium, polyvinylpyrrolidone, gelatin, alginate acid, acacia gum, xanthan gum, sodium citrate, complex silicates, calcium carbonate, glycine, dextrin, sucrose, sorbitol, dicalcium phosphate, calcium sulfate, lactose, kaolin, mannitol, sodium chloride, talc, dry starches and powdered sugar. Preferred surface modifying agents include nonionic and anionic surface modifying agents. Representative examples of surface

modifying agents include, but are not limited to, poloxamer 188, benzalkonium chloride, calcium stearate, cetostearyl alcohol, cetomacrogol emulsifying wax, sorbitan esters, colloidal silicon dioxide, phosphates, sodium dodecylsulfate, magnesium aluminum silicate, and triethanolamine. Oral formulations herein may utilize standard
5 delay or time release formulations to alter the absorption of the active compound(s). The oral formulation may also consist of administering the active ingredient in water, or a fruit juice, containing appropriate solubilizers or emulsifiers, as needed.

In some cases, it may be desirable to administer the compounds directly to the airways in the form of an aerosol.

10 The compounds of this invention may also be administered parenterally or intraperitoneally. Solutions or suspensions of these active compounds as a free base or pharmacologically acceptable salt can be prepared in water suitably mixed with a surfactant such as hydroxy-propylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycole and mixtures thereof in oils. Under ordinary
15 conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and
20 must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

25 For the purposes of this disclosure, transdermal administrations are understood to include all administrations across the surface of the body and the inner linings of bodily passages including epithelial and mucosal tissues. Such administrations may be carried out using the present compounds, N-oxides thereof, prodrugs thereof, or pharmaceutically acceptable salts thereof, in lotions, creams,
30 foams, patches, suspensions, solutions, and suppositories (rectal and vaginal).

Transdermal administration may be accomplished through the use of a transdermal patch containing the active compound and a carrier that is inert to the

active compound, is non toxic to the skin, and allows delivery of the agent for systemic absorption into the blood stream via the skin. The carrier may take any number of forms such as creams and ointments, pastes, gels, and occlusive devices. The creams and ointments may be viscous liquids or semisolid emulsions of either the oil-in-water or water-in-oil type. Pastes comprised of absorptive powders dispersed in petroleum or hydrophilic petroleum containing the active ingredient may also be suitable. A variety of occlusive devices may be used to release the active ingredient into the blood stream such as a semi-permeable membrane covering a reservoir containing the active ingredient with or without a carrier, or a matrix containing the active ingredient. Other occlusive devices are known in the literature.

Suppository formulations may be made from traditional materials, including cocoa butter, with or without the addition of waxes to alter the suppository's melting point, and glycerin. Water soluble suppository bases, such as polyethylene glycols of various molecular weights, may also be used.

15

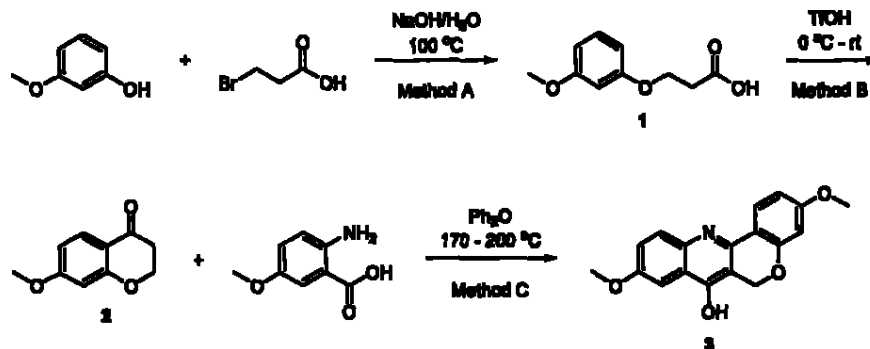
Synthesis Of Compounds Of The Invention

The compounds of this invention can be prepared by methods known in the art of organic chemistry. The reagents used in the preparation of the compounds of this invention can be either commercially obtained or can be prepared by standard procedures described in the literature.

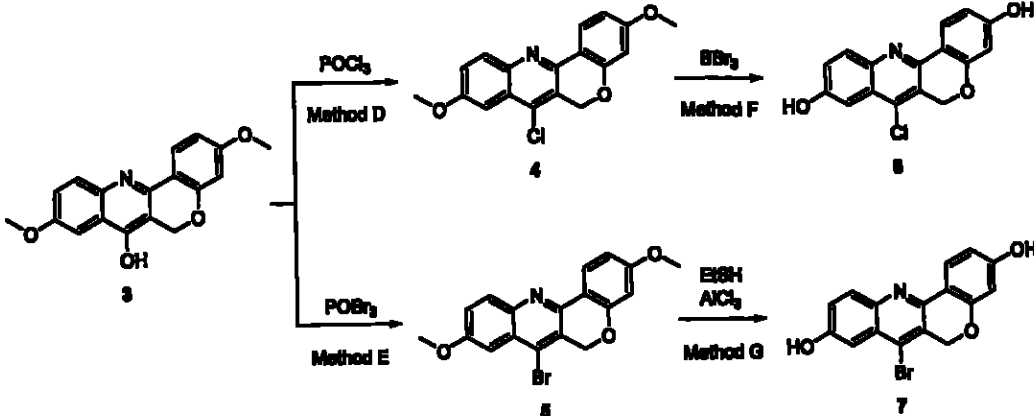
20

The syntheses of representative examples of this invention are described in the following Schemes 1-4. The Synthetic Methods A-M referred to in Schemes 1-4 are described in the Examples below.

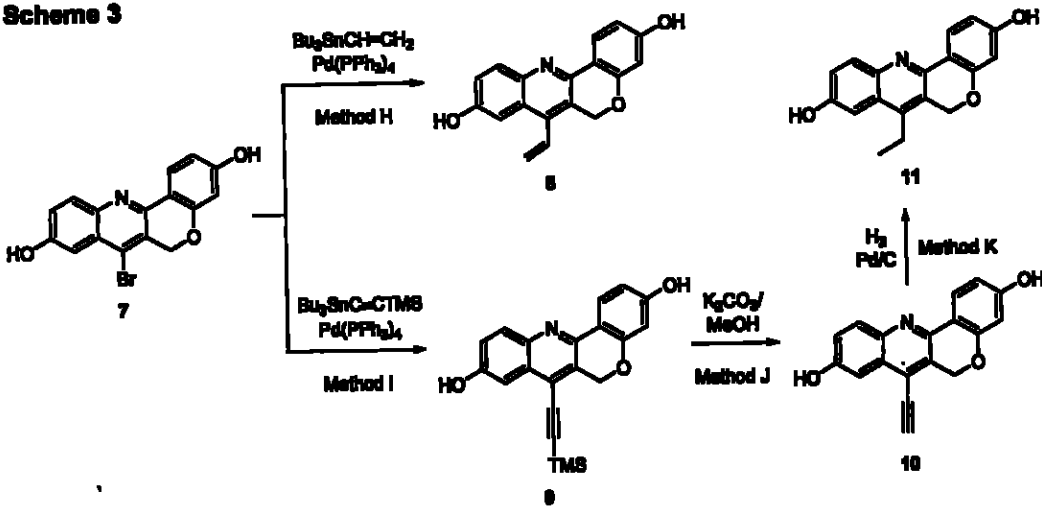
Scheme 1



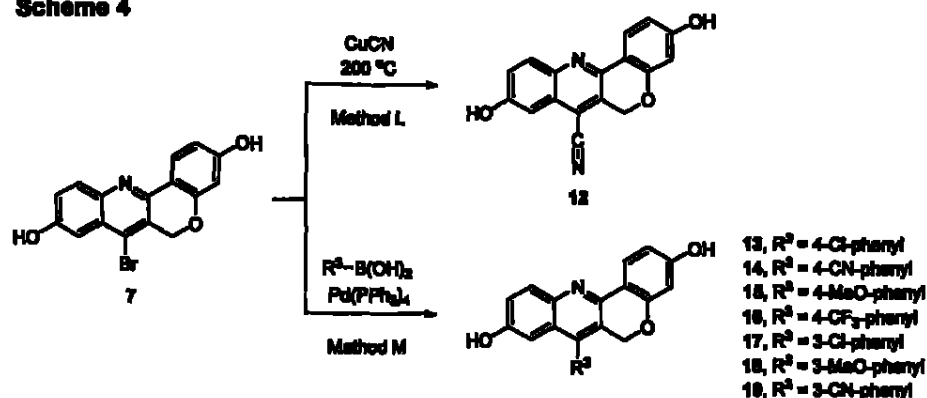
Scheme 2



Scheme 3



Scheme 4



EXAMPLES

Synthesis Of Representative Compounds Of The Invention: General Method

- 5 Aldrich Sure Seal™ solvents, anhydrous without further purification, may be used for the reactions described herein and may be obtained from Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). All reactions were carried out under a nitrogen atmosphere. Chromatography was performed using 230-400 mesh silica gel (Merck Grade 60, Aldrich Chemical Company). Thin layer chromatography was performed with Silica Gel 60 F₂₅₄ plates from EM Science (). ¹H and ¹⁹F NMR spectra were obtained on a Bruker AM-400 or Bruker DPX-300 Instrument (Bruker, Billerica, MA) in deuterated solvents such as CDCl₃, DMSO-d₆ or acetone-d₆. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) down field from tetramethylsilane (TMS). Melting points were determined on a Thomas-Hoover apparatus and are uncorrected.
- 10 Infrared (IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer diffraction grating or Perkin-Elmer 784 spectrophotometers (Perkin-Elmer, Shelton, CT). Mass spectra were recorded on a Kratos MS 50 or Finnigan 8230 mass spectrometers. Compound nomenclature was generally arrived at by use of the Bellstein Autonom™ program.

20

EXAMPLE 1

3-(3-METHOXY-PHENOXY)-PROPIONIC ACID (1)

Method A: To a mixture of 3-bromopropionic acid (14.70 g, 118 mmol) in water (100 mL) was added slowly NaHCO₃ (8.40 g, 100 mmol) and the resulting mixture was

stirred for 5 mins. To this solution was added a 70-mL solution of 3-methoxyphenol (14.70 g, 98 mmol) in aqueous NaOH (4.67 g, 119 mmol), and the resulting mixture was heated at 100 °C for 3 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was acidified with 1N HCl, and extracted with Et₂O. The Et₂O layer was washed with aqueous NaHCO₃ (3x). The aqueous layer was again acidified with 1N HCl and extracted with Et₂O. The Et₂O layer was washed with water, brine, dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give a crude brown solid, which was recrystallized (Et₂O/-20 °C) to give a pure product as a yellow solid. Yield: 17.0 g (23%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.85 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.24 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 6.50 (m, 3H), 7.18 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 11.45 (br, 1H); MS (ESI) m/z 195 ([M-H]⁻); Anal. Calcd for C₁₀H₁₂O₄: C:61.22, H:6.16. Found: C:61.24, H:6.12.

EXAMPLE 2

7-METHOXY-CHROMAN-4-ONE (2)

Method B: To a reaction vessel containing 3-(3-methoxy-phenoxy)-propionic acid (1) (7.00 g, 35.6 mmol) at 0 °C was added slowly trifluoromethanesulfonic acid (15 mL). The reaction mixture was stirred for 3 hours while allowing to warm up to room temperature. After cooling to 0 °C, the reaction mixture was quenched with crushed ice, then extracted with Et₂O (2 x 300 mL). The organic layer was washed with water (2x), aqueous NaHCO₃, water, brine, then dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give a crude oil, which was purified by silica gel chromatography to give a pure product as a yellow solid. Yield: 4.26 g (67%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.76 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.52 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 6.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 6.8, 2.3 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.8 Hz, 1H); MS (ESI) m/z 179 ([M+H]⁺).

EXAMPLE 3

3,8-DIMETHOXY-6H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLIN-7-OL (3)

Method C: A mixture of 2-amino-5-methoxybenzoic acid (1.839 g, 11.00 mmol) and 7-methoxy-chroman-4-one (2) (1.980 g, 11.00 mmol) in Ph₂O (10 mL) was heated at 170 °C for 1 hour and at 200 °C for 7 hours. After cooling to room temperature, hexane was added. The yellow precipitate formed was collected by filtration and

washed successfully with hexane and Et₂O and dried *in vacuo*. Yield: 2.171 g (84%). mp 288 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.82 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 6.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 9.0, 2.9 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 11.58 (s, 1H); MS (ESI) m/z 308 ([M-H]⁻), 310 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₈NO₄ 310.1074 ([M+H]⁺), found 310.1088.

EXAMPLE 4

7-CHLORO-3,8-DIMETHOXY-6H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (4)

10

Method C: A mixture of 3,8-dimethoxy-6H-chromeno[4,3-b]quinolin-7-ol (3) (124 mg, 0.400 mmol) and POCl₃ (1 mL) was heated at reflux for 1 hour. After cooling, excess POCl₃ was removed under reduced pressure. Water and then aqueous K₂CO₃ were slowly added to the solid residue and the reaction mixture was extracted with EtOAc.

15 The organic layer was washed with brine, then dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give a crude solid, which was passed through a short pad of silica gel and recrystallized (hot heptane/-20 °C) to give a pure product as a yellow powder. Yield: 124 mg (95%); mp 190-191 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 20 7.35 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z 328/330 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₄ClNO₂ 328.0735 ([M+H]⁺), found 328.0728; Anal. calcd for C₁₈H₁₄ClNO₂: C:85.96, H:4.31, N:4.27. Found: C:85.71, H:4.17, N:3.92.

25

EXAMPLE 5

7-BROMO-3,8-DIMETHOXY-6H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (5)

Method E. A mixture of 3,8-dimethoxy-6H-chromeno[4,3-b]quinolin-7-ol (3) (1.025 g, 3.31 mmol) and POBr₃ (1.430 g, 5.00 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (15 mL) was heated 30 at 70 °C for 30 mins. After cooling to room temperature, water and then aqueous K₂CO₃ were slowly added, and the reaction mixture was extracted with warm CHCl₃ (2x). The organic layer was washed with water (2x) and brine, then dried (Na₂SO₄), filtered through a short pad of silica gel and concentrated to give a crude yellow solid.

which was recrystallized (hot EtOAc/-20 °C) to give a pure product as yellow needles. Yield: 1.127 g (91%); mp 196-197 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 5.46 (s, 2H), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H); MS (ESI) m/z 372/374 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₄BrNO₃ 372.0230 ([M+H]⁺), found 372.0228; Anal. calcd for C₁₈H₁₄BrNO₃: C:58.08, H:3.79, N:3.76. Found: C:57.94, H:3.88, N:3.73.

EXAMPLE 6

10 7-CHLORO-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (6)

Method F: To a solution of 7-chloro-3,9-dimethoxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (4) (88 mg, 0.21 mmol) in 1,2-dichloroethane (3 mL) was added slowly a solution of BBr₃ (1.0 M, 1 mL, 1 mmol) in CH₂Cl₂. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 mins. and then at 40 °C for 2 hours. After cooling in an ice bath, aqueous NaHCO₃ was added very slowly with vigorous stirring to quench the reaction, and the resulting reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, then dried (Na₂SO₄), filtered through a short pad of silica gel, and concentrated to give a yellow solid, which was recrystallized (THF/hexane). Yield: 56 mg (90%); mp 235 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.47 (s, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 10.10 (s, 1H), 10.35 (s, 1H); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₀ClNO₃ 300.0422 ([M+H]⁺), found 300.0411.

25

EXAMPLE 7

7-BROMO-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (7)

Method G: To a solution of 7-bromo-3,9-dimethoxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (5) (881 mg, 2.37 mmol) in 1,2-dichloroethane (20 mL) was added slowly AlCl₃ (3.16 g, 23.7 mmol) and EtSH (2.7 mL, 36 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. After cooling in an ice bath, aqueous NaHCO₃ was added very slowly with vigorous stirring to quench the reaction, and the resulting reaction mixture was extracted with EtOAc. The precipitate formed was filtered through Celite®. The organic layer was washed with brine, then dried (Na₂SO₄), filtered and

concentrated to give a crude yellow solid, which was purified by silica gel chromatography to give a pure product as an orange solid. Yield: 478 mg (59%); mp 240 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.44 (s, 2H), 6.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.33 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 10.09 (s, 1H), 10.35 (s, 1H); MS (ESI) m/z 342/344 ([M-H]⁺), 344/346 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₆BrNO₃ 343.9917 ([M+H]⁺), found 343.9911.

EXAMPLE 8

10 3,9-DIHYDROXY-7-VINYL-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (8)

Method H: A mixture of 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) (34.5 mg, 0.100 mmol), tributyl(vinyl)tin (38 mg, 0.120 mmol, 1.2 equiv.), and Pd(PPh₃)₄ (11.6 mg, 0.0100 mmol, 10 mol%) in toluene (1.5 mL) was refluxed under nitrogen until all starting material was consumed (1-2 hour(s)). Filtration through Celite[®] and purification by passing through a short pad of silica gel gave a pure product as an orange powder. Yield: 24 mg (83%); mp 160 °C (dec.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.36 (s, 2H), 5.47 (dd, J = 17.9, 1.4 Hz, 1H), 5.91 (dd, J = 11.6, 1.4 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 17.7, 11.6 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.95 (s, 1H); MS (ESI) m/z 290 ([M-H]⁺), 292 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₃NO₃ 292.0966 ([M+H]⁺), found 292.0962.

25

EXAMPLE 9

3,9-DIHYDROXY-7-[(TRIMETHYLSILYL)ETHYNYL]-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (9)

Method I: A mixture of 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) (51.6 mg, 0.150 mmol), (trimethylsilylethynyl)tributyltin (70 mg, 0.180 mmol, 1.2 equiv.), and Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 0.015 mmol, 10 mol%) in toluene (2 mL) was refluxed under nitrogen until all starting material was consumed (1-2 hour(s)). Filtration through Celite[®] and purification by passing through a short pad of silica gel gave a pure

product as a red solid. Yield: 54 mg (99.6%); mp 180 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 0.43 (s, 9H), 5.53 (s, 2H), 6.52 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.16 (s, 1H); MS (ESI) m/z 360 ([M-H]⁻), 362 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₁H₁₆NO₃Si 362.1207 ([M+H]⁺), found 362.1207.

EXAMPLE 10

3,9-DIHYDROXY-7-ETHYNYL-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (10)

10

Method J: To a solution of 3,9-dihydroxy-7-[(trimethylsilyl)ethynyl]-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (9) (54 mg, 0.15 mmol) in MeOH (2 mL) was added K₂CO₃ (104 mg, 0.75 mmol, 5 equiv.) and the reaction mixture was stirred for 30 mins. at room temperature. The reaction mixture was quenched with aqueous NH₄Cl (5 mL).

15

Methanol (MeOH) was removed under reduced pressure and the reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, then dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give a crude yellow solid, which was purified by passing through a short pad of silica gel to give a pure product as a burgundy powder. Yield: 27 mg (83%); mp 220 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.27 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 6.41 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 10.04 (s, 1H), 10.23 (s, 1H); MS (ESI) m/z 288 ([M-H]⁻), 290 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₉H₁₁NO₃ 290.0812 ([M+H]⁺), found 290.0808.

25

EXAMPLE 11

3,9-DIHYDROXY-7-ETHYL-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (11)

METHOD K: A mixture of 3,9-dihydroxy-7-ethynyl-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (10) (13 mg, 0.045 mmol) and Pd/C (10 wt. %) in EtOAc/THF (1.5 mL) was stirred under hydrogen atmosphere (1 atm, balloon) for 30 mins. The reaction mixture was filtered through Celite®, and concentrated to give a yellow solid, which was recrystallized (EtOAc/hexane/-20 °C). Yield: 13 mg (98%). mp 145 °C (dec.); ¹H-NMR (300 MHz,

30

DMSO-d₆) δ 1.18 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 2.95 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 6.38 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.82 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.93 (s, 1H); MS (ESI) m/z 292 ([M-H]⁻), 294 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₈H₁₆NO₃ 294.1125 ([M+H]⁺), found 294.1123.

EXAMPLE 12

7-CYANO-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (12)

10 Method L: A mixture of 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) (47 mg, 0.14 mmol), CuCN (370 mg, 4.13 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) was heated at 200 °C in a sealed tube until all starting material was consumed (5 hours). After cooling to room temperature, the reaction mixture was filtered through Celite® and rinsed with EtOAc. Water was added to the filtrate and the reaction mixture was
15 extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water (2x) and brine, then dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give a crude solid, which was purified by silica gel chromatography to give a pure product as a brown powder. Yield: 9 mg (23%); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.52 (s, 2H), 6.44 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.98
20 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 10.19 (s, 1H), 10.63 (s, 1H); MS (ESI) m/z 289 ([M-H]⁻), 291 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₇H₁₀N₂O₃ 291.0764 ([M+H]⁺), found 291.0758.

EXAMPLE 13

25 7-(4-CHLOROPHENYL)-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (13)

Method M: A mixture of 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) (40 mg, 0.12 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 0.006 mmol, 5 mol%) in DME (3 mL) was stirred for 10 mins. at room temperature. To this mixture were added sequentially 4-chlorophenylboronic acid (22 mg, 0.14 mmol, 1.2 equiv.) and aqueous Na₂CO₃ (2 M
30 soln, 5 equiv.), and the reaction mixture was refluxed until all starting material was consumed (2-3 hours). After cooling, aqueous NH₄Cl was added and the reaction mixture extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine,

then dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated to give a crude solid, which was purified by passing through a short pad of silica gel to give a pure product as a red powder. Yield: 41 mg (94%); mp 215-218 °C (dec.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 5.01 (s, 2H), 6.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.62 (s, 1H), 9.98 (s, 1H); MS (ESI) m/z 374/376 ($[\text{M-H}]^-$), 376/378 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$ 376.0735 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), found 376.0728.

10

EXAMPLE 14

7-(4-CYANOPHENYL)-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (14)

This compound was prepared from 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 4-cyanophenylboronic acid according to method M. Ivory powder; Yield: 96%; mp 295 °C (dec.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 4.99 (s, 2H), 6.36 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.99 (s, 1H); MS (ESI) m/z 365 ($[\text{M-H}]^-$), 367 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ 367.1077 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), found 367.1074.

20

EXAMPLE 15

3,9-DIHYDROXY-7-(4-METHOXYPHENYL)-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (15)

This compound was prepared from 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 4-methoxyphenylboronic acid according to method M. Yellow powder; Yield: 84%; mp 195 °C (dec.); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3.87 (s, 3H), 5.03 (s, 2H), 6.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.24 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.98 (s, 1H); MS (ESI) m/z 370 ($[\text{M-H}]^-$), 372 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ 372.1230 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), found 372.1228.

30

EXAMPLE 16

3,9-DIHYDROXY-7-[4-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (16)

5 This compound was prepared from 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 4-trifluoromethylphenylboronic acid according to method M. Yellow powder; Yield: 95%; mp 175-177 °C (dec.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.00 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.84 (s, 1H), 10.00 (s, 1H); ¹⁹F-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ -61.43 (s); MS (ESI) m/z 406 ([M-H]⁺), 410 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₃H₁₄F₃NO₂ 410.0999 ([M+H]⁺), found 410.0992.

EXAMPLE 17

15 7-(3-CHLOROPHENYL)-3,9-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (17)

This compound was prepared from 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 3-chlorophenylboronic acid according to method M. Orange powder; Yield: 94%; mp 162-165 °C (dec.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.01 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.50 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 3.9, 1.6 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.98 (s, 1H); MS (ESI) m/z 374/376 ([M-H]⁺), 376/378 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₂H₁₄ClNO₂ 376.0735 ([M+H]⁺), found 376.0721.

25

EXAMPLE 18

3,9-DIHYDROXY-7-(3-METHOXYPHENYL)-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (18)

This compound was prepared from 7-bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 3-methoxyphenylboronic acid according to method M. Yellow powder; Yield: 87%; mp 155-158 °C (dec.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.82 (s, 3H), 4.99 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.90 (m, 1H), 6.92 (d, J = 1.6

30

Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.24 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.2, 7.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.96 (s, 1H); MS (ESI) m/z 370 ($[M+H]^+$), 372 ($[M+H]^+$); HRMS (ESI⁺) calcd for $C_{22}H_{17}NO_4$ 372.1230 ($[M+H]^+$), found 372.1223.

5

EXAMPLE 19

7-(3-CYANOPHENYL)-3,8-DIHYDROXY-8H-CHROMENO[4,3-b]QUINOLINE (19)

This compound was prepared from 7-bromo-3,8-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline (7) using 3-cyanophenylboronic acid according to method M. Yellow powder; Yield: 74%; mp 275 °C (dec.); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.98 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.74 (dt, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.05 (dt, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 9.87 (s, 1H), 10.00 (s, 1H); MS (ESI) m/z 365 ($[M+H]^+$), 367 ($[M+H]^+$); HRMS (ESI⁺) calcd for $C_{22}H_{14}N_2O_3$ 367.1066 ($[M+H]^+$), found 367.1063.

15

Pharmacological Test Procedures

20

Demonstration Of Estrogenic Activity

Representative examples of the invention were evaluated for their ability to compete with 17 β -estradiol for both ER α and ER β . The test procedure used allows one to determine whether a particular compound binds to the estrogen receptor (and is therefore "estrogenic") and whether there is selectivity for ER α or ER β . Results of representative compound examples are shown in Table 1 below, with the values obtained reported as IC₅₀s. The IC₅₀ is defined as the concentration of compound that decreases total 17 β -estradiol binding by 50%. The procedure used is briefly described. A crude lysate of *E. coli* expressing the estrogen receptor ligand binding domains (D, E, and F) of human ER α or ER β was prepared. Both receptors and compounds were diluted in 1X Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) supplemented with 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Using a high binding masked microtiter plate, 100 μ L of receptor (1 μ G/well) was combined with 2

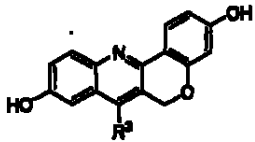
25

30

00054

nM [³H]-17β-estradiol and various concentrations of compound. After between 5 and 15 hours at room temperature, the plates were washed with DPBS/1 mM EDTA and bound radioactivity determined by liquid scintillation counting.

Table 1. Binding affinities and receptor selectivity of representative compounds of the invention; reported as IC₅₀s.



Cpd	R ³	ERβ (nM)	ERα (nM)	α/β
6	Cl	3.3	88	27
7	Br	3.6	63	18
8	CH=CH ₂	31	548	18
9	C≡C-TMS	225	169	0.8
10	C≡CH	37	131	3
11	Et	5.0	88	13
12	CN	5.6	40	7
13	4-Cl-Ph	160	3090	19
14	4-CN-Ph	82	1420	17
15	4-MeO-Ph	61	357	6
16	4-CF ₃ -Ph	137	8090	44
17	3-Cl-Ph	130	806	4
18	3-MeO-Ph	88	820	10
19	3-CN-Ph	150	1130	8

5

The results obtained in this pharmacologic test procedure demonstrate that the compounds of this invention are estrogenic compounds, many with strong preferential affinity for the ERβ receptor. The compounds of this invention range from having high preferential affinity for ERβ over ERα to almost equal affinity for both receptors. Thus, compounds of this invention will span a range of activity based, at least partially, on their receptor affinity selectivity profiles. Additionally, since each novel receptor ligand complex is unique and thus, its interaction with various coregulatory proteins is unique, compounds of this invention will display different modulatory behavior depending on the cellular context they are in. For example, in some cell-types, it is possible for a compound to behave as an estrogen agonist while in other tissues, as an antagonist. Compounds with such activity have sometimes been referred to as SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators). Unlike many estrogens, however, many of the SERMs do not cause increases in

non-5

uterine wet weight. These compounds are antiestrogenic in the uterus and can completely antagonize the trophic effects of estrogen agonists in uterine tissue. These compounds, however, act as estrogen agonists in the bone, cardiovascular, and central nervous systems. Due to this tissue selective nature of these compounds, they are useful in treating or preventing in a mammal, e.g., a human such as a woman, disease states or syndromes which are caused or associated with an estrogen deficiency (e.g., in certain tissues such as bone or cardiovascular) or an excess of estrogen (e.g., in the uterus or mammary glands).

Even beyond such cell-specific modulation, compounds of this invention also have the potential to behave as agonists on one receptor type while behaving as antagonists on the other. For example, it has been demonstrated that compounds can be an antagonist on ER β while being an agonist on ER α . (see Meyers, Marvin J. et al., *J. Med. Chem.* 42(13): 2456-2468 (1999)). Such ERSAA (Estrogen Receptor Selective Agonist Antagonist) activity provides for pharmacologically distinct estrogenic activity within this series of compounds.

Other pharmacological test procedures are readily available to determine the activity profile of a representative compound of the invention. The following briefly summarizes several representative test procedures. Pharmacological test procedures for SERMs are also provided in US Patent Nos. 4,418,068 and 5,998,402, each of which is incorporated by reference in its entirety..

Rat Uterotrophic/Antiuterotrophic Test Procedure

The estrogenic and antiestrogenic properties of the compounds can be determined in an immature rat uterotrophic assay (4 days) (see L.J. Black and R.L. Goode, *Life Sciences* 26: 1453 (1980)). Immature Sprague-Dawley rats (female, 18 days old) were tested in groups of six. The animals were treated by daily intraperitoneal (ip) injection with 10 μ g compound, 100 μ g compound, 100 μ g compound + 1 μ g 17 β -estradiol (to check antiestrogenicity), and 1 μ g 17 β -estradiol, with 50% DMSO/50% saline as the injection vehicle. On day 4, the animals were sacrificed by CO₂ asphyxiation and their uteri removed and stripped of excess lipid, any fluid removed and the wet weight determined. A small section of one horn was submitted for histology and the remainder used to isolate total RNA to evaluate complement component 3 gene expression.

Six (6)-Week Ovariectomized Rat Test Procedure - Bone and Cardioprotection

Female Sprague Dawley CD rats, ovx or sham ovx, are obtained 1 day after surgery from Taconic (Greenwood, NY) (weight range 240-275 g). They are housed 3 or 4 rats/cage in a room on a 12/12 (light/dark) schedule and provided with food (Purina Mills® 5K96C rat chow) and water ad libitum. Treatment for all studies begin 1 day after the animals' arrival and dosed 7 days per week as indicated for 6 weeks. A group of age matched sham operated rats not receiving any treatment serve as an intact, estrogen replete control group for each study.

All treatments are prepared in 1% Tween 80 in normal saline at defined concentrations so that the treatment volume is 0.1 mL/100 g body weight. 17 β estradiol is dissolved in corn oil (20 μ g/mL) and delivered subcutaneously, 0.1 mL/rat. All dosages are adjusted at three week intervals according to group mean body weight measurements.

Five weeks after the initiation of treatment and one week prior to the termination of the study, each rat is evaluated for bone mineral density (BMD). The total and trabecular density of the proximal tibia are evaluated in anesthetized rats using an XCT-960M (pQCT ()); Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Germany). The measurements are performed as follows: Fifteen minutes prior to scanning, each rat is anesthetized with an ip injection of 45 mg/kg ketamine, 8.5 mg/kg xylazine, and 1.5 mg/kg acepromazine.

The right hind limb is passed through a polycarbonate tube with a diameter of 25 mm and taped to an acrylic frame with the ankle joint at a 90° angle and the knee joint at 180°. The polycarbonate tube is affixed to a sliding platform that maintains it perpendicular to the aperture of the pQCT. The platform is adjusted so that the distal end of the femur and the proximal end of the tibia would be in the scanning field. A two dimensional scout view is run for a length of 10 mm and a line resolution of 0.2 mm. After the scout view is displayed on the monitor, the proximal end of the tibia is located. The pQCT scan is initiated 3.4 mm distal from this point. The pQCT scan is 1 mm thick, has a voxel (three dimensional pixel) size of 0.140 mm, and consists of 145 projections through the slice.

After the pQCT scan is completed, the image is displayed on the monitor. A region of interest including the tibia but excluding the fibula is outlined. The soft

tissue is automatically removed using an iterative algorithm. The density of the remaining bone (total density) is reported in mg/cm^3 . The outer 55% of the bone is peeled away in a concentric spiral. The density of the remaining bone (Trabecular density) is reported in mg/cm^3 . One week after BMD evaluation, the rats are euthanized by carbon dioxide suffocation and blood collected for cholesterol determination. The uteri are removed and the weights taken. Total cholesterol is determined using a Boehringer-Mannheim Hitachi 911 clinical analyzer using the Cholesterol/HP kit. Statistics were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnet's test.

10

MCF-7/ERE Antiproliferative Test Procedure

Stock solutions of test compounds (usually 0.1 M) are prepared in DMSO and then diluted 10 to 100-fold with DMSO to make working solutions of 1 or 10 mM. The DMSO stocks are stored at either 4 °C (0.1 M) or -20 °C (< 0.1M). MCF-7 cells are passaged twice a week with growth medium [D-MEM/F-12 medium containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, and 2 mM glutamax-1]. The cells are maintained in vented flasks at 37 °C inside a 5% CO₂/95% humidified air incubator. One day prior to treatment, the cells are plated with growth medium at 25,000/well into 96 well plates and incubated at 37 °C overnight.

The cells are infected for 2 hours at 37 °C with 50 μl /well of a 1:10 dilution of adenovirus 5-ERE-tk-luciferase in experimental medium [phenol red-free D-MEM/F-12 medium containing 10% (v/v) heat-inactivated charcoal-stripped fetal bovine serum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin, 2 mM glutamax-1, 1 mM sodium pyruvate]. The wells are then washed once with 150 μl of experimental medium. Finally, the cells are treated for 24 hours at 37 °C in replicates of 8 wells/treatment with 150 μl /well of vehicle ($\leq$ 0.1% v/v DMSO) or compound that is diluted $\geq$ 1000-fold into experimental medium.

Initial screening of test compounds is done at a single dose of 1 μM that is tested alone (agonist mode) or in combination with 0.1 nM 17 β -estradiol (EC₅₀; antagonist mode). Each 96-well plate also includes a vehicle control group (0.1% v/v DMSO) and an agonist control group (either 0.1 or 1 nM 17 β -estradiol). Dose-response experiments are performed in either the agonist and/or antagonist modes

30

59
00058

on active compounds in log increases from 10^{-14} to 10^{-8} M. From these dose-response curves, EC_{50} and IC_{50} values, respectively, are generated. The final well in each treatment group contains 5 μ l of 3×10^{-6} M ICI-182,780 (10^{-6} M final concentration) as an ER antagonist control.

5 After treatment, the cells are lysed on a shaker for 15 mins. with 25 μ l/well of 1X cell culture lysis reagent (Promega Corporation). The cell lysates (20 μ l) are transferred to a 96-well luminometer plate, and luciferase activity is measured in a MicroLumat LB 98 P luminometer (EG & G Berthold) using 100 μ l/well of luciferase substrate (Promega Corporation). Prior to the injection of substrate, a 1 second
10 background measurement is made for each well. Following the injection of substrate, luciferase activity is measured for 10 seconds after a 1 second delay. The data are transferred from the luminometer to a Macintosh personal computer and analyzed using the JMP software (SAS Institute); this program subtracts the background reading from the luciferase measurement for each well and then determines the
15 mean and standard deviation of each treatment.

The luciferase data are transformed by logarithms, and the Huber M-estimator is used to down-weight the outlying transformed observations. The JMP software is used to analyze the transformed and weighted data for one-way ANOVA (Dunnett's test). The compound treatments are compared to the vehicle control
20 results in the agonist mode, or the positive agonist control results (0.1 nM 17 β -estradiol) in the antagonist mode. For the initial single dose experiment, if the compound treatment results are significantly different from the appropriate control ($p < 0.05$), then the results are reported as the percent relative to the 17 β -estradiol control [i.e., ((compound - vehicle control)/(17 β -estradiol control - vehicle control)) x
25 100]. The JMP software is also used to determine the EC_{50} and/or IC_{50} values from the non-linear dose-response curves.

Inhibition of LDL Oxidation - Antioxidant Activity

30 Porcine aortas are obtained from an abattoir, washed, transported in chilled phosphate buffered saline (PBS), and aortic endothelial cells are harvested. To harvest the cells, the intercostal vessels of the aorta are tied off and one end of the aorta clamped. Fresh, sterile filtered, 0.2% collagenase (Sigma Type I) is placed in the vessel and the other end of the vessel then clamped to form a closed system.

The aorta is incubated at 37 °C for 15-20 mins., after which the collagenase solution is collected and centrifuged for 5 mins. at 2000 x g. Each pellet is suspended in 7 mL of endothelial cell culture medium consisting of phenol red free DMEM/Ham's F12 media supplemented with charcoal stripped fetal bovine serum (FBS; 5%), NuSerum® (5%), L-glutamine (4 mM), penicillin-streptomycin (1000 U/ml, 100 µg/ml) and gentamicin (75 µg/ml), seeded in a 100 mm petri dish and incubated at 37 °C in 5% CO₂. After 20 minutes, the cells are rinsed with PBS and fresh medium added, and again, at 24 hours. The cells are confluent after approximately 1 week. The endothelial cells are routinely fed twice a week and, when confluent, trypsinized and seeded at a 1:7 ratio. Cell mediated oxidation of 12.5 µg/mL LDL is allowed to proceed in the presence of the compound to be evaluated (5 µM) for 4 hours at 37 °C. Results are expressed as the percent inhibition of the oxidative process as measured by the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) method for analysis of free aldehydes (Yagi K., *Biochem Med* 15:212-216 (1976)).

15

D12 Hypothalamic Cell Test Procedure

D12 rat hypothalamic cells are subcloned from the RCF17 parental cell line and stored frozen. They are routinely grown in DMEM:F12 (1:1), glutaMAX-1 (2 mM), penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 mg/ml), plus 10% FBS. The cells are plated in phenol red-free medium (DMEM:F12, glutaMAX, penicillin-streptomycin) containing 2-10% charcoal stripped FBS at a subconfluent density (1-4 x 10⁵ cells/150 mm dish). The cells are refed 24 hours later with medium containing 2% stripped serum. To test for agonist activity, cells are treated with 10 nM 17β-estradiol or various doses of test compound (1 mM or a range from 1 pM to 1 mM). To test for antagonist activity, the cells are treated with 0.1 nM 17β-estradiol in the absence or presence of varying doses (100 pM to 1 mM) of test compound. Control dishes are also treated with DMSO as a negative control. Forty-eight hours after hormone addition, the cells are lysed and a binding test procedure performed.

For each binding test procedure 100-150 mg protein is incubated with 10 nM ³H-R5020 + 100-fold excess R5020 in a 150 mL volume. Triplicate reactions (three with R5020, three without R5020) are prepared in a 96-well plate. The protein extract is added first followed by ³H-R5020 or ³H-R5020 + 100x unlabeled R5020. The reaction is performed for 1-2 hour(s) at room temperature. The reaction is stopped

by the addition of 100 mL cold 5% charcoal (Nort SX-4), 0.5% dextran 86K (Pharmacia) in TE, pH 7.4 . After 5 mins. at room temperature, the bound and unbound ligand are separated by centrifugation (5 mins., 1000 RCF, 4 °C). The supernatant solution (~150 ml) is removed and transferred to a scintillation vial.

- 5 Following the addition of scintillation fluid (Beckman Ready Protein+), the samples are counted for 1 min. in a scintillation counter.

Progesterone Receptor in the CNS Preoptic Area

- Sixty (60) days old female Sprague-Dawley rats are ovariectomized. The animals are housed in an animal care facility with a 12-hour light, 12-hour dark photoperiod and free access to tap water and rodent chow.

- Overiectomized animals are randomly divided into groups that are injected with vehicle (50% DMSO, 40% PBS, 10% ethanol vehicle), 17 β -estradiol (200 ng/kg) or the compound to be tested. Additional animals are injected with the test compound 1 hour prior to injection of 17 β -estradiol to evaluate the antagonistic properties of this compound. Six hours after subcutaneous (sc) injection, the animals are euthanized with a lethal dose of CO₂ and their brains collected and frozen.

- Tissue collected from the animals is cut on a cryostat at -18 °C and collected on Silane-coated microscope slides. The section-mounted slides are then dried on a slide warmer maintained at 42 °C and stored in desiccated slide boxes at -80 °C. Prior to processing, the desiccated slide boxes are slowly warmed to room temperature (-20 °C for 12-18 hours; 4 °C for 2 hours; room temperature for 1 hour) to eliminate condensation formation on slides and thus, minimize tissue and RNA degradation. The dry slides are loaded into metal racks, post-fixed in 4% paraformaldehyde (pH 9.0) for 5 mins. and processed, as previously described.

- A plasmid containing a 815bp fragment of the rat PR cDNA 9 (ligand binding domain) is linearized and used to generate a S 35-UTP labeled probe that is complimentary to a portion of the rat PR mRNA. Processed section-mounted slides are hybridized with 200 mL of hybridization mix containing the riboprobe (4-6x10⁶ DPM/slide) and 50% formamide, and incubated overnight in a 55 °C humidified chamber. In the morning, the slides are placed in metal racks that are immersed in 2xSSC (0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate; pH 7.0)/10 mM DTT. The racks are all transferred to a large container and washed in 2xSSC/10 mM DTT for 15 mins. at

room temperature with gentle agitation. Slides are then washed in RNase buffer at 37 °C for 30 mins., treated with RNase A (2 mg/ml) for 30 mins. at 37 °C, and washed for 15 mins. in room temperature 1xSSC. Subsequently, the slides are washed (2x 30 mins.) in 65 °C in 0.1xSSC to remove nonspecific label, rinsed in room temperature 0.1xSSC for 15 mins. and dehydrated with a graded series of alcohol: ammonium acetate (70%, 95%, and 100%). Air dried slides are opposed to x-ray film for 3 days and then photographically processed. The slides from all animals are hybridized, washed, exposed and photographically processed together to eliminate differences due to interassay variation in conditions.

10

Rat Hot Flush - CNS Effects

Ovariectomized-female, 60 days-old, Sprague-Dawley rats are obtained following surgery. The surgeries are done a minimum of 8 days prior to the first treatment. The animals are housed individually under a 12/12 hours light/dark cycle and given standard rat chow and water ad libitum.

15

Two control groups are included in every study. Doses are prepared based on mg/kg mean group body weight in either 10% DMSO in sesame oil (sc studies) or in 1.0% Tween 80 in saline ((po) studies). Animals are administered test compounds at doses ranging from 0.01 to 10 mg/kg mean group body weight. Vehicle and ethinyl estradiol (EE) controls (0.1 mg/kg, sc or 0.3 mg/kg, po) control groups are included in each test. When the compounds are tested for their antagonist activity, EE is coadministered at 0.1 or 0.3 mg/kg for sc or po studies, respectively. The test compounds are administered up to the day that tail skin temperature is measured.

20

After the acclimation period of four days, the animals are treated once daily with the compound(s) of interest. There are 10 animals/treatment group. Administration of the compound is either by sc injection of 0.1 ml in the nape of the neck or po in a volume of 0.5 ml. On the 3rd day of treatment, a morphine pellet (75 mg morphine sulfate) is implanted subcutaneously. On the 5th day of treatment, one or two additional morphine pellets are implanted. On the eighth day, approximately half of the animals are injected with Ketamine (80 mg/kg, Intramuscularly) and a thermocouple, connected to a MacLab Data Acquisition System (API Instruments, Milford, MA) is taped on the tail approximately one inch from the root of the tail. This system allowed the continuous measurement of tail skin temperature. Baseline

30

temperature is measured for 15 mins., then naloxone (1.0 mg/kg) is given sc (0.2 mL) to block the effect of morphine, and tail skin temperature is measured for one hour thereafter. On the ninth day, remaining animals are set up and analyzed similarly.

5 *Vasomotor Function in Isolated Rat Aortic Rings*

Sprague-Dawley rats (240-280 grams) are divided into 4 groups:

1. Normal non-ovariectomized (Intact)
2. Ovariectomized (ovex) vehicle treated
3. Ovariectomized 17- β estradiol treated (1 mg/kg/day)
- 10 4. Ovariectomized animals treated with test compound (i.e., 1 mg/kg/day).

The animals are ovariectomized approximately 3 weeks prior to treatment. Each animal receives 1 mg/kg/day of either 17- β estradiol sulfate or test compound suspended in distilled, deionized water with 1% Tween-80 by gastric gavage. Vehicle treated animals received an appropriate volume of the vehicle used in the
15 drug treated groups.

Animals are euthanized by CO₂ inhalation and exsanguination. Their thoracic aortas are rapidly removed and placed in 37 °C physiological solution with the following composition (mM): NaCl (54.7), KCl (5.0), NaHCO₃ (25.0), MgCl₂·2H₂O (2.5), D-glucose (11.8) and CaCl₂ (0.2) gassed with CO₂-O₂, 95%/5% for a final pH of
20 7.4. The adventitia is removed from the outer surface and the vessel is cut into 2-3 mm wide rings. The rings are suspended in at 10 mL tissue bath with one end attached to the bottom of the bath and the other to a force transducer. A resting tension of 1 gram is placed on the rings. Rings are equilibrated for 1 hour, while signals are acquired and analyzed.

25 After equilibration, the rings are exposed to increasing concentrations of phenylephrine (10⁻⁸ to 10⁻⁴ M) and the tension recorded. Baths are then rinsed 3 times with fresh buffer. After washout, 200 mM L-NAME is added to the tissue bath and equilibrated for 30 minutes. The phenylephrine concentration response curve is then repeated.

30

Eight Arm Radial Arm Maze - Cognition Enhancement

Male, Sprague-Dawley, CD rats (Charles River, Kingston, NY) weighing 200-250 g on arrival are used. For one week, the rats are housed, six per cage, with

standard laboratory chow and water available ad libitum. Housing is in a colony room maintained at 22 °C with a 12/12 hours light/dark cycle with lights on at 6:00 AM. Following habituation to the facility, the animals are individually housed and maintained at 85% of free-feeding weight. Once stable weights are attained, the rats are acclimated to the 8-arm radial maze.

The structure of the maze is an adaptation from that of Peele and Baron (*Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 29:143-150 (1988)). The maze is elevated to a height of 75.5 cm and composed of a circular area surrounded by 8 arms radiating away from the center, equidistant from one another. Each arm is 58 cm long x 13 cm high. A clear plexiglass cylinder is lowered to enclose the animal in the center portion of the maze prior to the start of each session. Each arm of the maze is equipped with 3 sets of photocells interfaced to a data acquisition unit, which in turn is interfaced to a computer. The photocells are used to track the movement of the rat in the maze. Pellet feeders located above food cups at the end of each arm, dispensed two 45 mg chocolate pellets when the outer photocell of the arm is activated for the first time in a given session. The maze is located in a testing room with black and white geometric posters on each wall to serve as visual cues. During all training and testing procedures, white noise is audible (~ 70 db).

The training procedure consists of five phases, each with daily sessions lasting 5 or 10 minutes. A 10 second delay is imposed between the time the rat is placed in the center portion of the maze and when the cylinder is raised to begin the session. During Phase I, food-restricted pairs of rats are placed on the maze for 10 minutes with 45 mg chocolate food pellets scattered throughout the 8 arms of the maze. During Phase II, each rat is placed individually on the maze for a 10 minute period, with pellets scattered from the middle photocell to the food cup of each arm. During Phase III, each rat is placed on the maze for a 10 minute period, with food pellets located only in and around the food cups in each arm. In Phase IV, each rat is allowed 10 minutes to collect two pellets from each arm. Re-entry into an arm is considered an error. Rats are trained daily in this manner until they achieved criterion performance with less than or equal to 2 total errors on three consecutive days of training. Total habituation and training time is approximately 3 weeks.

Test compound is prepared in phosphate buffered saline and administered in a volume of 1 ml/kg. Scopolamine HBr (0.3 mg/kg sc) served as the impairing agent.

producing an increase in error rate (loss of memory). Test compound is given intraperitoneally, simultaneously with scopolamine, 30 minutes prior to the first maze exposure on any given test day.

To assess the test compound, an 8 x 8 balanced Latin square for repeated measures is designed, in order to achieve a high experimental efficiency with the least amount of animals. Eight experimental sessions, two per week, are conducted with the 8 treatments (vehicle, scopolamine, 3 doses of test compound in combination with scopolamine) randomized within each session. Each treatment followed every other treatment the same number of times. Therefore, the residual effect of every treatment could be estimated and removed from the direct treatment effect. Following ANOVA, multiple comparisons are performed using Dunnett's two-sided test on adjusted means.

Animals that do not make 4 correct choices within 5 minutes during the first exposure, or that have not made a total of 8 choices by the end of the second exposure, are considered to have "timed-out" for that session. Any animal that "timed-out" following administration of more than one dose of the test compound is excluded from the analysis.

Neuroprotection

20

Inhibition of Time-Dependent Death of Cells in Primary Cortical Neuron Cultures

Primary cortical neurons were produced from rat brains that were 0-1 day old using a variation of methods described by Monyer et al., *Brain Research* 483:347-354 (1989). Dispersed brain tissue was grown in DMEM/10% PDHS (pregnant donor horse serum) for three days and then treated with cytosine arabinoside (ARC) for two days to remove contaminating glial cells. On day 5, the ARC media was removed and replaced with DMEM/10% PDHS. The neuronal cells were cultured for a further 4-7 days before use.

Control primary neuronal cultures show progressive cell death between days 12 and 18 in culture. Twelve cultures were evaluated on days 12 and 18 for levels of the enzyme lactate dehydrogenase (LD) after adding test compound to 6 cultures maintained in DMEM and 10% PDHS on day 9 and maintaining the remaining cultures as controls. LD was assayed using a variation of the method by Wroblewski

et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90:210-213 (1955). LD is a cytosolic enzyme that is commonly used in both clinical and basic research to determine tissue viability. An increase in media LD is directly related to cell death.

Neuroprotection Against Cytotoxicity Induced by Hypoglycemia

- 5 C6 glioma cells obtained from American Tissue Culture Center (ATCC) were plated in RPMI media with FBS at a concentration of 1×10^5 cells/mL in FALCON® 25 cm² tissue culture flasks. Four hours prior to the onset of hypoglycemia, the maintenance media was discarded, monolayers were washed twice in the appropriate media and then incubated for four hours at 37 °C in either serum free or
- 10 serum free plus test compound. Kreb's Ringer Phosphate buffer was used to wash the monolayers twice before the addition of appropriate glucose treatment. RPMI medium contains 2 mg glucose/mL; flasks were divided into groups of 6 with each receiving 100% glucose (2 mg/ml), 80% glucose (1.6 mg/ml), 60% glucose (1.2 mg/ml) or 0% glucose (buffer) or supplemented with test compound. All flasks were
- 15 incubated for 20 hours and then evaluated for total, live, and dead cell number utilizing trypan blue.

Neuroprotection Against Excitotoxic Amino Acids

- Five culture dishes containing SK-N-SH neuroblastoma cells were treated
- 20 with test compound and 5 culture dishes were treated with RPMI media. Four hours later, all cells were treated with NMDA (500 µM) for 5 minutes. Total live cells and dead cells were then determined.

Neuroprotection Against Oxygen-Glucose Deprivation - Analysis of pyknotic nuclei to measure apoptosis

- 25 Cortical neurons are prepared from E18 rat fetus and plated in 8-well chamber slides pre-coated with poly-D-lysine (10 ng/ml) and serum at a density of 100,000 cells/well. Cells are plated in high glucose DMEM containing 10% FCS and kept in the incubator at 37 °C with 10% CO₂/90% air. On the next day, serum is removed by replacing culture media with high glucose DMEM containing B27
- 30 supplement, and cells are kept in the incubator without further media change until the day of experiment. On day 8, slides are divided into two groups: a control group and a OGD group. Cells in the control group receive DMEM with glucose and custom B27 (without antioxidants). Cells in the OGD group receive no-glucose DMEM with

custom B27, which has been degassed under vacuum for 15 mins. Cells are flushed with 90% N₂/10% CO₂ for 10 mins. In an airtight chamber and incubated at 37 °C for 6 hours. After 6 hours, both control and OGD cells are subject to replacement of media containing either vehicle (DMSO) or test compound in glucose-containing DMEM with custom B27. Cells are returned to a normoxic incubator at 37 °C. After 24 hours, cells are fixed in 4% PFA for 10 mins. at 4 °C and stained with Topro (fluorescent nuclear binding dye). Apoptosis is assessed using a laser scanning cytometer by measuring pyknotic nuclei.

10 *Measurement of LDH release as an indication of cell death*

Cortical neurons are prepared from E18 rat fetus and plated in 48-well culture plates pre-coated with poly-D-lysine (10 ng/ml) and serum at a density of 150,000 cells/well. Cells are plated in high glucose DMEM containing 10% FCS and kept in the incubator at 37 °C with 10% CO₂/90% air. On the next day, serum is removed by replacing culture media with high glucose DMEM containing B27 supplement. On day 6, cells are divided into two groups: a control group and a OGD group. Cells in the control group receive DMEM with glucose and custom B27 (without antioxidants). Cells in the OGD group receive no-glucose DMEM with custom B27, which has been degassed under vacuum for 15 mins. Cells are flushed with 90% N₂/10% CO₂ for 10 mins. In an airtight chamber and incubated at 37 °C for 6 hours. After 6 hours, both control and OGD cells are subject to replacement of media containing either vehicle (DMSO) or test compound in glucose-containing DMEM with custom B27. Cells are returned to a normoxic incubator at 37 °C. After 24 hours, cell death is assessed by measuring cellular release of LDH (lactate dehydrogenase) into the culture medium. For the LDH assay, an aliquot of 50 µl culture medium is transferred into the 96-well plate. After the addition of 140 µl 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 100 µl 0.2 mg/ml NADH, the plate is allowed to sit in the dark at room temperature for 20 mins. The reaction is initiated by the addition of 10 µl of sodium pyruvate. The plate is read immediately at 340 nm in a Thermomax plate reader (Molecular Devices). The absorbance, an index of NADH concentration, is recorded every 5 seconds for 5 minutes and the slope indicating the rate of NADH disappearance is used to calculate LDH activity:

$$\text{LDH Activity (U/ml)} = (\Delta A/\text{min}) (\text{TCF})(20) (0.0833) (.78)$$

where:

0.0833 = proportionality constant and
0.78 = instrument light path length (cm).

5 HLA Rat Test Procedure - Crohn's Disease and Inflammatory Bowel Disorders

Male HLA-B27 rats are obtained from Taconic and provided unrestricted access to a food (Purina Mills® LabDiet® 5001) and water. At the start of the study, rats are 22-28 weeks old.

10 Rats are dosed subcutaneously once per day for seven days with one of the formulations listed below. There are five rats in each group and the last dose is administered two hours before euthanasia.

- Vehicle (50% DMSO/50% Dulbecco's PBS);
- 17 α -ethinyl-17 β -estradiol (10 μ g/kg); or
- test compound.

15 Stool quality is observed daily and graded according to the following scale: Diarrhea = 3; soft stool = 2; normal stool = 1. At the end of the test procedure, serum is collected and stored at -70 °C. A section of colon is prepared for histological analysis and an additional segment is analyzed for myeloperoxidase activity.

20 The following method is used to measure myeloperoxidase activity. Colon tissue is harvested and flash frozen in liquid nitrogen. A representative sample of the entire colon is used to ensure consistency between samples. The tissue is stored at -80 °C until use. Next, the tissue is weighed (approximately 500mg) and homogenized in 1:15 w/v of 5 mM H₂KPO₄ (pH 6) washing buffer. The tissue is spun down at 20,000 x g in a Sorvall RC 5B centrifuge for 45 minutes at 2-8 °C.
25 Supernatant is then discarded. Tissue is resuspended and homogenized in 2.5 mL (1:5 w/v) of 50 mM H₂KPO₄ with 10 mM EDTA and 0.5% Hex Ammonium Bromide to help solubilize the intracellular MPO. Tissue is frozen in liquid nitrogen, thawed in a 37 °C-water bath and sonicated for 15 seconds to ensure membrane lysis. This procedure is repeated 3 times. Samples are then kept on ice for 20 minutes and
30 centrifuged at 12,000 x g for 15 minutes at 2-8 °C. The supernatant is analyzed following these steps.

The test mixture is prepared by adding 2.9 mL of 50 mM H₂KPO₄ with 0.167 O-Dianisidine/ml with 0.0005% H₂O₂ into a reaction tube. When hydrogen peroxide is degraded, O-Dianisidine is oxidized and absorbs at 460 nm in a concentration

dependent manner. The mixture is heated to 25 °C. One hundred (100) µL of the tissue supernatant is added to the reaction tube and incubated for one minute at 25 °C, then 1 ml is transferred to a disposable plastic cuvette. Optical density (OD) is measured every 2 minutes of reaction time at 480 nm against a blank containing 2.9 mL of reaction mixture and 100 µL of the 0.5% ammonium bromide solution.

Enzyme activity units are quantified by comparison of absorbance at 480 nm to a standard curve prepared with purified human MPO 31.1 units/vial. The MPO is reconstituted and serially diluted using 50mM H₂KPO₄ with 10 mM EDTA and 0.5% Hex Ammonium Bromide to four known concentrations. Sample absorbances are compared against this curve to determine activity.

Histological analysis is performed as follows. Colonic tissue is immersed in 10% neutral buffered formalin. Each specimen of colon is separated into four samples for evaluation. The formalin-fixed tissues are processed in a vacuum infiltration processor for paraffin embedding. The samples are sectioned at 5 µm and then stained with hematoxylin and eosin (H&E) for blinded histologic evaluations using a scale modified after Boughton-Smith. After the scores are completed the samples are unblinded, and data are tabulated and analyzed by ANOVA linear modeling with multiple mean comparisons.

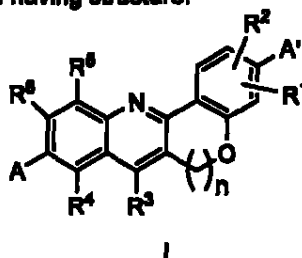
Based on the results obtained in the standard pharmacological tests procedures, as described herein, the compounds of this invention are estrogen receptor modulators useful in the treatment or inhibition of conditions, disorders, or disease states that are at least partially mediated by an estrogen deficiency or excess, or which may be treated or inhibited through the use of an estrogenic agent.

It is intended that each of the patents, applications, and printed publications, including books, mentioned in this patent document be incorporated herein by reference in their entirety. This application claims priority benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/607,766 filed September 7, 2004, which is incorporated herein by reference in its entirety.

As those skilled in the art will appreciate, numerous changes and modifications may be made to the preferred embodiments of the invention without departing from the spirit of the invention. It is intended that all such variations fall within the scope of the invention.

What is claimed is:

1. A compound of formula I having structure:



5 wherein:

A and A' are each independently OH, H or OR;

each R is independently selected from the group consisting of C₁-C₆ alkyl, alkenyl, benzyl, acyl, aroyl, -C(=O)-OR', sulfonyl and phosphoryl, wherein each R' is independently selected from C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, or C₃-C₁₀ cycloalkyl, each of which are optionally substituted by 1 to 3 substituents selected from C₁-C₆ alkyl or halogen;

R¹ and R² are independently selected from the group consisting of H, halogen, C₁-C₆ alkyl, C₁-C₆ perhaloalkyl, CF₃, C₂-C₇ alkenyl and C₁-C₆ alkoxy;

R³, R⁴, R⁵ and R⁶ are each independently selected from the group consisting of H, halogen, CF₃, C₁-C₆ perhaloalkyl, C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ alkoxy, CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl and heteroaryl;

wherein the alkyl or alkenyl moieties of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents independently selected from halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, NO₂ or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R¹⁰ groups;

wherein the alkynyl moiety of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, -CHO, acyl, trifluoroalkyl, trialkylsilyl or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R¹⁰ groups;

wherein the phenyl, aryl or heteroaryl moiety of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, alkyl, alkoxy, perfluoroalkyl or perfluoroalkoxy;

each R¹⁰ is independently selected from the group consisting of halogen, C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, -OH, C₁-C₆ alkoxy, -CN, -CHO, -NO₂, amino, C₁-C₆ alkylamino, di-(C₁-C₆)alkylamino, thiol, and C₁-C₆ alkylthio; and
n is 0, 1, 2, or 3;

5 provided that:

at least one of A and A' is not H;

if n is 0, then R₃ is not halogen; and

at least one of R³, R⁴ and R⁵ is halogen, C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ alkoxy, -CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl or heteroaryl;

10 or an N-oxide thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof or a prodrug thereof.

1. The compound of claim 1 wherein A and A' are each OH.

15 2. The compound of claim 1 wherein one of A and A' is OH, and the other of A and A' is OR.

3. The compound of claim 1 wherein one of A and A' is OH, and the other of A and A' is O-C₁-C₆ alkyl.

20

4. The compound of claim 1 wherein A and A' are each OR.

5. The compound of claim 5 wherein A and A' are each -O-C₁-C₆ alkyl.

25 6. The compound of claim 1 wherein one of A and A' is H, and the other of A and A' is OH or OR.

7. The compound of claim 1 wherein one of A and A' is H, and the other of A and A' is OH or O-C₁-C₆ alkyl.

30

8. The compound of any one of claims 1 to 8, wherein R³ and R⁵ are each, independently, H, halogen, C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, -CN, -CHO, acyl or optionally substituted phenyl, as previously defined.

9. The compound of claim 9 wherein R^3 is other than H.
10. The compound of any one of claims 1 to 8, wherein R^3 is halogen, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_6 alkoxy, perfluoroalkyl and CN; and R^4 is H, halogen, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_6 alkoxy, perfluoroalkyl and CN.
11. The compound of claim 11 wherein said phenyl of said R^3 is optionally substituted with up to three substituents selected from F, Cl, Br, CN, OCH_3 and CF_3 .
12. The compound of any one of claims 1 to 8 wherein R^3 is halogen, C_2-C_7 alkynyl or -CN.
13. The compound of any one of claims 1 to 8 wherein R^3 and R^5 are each independently halogen, C_2-C_7 alkynyl or -CN.
14. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein one of R^1 and R^2 is halogen.
15. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein one of R^1 and R^2 is fluorine.
16. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein one of R^1 and R^2 is halogen, and the other of R^1 and R^2 is H.
17. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein one of R^1 and R^2 is fluorine, and the other of R^1 and R^2 is H.
18. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein R^1 and R^2 are each independently halogen.
19. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein R^1 and R^2 are each H.

20. The compound of any one of claims 1 to 14 wherein R^1 and R^2 are each fluorine.
21. The compound of any one of claims 1 to 21 wherein R^4 is H, halogen or -CN.
- 5 22. The compound of any one of claims 1 to 21 wherein R^4 is H.
23. The compound of any one of claims 1-8 wherein:
 R^3 is halogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl
10 optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_8 alkoxy, perfluoroalkyl and CN;
 R^6 is H, halogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, -CN, -CHO, or phenyl optionally substituted with up to three groups selected from halogen, C_1-C_8 alkoxy, perfluoroalkyl and CN;
15 one of R^1 and R^2 is halogen; and R^4 is H, halogen or -CN.
24. The compound of claim 2 wherein R^3 is halogen, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
- 20 25. The compound of claim 2 wherein R^3 is OH, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
26. The compound of claim 2 wherein R^3 is C_2-C_7 alkenyl, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
- 25 27. The compound of claim 2 wherein R^3 is CN, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
28. The compound of claim 2 wherein R^3 is C_2-C_7 alkynyl, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
- 30 29. The compound of claim 8 wherein R^3 is C_1-C_8 alkyl, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.

30. The compound of claim 8 wherein R^3 is optionally substituted phenyl, and R^1 , R^2 , R^4 , R^5 and R^6 are hydrogen.
- 5 31. The compound of claim 31 wherein said substituents of said phenyl are selected from the group consisting of halogen, C_1 - C_3 alkoxy, perfluoroalkyl and CN.
32. The compound of any one of claims 1-23 or 25-32 wherein n is 1.
- 10 33. The compound of claim 24 wherein n is 1.
34. A compound which is:
- a) 3,9-Dimethoxy-8H-chromeno[4,3-b]quinolin-7-ol;
 - b) 7-Chloro-3,9-dimethoxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - 15 c) 7-Bromo-3,9-dimethoxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - d) 7-Chloro-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - e) 7-Bromo-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - f) 3,9-Dihydroxy-7-vinyl-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - g) 3,9-Dihydroxy-7-[(trimethylsilyl)ethynyl]-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - 20 h) 3,9-Dihydroxy-7-ethynyl-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - i) 3,9-Dihydroxy-7-ethyl-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - j) 7-Cyano-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - k) 7-(4-Chlorophenyl)-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - l) 7-(4-Cyanophenyl)-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - 25 m) 3,9-Dihydroxy-7-(4-methoxyphenyl)-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - n) 3,9-Dihydroxy-7-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - o) 7-(3-Chlorophenyl)-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - p) 3,9-Dihydroxy-7-(3-methoxyphenyl)-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - q) 7-(3-Cyanophenyl)-3,9-dihydroxy-8H-chromeno[4,3-b]quinoline;
 - 30 or pharmaceutically acceptable salts, chelates, complexes or prodrugs thereof.
35. A composition comprising a compound according to claim 35.

36. A composition comprising a compound according to any one of claims 1 to 35.
37. A method of treating or inhibiting osteoporosis or inhibiting bone demineralization in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
38. A method of treating or inhibiting inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative proctitis, or colitis in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
39. A method of lowering cholesterol, triglycerides, Lp(a), or LDL levels; inhibiting or treating hypercholesterolemia; hyperlipidemia; cardiovascular disease; atherosclerosis; peripheral vascular disease; restenosis, or vasospasm; or inhibiting vascular damage in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
40. A method of providing cognition enhancement or neuroprotection; or treating or inhibiting senile dementias, Alzheimer's disease, cognitive decline, stroke, anxiety, or neurodegenerative disorders in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
41. A method of treating or inhibiting free radical induced disease states in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
42. A method of treating or inhibiting vaginal or vulvar atrophy; atrophic vaginitis; vaginal dryness; pruritus; dyspareunia; dysuria; frequent urination; urinary incontinence; urinary tract infections in a mammal in need thereof, which

comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

43. A method of treating or inhibiting vasomotor symptoms in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

44. A method of claim 44 wherein the vasomotor symptom is hot flashes.

45. A method of contraception in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

46. A method of treating or inhibiting rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or spondyloarthropathies in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

47. A method of treating or inhibiting joint damage secondary to arthroscopic or surgical procedures in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

48. A method of treating or inhibiting infertility in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

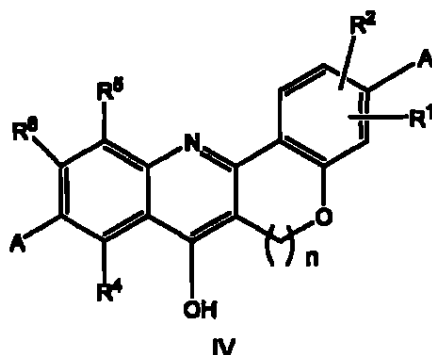
49. A method of treating or inhibiting ischemia, reperfusion injury, asthma, pleurisy, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, myalgia, arthralgia, insomnia, irritability, uveitis, sepsis, hemorrhagic shock, or type II diabetes in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

50. A method of treating or inhibiting hypocalcemia, hypercalcemia, Paget's disease, osteomalacia, osteomalacia, multiple myeloma in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
- 5
51. A method of treating or inhibiting benign or malignant abnormal tissue growth, including prostatic hypertrophy, uterine leiomyomas, breast cancer, endometriosis, endometrial cancer, polycystic ovary syndrome, endometrial polyp, benign breast disease, adenomyosis, ovarian cancer, melanoma, prostate cancer, colon cancers or CNS cancers in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
- 10
52. A method of claim 52 wherein the benign or malignant abnormal tissue growth is prostatic hypertrophy, uterine leiomyomas, breast cancer, cancer, polycystic ovary syndrome, endometrial polyp, benign breast disease, adenomyosis, ovarian cancer, melanoma, prostate cancer, colon cancers or CNS cancers.
- 15
53. A method of claim 53 wherein the CNS cancers are glioma or ependymoma.
- 20
54. A method of treating or inhibiting cancers, central nervous system disorders or trauma, bone disease, aging, inflammatory disorders, peripheral vascular disease, autoimmune diseases, respiratory distress, emphysema, viral hepatitis, chronic active hepatitis, tuberculosis, psoriasis, adult respiratory distress syndrome in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
- 25
55. A method of treating or inhibiting skin atrophy, acne or male pattern baldness in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.
- 30

56. A method of treating or inhibiting leukemia, endometrial ablations, chronic renal disease, hepatic disease or coagulation diseases or disorders in a mammal in need thereof, which comprises providing to said mammal an effective amount of one or more compounds according to any one of claims 1 to 35.

5

57. A method for the preparation of a compound of Formula IV:



wherein:

10 wherein:

A and A' are each independently OH, H or OR;

each R is independently selected from the group consisting of C₁-C₆ alkyl, alkenyl, benzyl, acyl, aryl, -C(=O)-OR', sulfonyl and phosphoryl, wherein each R' is independently selected from C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, or C₂-C₁₀ cycloalkyl, each of which are optionally substituted by 1 to 3 substituents selected from C₁-C₆ alkyl or halogen;

15

R¹ and R² are independently selected from the group consisting of H, halogen, C₁-C₆ alkyl, C₁-C₆ perhaloalkyl, CF₃, C₂-C₇ alkenyl and C₁-C₆ alkoxy;

20

R³, R⁴, R⁵ and R⁶ are each independently selected from the group consisting of H, halogen, CF₃, C₁-C₆ perhaloalkyl, C₁-C₆ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇ alkynyl, C₂-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ alkoxy, CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl and heteroaryl;

wherein the alkyl or alkenyl moieties of R³, R⁴, R⁵ and R⁶ can each be optionally substituted with up to three substituents independently selected from halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, NO₂ or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R¹⁰ groups;

25

wherein the alkynyl moiety of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, -CHO, acyl, trifluoroalkyl, trialkylsilyl or phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

- 5 wherein the phenyl, aryl or heteroaryl moiety of R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can each be optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, alkyl, alkoxy, perfluoroalkyl or perfluoroalkoxy;

- each R^{10} is independently selected from the group consisting of halogen, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, -OH, C_1 - C_6 alkoxy, -CN, -CHO, -NO₂, amino, C_1 - C_6 alkylamino, di- $(C_1$ - $C_6)$ alkylamino, thiol, and C_1 - C_6 alkylthio; and
 10 n is 0, 1, 2, or 3;

provided that:

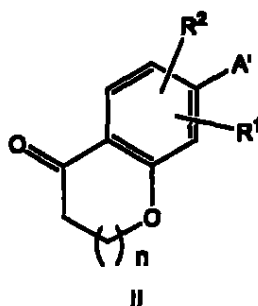
at least one of A and A' is not H;

if n is 0, then R_8 is not halogen; and

- 15 at least one of R^3 , R^4 and R^5 is halogen, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_7 alkenyl, C_2 - C_7 alkynyl, C_2 - C_7 cycloalkyl, C_1 - C_6 alkoxy, -CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl or heteroaryl; or an N-oxide thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof or a prodrug thereof.

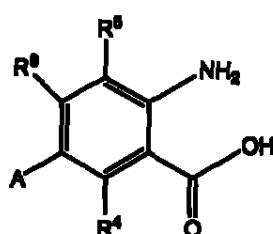
comprising the steps of:

- 20 a) providing a compound of Formula II:



and;

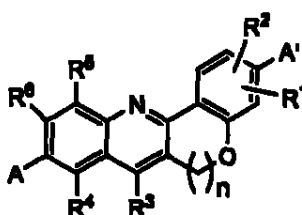
- 25 b) reacting the compound of Formula II with a compound of Formula III:



III

to produce the compound of Formula IV.

- 5 58. The method of claim 58 further comprising the step of contacting the compound of Formula IV with a modifying reagent to form a compound of Formula I:



I

wherein:

- 10 R^3 is selected from the group consisting of H, halogen, CF_3 , C_1-C_6 perhaloalkyl, C_1-C_6 alkyl, C_2-C_7 alkenyl, C_2-C_7 alkynyl, C_3-C_7 cycloalkyl, C_1-C_6 alkoxy, CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl and heteroaryl;

- 15 wherein the alkyl or alkenyl moieties of R^3 are optionally substituted with up to three substituents independently selected from halogen, OH, CN, trifluoroalkyl, trifluoroalkoxy, NO_2 and phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

- wherein the alkynyl moiety of R^3 are optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, -CHO, acyl, trifluoroalkyl, trialkylsilyl and phenyl, wherein said phenyl is optionally substituted with up to three independently selected R^{10} groups;

- 20 wherein the phenyl, aryl or heteroaryl moiety of R^3 is optionally substituted with up to three substituents selected from halogen, -CN, alkyl, alkoxy, perfluoroalkyl or perfluoroalkoxy;

provided that:

at least one of A and A' is not H;

If n is 0, then R₆ is not halogen; and

at least one of R³, R⁴ and R⁵ is halogen, C₁-C₈ alkyl, C₂-C₇ alkenyl, C₂-C₇
alkynyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₁-C₈ alkoxy, -CN, -CHO, acyl, phenyl, aryl or heteroaryl;
5 or an N-oxide thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof or a prodrug
thereof.

59. The product of the process of claim 58.

10 60. The product of the process of claim 59.

**6H-[1]BENZOPIRAN [4,3-b]QUINOLINAS, Y SU USO COMO AGENTES
ESTROGENICOS**

CAMPO DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a compuestos de 6H-[1]benzopirano[4,3-b]quinolina, su uso como agentes estrogénicos, y métodos para su preparación.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los efectos pleiotrópicos de los estrógenos en tejidos de mamífero han estado bien documentados, y se aprecia ahora que los estrógenos afectan muchos sistemas de órganos (véase Mendelsohn y Karas, *New England Journal of Medicine* 340: 1801-1811 (1999), Epperson, *et al.*, *Psychosomatic Medicine* 61: 676-697 (1999), Crandall, *Journal of Womens Health & Gender Based Medicine* 8: 1155-1166 (1999), Monk y Brodaty, *Dementia & Geriatric Cognitive Disorders* 11: 1-10 (2000), Hum y Macrae, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20: 631-652 (2000), Calvin, *Maturitas* 34: 195-210 (2000), Finking, *et al.*, *Zeitschrift fur Kardiologie* 89: 442-453 (2000), Brincat, *Maturitas* 35: 107-117 (2000), Al-Azzawi, *Postgraduate Medical Journal* 77: 292-304 (2001)). Los estrógenos pueden ejercer efectos sobre los tejidos de varias formas, y el mecanismo de acción

más bien caracterizado es su interacción con receptores de estrógeno que llevan a alteraciones en la transcripción génica. Los receptores de estrógeno son factores de transcripción activados por ligandos y pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Otros miembros de esta familia incluyen los receptores de progesterona, andrógeno, glucocorticoide y mineralocorticoide. Después de que se unen al ligando, estos receptores se dimerizan y pueden activar la transcripción génica uniéndose directamente a secuencias específicas en el ADN (conocidas como elementos de respuesta), o interactuando con otros factores de transcripción (tales como AP1), los cuales a su vez se unen directamente a secuencias de ADN específicas (véase Moggs y Orphanides, *EMBO Reports* 2: 775-781 (2001), Hall, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 276: 36869-36872 (2001), McDonnell, *Principles of Molecular Regulation* 351-361 (2000)). Una clase de proteínas "co-reguladoras", puede interactuar también con el receptor unido al ligando, y modula además su actividad de transcripción (véase McKenna, *et al.*, *Endocrine Reviews* 20: 321-344 (1999)). Se ha mostrado también que los receptores de estrógeno pueden suprimir la transcripción mediada por NFκB en una forma dependiente e independiente del ligando (véase Quaedackers, *et al.*, *Endocrinology* 142: 1156-1166 (2001), Bhat, *et al.*, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 67: 233-240 (1998), Pelzer, *et al.*, *Biochemical & Biophysical Research Communications* 286: 1153-7 (2001)).

Los receptores de estrógeno pueden ser activados también por la fosforilación. Esta fosforilación es mediada por factores de crecimiento tales

como el EGF, y causa cambios en la transcripción génica en ausencia del ligando (véase Moggs y Orphanides, *EMBO Reports* 2: 775-781 (2001), Hall, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 276: 36869-36872 (2001)).

Un medio menos bien caracterizado por el cual los estrógenos
5 pueden afectar a las células, es a través del denominado receptor de membrana. La existencia de dicho receptor es controversial, pero ha sido bien documentado que los estrógenos pueden inducir respuestas no genómicas muy rápidas de las células. No se ha aislado definitivamente la entidad molecular responsable de la transducción de estos efectos, pero existe
10 evidencia que sugiere que está por lo menos relacionada a las formas nucleares de los receptores de estrógeno (véase Levin, *Journal of Applied Physiology* 91: 1860-1867 (2001), Levin, *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10: 374-377 (1999)).

Dos receptores de estrógeno se han descubierto hasta la fecha.
15 El primer receptor de estrógeno fue clonado desde hace aproximadamente 15 años, y es referido ahora como ER α (véase Green, *et al.*, *Nature* 320: 134-9 (1986)). La segunda forma del receptor de estrógeno se encontró comparativamente recientemente, y se denomina ER β (véase Kuiper, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
20 *America* 93: 5925-5930 (1996)). Los primeros trabajos sobre el ER β se enfocaron en definir su afinidad por una variedad de ligandos, y por supuesto se observaron algunas diferencias con el ER α . La distribución del ER β en los tejidos ha sido bien mapeada en el roedor, y no es coincidente con el ER α .

Tejidos tales como el útero de ratón y rata expresan predominantemente el ER α , mientras que otros tejidos tales como el pulmón de ratón y rata expresan predominantemente el ER β (véase Couse, *et al.*, *Endocrinology* 138: 4613-4621 (1997), Kuiper, *et al.*, *Endocrinology* 138: 863-870 (1997)). Incluso
5 dentro del mismo órgano, la distribución del ER α y el ER β puede estar compartimentada. Por ejemplo, en el ovario de ratón, el ER β es altamente expresado en las células de la granulosa, y el ER α es restringido a las células de la teca y el estroma (véase Sar y Welsch, *Endocrinology* 140: 963-971 (1999), Fitzpatrick, *et al.*, *Endocrinology* 140: 2581-2591 (1999)). Sin embargo,
10 existen ejemplos en donde los receptores son coexpresados, y existe evidencia de estudios *in vitro* de que el ER α y el ER β pueden formar heterodímeros (véase Cowley, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 272: 19858-19862 (1997)).

Se ha descrito un gran número de compuestos que imitan o
15 bloquean la actividad del 17 β -estradiol. Los compuestos que tienen casi los mismos efectos biológicos del 17 β -estradiol, el estrógeno endógeno más potente, son referidos como "agonistas del receptor de estrógeno". Aquellos que, cuando se administran en combinación con el 17 β -estradiol bloquean sus efectos, se denominan "antagonistas del receptor de estrógeno". En realidad,
20 existe un continuum entre la actividad de los agonistas del receptor de estrógeno y los antagonistas del receptor de estrógeno, y por supuesto, algunos compuestos se comportan como agonistas del receptor de estrógeno en algunos tejidos, y como antagonistas del receptor de estrógeno en otros.

Estos compuestos con actividad mixta se denominan moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERMS), y son agentes terapéuticamente útiles (por ejemplo, EVISTA®) (véase McDonnell, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7: S10-S15 (2000), Goldstein, *et al.*, *Human*
5 *Reproduction Update* 6: 212-224 (2000)). No se ha dilucidado la razón precisa del por qué el mismo compuesto puede tener efectos específicos en las células, pero se han sugerido diferencias en la conformación del receptor y/o en el ambiente de las proteínas co-reguladoras.

Se ha sabido por algún tiempo que los receptores de estrógeno
10 adoptan diferentes conformaciones cuando se unen a ligandos. Sin embargo, la consecuencia y sutileza de estos cambios se han revelado sólo recientemente. Las estructuras tridimensionales del ER α y el ER β se han resuelto por co-cristalización con varios ligandos, y muestran claramente el reposicionamiento de la hélice 12 en presencia de un antagonista del receptor
15 de estrógeno, que impide estéricamente las secuencias de proteína que se requieren para la interacción entre la proteína co-reguladora y el receptor (véase Pike, *et al.*, *EMBO* 18: 4608-4618 (1999), Shiau, *et al.*, *Cell* 95: 927-937 (1998)). Además, la técnica de exhibición de fagos se ha usado para
20 identificar péptidos que interactúan con receptores de estrógeno en presencia de diferentes ligandos (véase Paige, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 3999-4004 (1999)). Por ejemplo, se identificó un péptido que distinguió entre el ER α unido a los agonistas del receptor de estrógeno completo 17 β -estradiol y

dietilestilbestrol. Se mostró que un péptido diferente distingue entre clomifeno unido al $ER\alpha$ y el $ER\beta$. Estos datos indican que cada ligando pone potencialmente al receptor en una conformación única e impredecible que es probable que tenga actividades biológicas distintas.

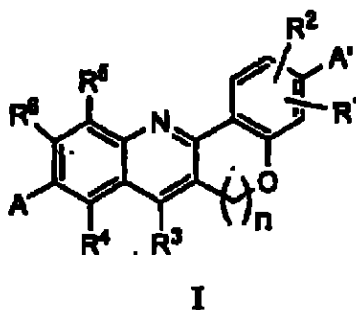
5 Como se mencionó anteriormente, los estrógenos afectan un sin número de procesos biológicos. Además, en donde se han descrito diferencias de género (por ejemplo, frecuencias de enfermedad, respuesta a desafío, etc.), es posible que la explicación implique la diferencia en los niveles de estrógeno entre individuos de sexo masculino y femenino. Dada la
10 importancia de estos compuestos, puede verse que existe la necesidad de nuevos agentes estrogénicos. Esta invención está dirigida a estos fines importantes, así como a otros.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

15

La presente invención provee compuestos de 6H-[1]-benzopirano[4,3-b]quinolina que encuentran uso como agentes estrogénicos. En ciertas modalidades, los compuestos tienen la fórmula I:

20



en donde:

A y A' son cada uno independientemente OH, H u OR;

5 cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste de alquilo de C₁-C₈, alquenilo, bencilo, acilo, aroilo, -C(=O)-OR', sulfonilo y fosforilo, en donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇ o cicloalquilo de C₃-C₁₀, cada uno de los cuales es sustituido opcionalmente por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de alquilo de C₁-C₈ o halógeno;

10 R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, alquilo de C₁-C₈, perhaloalquilo de C₁-C₈, CF₃, alquenilo de C₂-C₇ y alcoxi de C₁-C₈;

15 R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, CF₃, perhaloalquilo de C₁-C₈, alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₈, CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo y heteroarilo;

20 en donde las porciones alquilo o alquenilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ pueden ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, NO₂ o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R¹⁰ seleccionados independientemente;

en donde la porción alquinilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, -CHO, acilo, trifluoroalquilo, trialquilsililo o fenilo, en donde

dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente;

en donde la porción fenilo, arilo o heteroarilo de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, alquilo, alcoxi, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi;

cada R^{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste de halógeno, alquilo de C_1-C_8 , alquenilo de C_2-C_7 , -OH, alcoxi de C_1-C_8 , -CN, -CHO, -NO₂, amino, alquilamino de C_1-C_8 , dialquilamino de C_1-C_8 , tiol y alquiltio de C_1-C_8 ; y

n es 0, 1, 2 ó 3;

siempre que:

por lo menos uno de A y A' no sea H;

si n es 0, entonces R_3 no sea halógeno; y

por lo menos uno de R^3 , R^4 y R^5 sea halógeno, alquilo de C_1-C_8 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 , cicloalquilo de C_3-C_7 , alcoxi de C_1-C_8 , -CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo o heteroarilo; o un N-óxido de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un profármaco de los mismos.

Los compuestos de la invención son moduladores del receptor de estrógeno útiles en el tratamiento o inhibición de condiciones, trastornos o estados de enfermedad que son por lo menos mediados parcialmente por una deficiencia o exceso de estrógeno, o que pueden tratarse o inhibirse a través

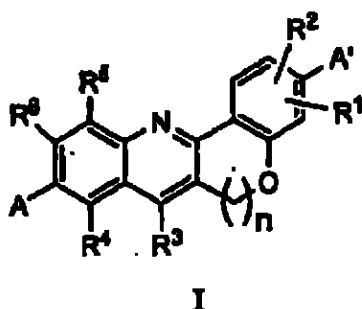
del uso de un agente estrogénico. De esta manera, en algunos aspectos, la invención está dirigida al uso de los compuestos de la invención en el tratamiento o prevención de enfermedades tales como osteoporosis, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, proctitis
 5 ulcerativa, colitis, cánceres dependientes de estrógeno, hipercolesteremia, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, demencias seniles, enfermedad de Alzheimer, trastornos de ansiedad, trastornos neurodegenerativos, infertilidad o artritis.

10

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee compuestos de 6H-[1]benzopirano[4,3-b]quinolina, composiciones que contienen los compuestos, y métodos para el uso de los compuestos como agentes estrogénicos. Los
 15 compuestos de la invención son útiles en el tratamiento y prevención de enfermedades asociadas con el receptor de estrógeno, en particular ER β . En algunas modalidades, los compuestos estrogénicos de la invención tienen la fórmula I:

20



en donde:

A y A' son cada uno independientemente OH, H u OR;

5 cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste de alquilo de C₁-C₆, alquenilo, bencilo, acilo, aroilo, -C(=O)-OR', sulfonilo y fosforilo, en donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇ o cicloalquilo de C₃-C₁₀, cada uno de los cuales es sustituido opcionalmente por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de alquilo de C₁-C₆ o halógeno;

10 R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, alquilo de C₁-C₆, perhaloalquilo de C₁-C₆, CF₃, alquenilo de C₂-C₇ y alcoxi de C₁-C₆;

R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, CF₃, perhaloalquilo de C₁-C₆, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₆, CN, -CHO, acilo, fenilo, aroilo y heteroarilo;

15 en donde las porciones alquilo o alquenilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ pueden ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, NO₂ o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R¹⁰ seleccionados independientemente;

20 en donde la porción alquinilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, -CHO, acilo, trifluoroalquilo, trialquilsililo o fenilo, en donde

dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente;

en donde la porción fenilo, arilo o heteroarilo de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, alquilo, alcoxi, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi;

cada R^{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste de halógeno, alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_2-C_7 , -OH, alcoxi de C_1-C_6 , -CN, -CHO, -NO₂, amino, alquilamino de C_1-C_6 , dialquilamino de C_1-C_6 , tiol y alquiltio de C_1-C_6 ; y

n es 0, 1, 2 ó 3;

siempre que:

por lo menos uno de A y A' no sea H;

si n es 0, entonces R_3 no sea halógeno; y

por lo menos uno de R^3 , R^4 y R^5 sea halógeno, alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 , cicloalquilo de C_3-C_7 , alcoxi de C_1-C_6 , -CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo o heteroarilo; o un N-óxido de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un profármaco de los mismos.

En algunas modalidades, A y A' son cada uno OH. En algunas otras modalidades, uno de A y A' es OH, y el otro de A y A' es OR. En algunas otras modalidades, uno de A y A' es OH, y el otro de A y A' es O-alquilo de C_1-C_6 . En algunas otras modalidades, A y A' son cada uno OR. En algunas otras

modalidades, A y A' son cada uno -O-alquilo de C₁-C₆. En algunas otras modalidades, uno de A y A' es H, y el otro de A y A' es OH u OR. En otras modalidades, uno de A y A' es H, y el otro de A y A' es OH u O-alquilo de C₁-C₆.

5 En algunas modalidades, R³ y R⁶ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, -CN, -CHO, acilo o fenilo sustituido opcionalmente, como se describió previamente. En algunas de dichas modalidades, R³ es diferente de H.

10 En algunas modalidades, R³ es halógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, -CN, -CHO, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, -O-alquilo de C₁-C₆ (es decir, alcoxi de C₁-C₆), perfluoroalquilo y CN; y R⁵ es H, halógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, -CN, -CHO,
15 o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de C₁-C₆, perfluoroalquilo y CN. En algunas de dichas modalidades, el fenilo de R³ es sustituido opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, CN, OCH₃ y CF₃.

 En algunas modalidades, R³ es halógeno, alquinilo de C₂-C₇ o -
20 CN. En algunas otras modalidades, R³ y R⁵ son cada uno independientemente halógeno, alquinilo de C₂-C₇ o -CN.

 En algunas modalidades, uno de R¹ y R² es halógeno. En algunas modalidades preferidas, uno de R¹ y R² es flúor. En algunas otras

modalidades, uno de R^1 y R^2 es halógeno, y el otro de R^1 y R^2 es H. En algunas otras modalidades, uno de R^1 y R^2 es flúor, y el otro de R^1 y R^2 es H. En algunas otras modalidades, R^1 y R^2 son cada uno independientemente halógeno. En algunas otras modalidades, R^1 y R^2 son cada uno flúor. En

5 algunas otras modalidades, R^1 y R^2 son cada uno H.

En algunas modalidades, R^4 es H, halógeno o $-\text{CN}$, de preferencia H.

En algunas modalidades, R^3 es halógeno, alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, alquinilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, $-\text{CN}$, $-\text{CHO}$, o fenilo sustituido

10 opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de $\text{C}_1\text{-C}_6$, perfluoroalquilo y CN ; R^5 es H, halógeno, alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, alquinilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, $-\text{CN}$, $-\text{CHO}$, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de $\text{C}_1\text{-C}_6$, perfluoroalquilo y CN ; y uno de R^1 y R^2 es halógeno; y R^4 es H, halógeno o $-\text{CN}$.

15 En algunas modalidades, de preferencia aquellas en donde A y A' son cada uno OH, R^1 , R^2 , R^4 , R^5 y R^6 son hidrógeno, y R^3 es halógeno, o R^3 es OH, o R^3 es alquenilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, o R^3 es CN , o R^3 es alquinilo de $\text{C}_2\text{-C}_7$, o R^3 es alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_6$, o R^3 es fenilo sustituido opcionalmente, de preferencia en donde los sustituyentes del fenilo son halógeno, alcoxi de $\text{C}_1\text{-C}_6$, perfluoroalquilo o CN .

20

En algunas modalidades de cada uno de los anteriores, n es 1.

En algunas modalidades, la invención provee composiciones que contienen uno o más compuestos de la invención, o sales, quelatos,

complejos o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Se entenderá que los compuestos de conformidad con la presente invención pueden estar presentes ya sea en sus formas de base libre, como se describe en las fórmulas expuestas en la presente, o como sales y/o hidratos de los mismos, y en particular como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Se conocen en la técnica sales farmacéuticamente aceptables, como lo son los hidratos, y el experto en la técnica encontrará convencional preparar dichas sales usando técnicas reconocidas en la materia. Pueden formarse sales farmacéuticamente aceptables de ácidos orgánicos e inorgánicos como por ejemplo, ácido acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metansulfónico, naftalensulfónico, bencensulfónico, toluensulfónico, alcanforsulfónico, y asimismo ácidos aceptables conocidos cuando un compuesto de esta invención contienen una porción básica. Pueden formarse también sales de bases orgánicas e inorgánicas, tales como sales de metal alcalino (por ejemplo, sodio, litio o potasio), sales de metal alcalinotérreo, sales de amonio, sales de alquilamonio con 1 a 6 átomos de carbono o sales de dialquilamonio con 1 a 6 átomos de carbono en cada grupo alquilo, y sales de trialquilamonio con 1 a 6 átomos de carbono en cada grupo alquilo, cuando un compuesto de esta invención contenga una porción ácida. Ejemplos de sales incluyen además sales ácidas de adición, por ejemplo, HCl, H₂SO₄, HBr, HI, HNO₃, H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₃PO₃, NaH₂PO₃, Na₂HPO₃, H₂SO₄,

NaHSO₄, ácidos carboxílicos, tales como ácido acético, ácido malónico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido dicloroacético, ácido trifluoroacético, etc., y otras sales farmacológicamente toleradas. Los hidratos incluyen hemihidratos, monohidratos, dihidratos, etc. A menos que se modifique de otra manera en la
5 presente, se pretende que el uso de una fórmula de base libre incluya la sal y/o hidrato de la misma.

La presente invención abarca también derivados de N-óxido de los compuestos descritos en la presente. Estos N-óxidos pueden prepararse por métodos conocidos para la preparación de compuestos análogos. Por
10 ejemplo, los compuestos pueden ser oxidados con un perácido, peróxido de hidrógeno, un peróxido de metal alcalino o un peróxido de alquilo. Un derivado de N-óxido útil, es una composición en donde el átomo de nitrógeno del anillo de quinolina forme el grupo N-óxido.

La presente invención abarca también derivados de profármaco.
15 El término "derivado de profármaco" o "profármaco", significa derivados de los presentes compuestos que son convertidos *in vivo* a la forma no derivatizada correspondiente de los presentes compuestos.

El término "alquilo", como se usa en la presente, ya sea que se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo
20 alifática e incluye, pero no está limitada a, cadenas rectas y ramificadas que contienen de 1 a 12 átomos de carbono, de preferencia de 1 a 6 átomos de carbono, a menos que se especifique explícitamente de otra manera. Por ejemplo, los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ter-butilo,

etc., son abarcados por el término "alquilo".

El número de átomos de carbono, como se usa en las definiciones de la presente, se refiere a la estructura de base de carbono y ramificación de carbonos de la porción, pero no incluye átomos de carbono de
5 los sustituyentes, tales como sustituciones alcoxi, y similares, de la porción.

El término "alquenilo", como se usa en la presente, ya sea que se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifática e incluye, pero no está limitado a, cadenas rectas y ramificadas que tienen de 2 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, de 2 a 7
10 átomos de carbono, y que contienen por lo menos un doble enlace. De preferencia, la porción alquenilo tiene uno o dos dobles enlaces. Por ejemplo, vinilo, alilo, 1-metil vinilo, etc. son abarcados por el término "alquenilo". Dichas porciones alquenilo pueden existir en las conformaciones E o Z, y los compuestos de esta invención incluyen ambas conformaciones.

15 El término "alquinilo", como se usa en la presente, ya sea que se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifática e incluye, pero no está limitada a, cadenas rectas y ramificadas que contienen de 2 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, de 2 a 7 átomos de carbono, y que contienen por lo menos un triple enlace. De preferencia, la
20 porción alquinilo tiene uno o dos triples enlaces. Por ejemplo, etinilo, propinilo, etc., son abarcados por el término "alquinilo".

El término "acilo" se refiere a grupos alquilcarbonilo, por ejemplo, en donde alquilo es como se define en la presente. El término "bencilo" tiene

su significado acostumbrado como un grupo fenilmetilo. El término "arilo" se refiere a una porción arilo unida a través de un grupo carbonilo, tal como un grupo benzoilo.

Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heteroarilo, aroilo, acilo y fenilo que se describen en la presente para las variables R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , A y A' pueden ser sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes, de preferencia, con hasta tres sustituyentes. Los sustituyentes se seleccionan independientemente, e incluyen nitro, ciano, halo, hidroxilo, carboxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi, alquilalcoxi, alcoxialcoxi, perfluoroalquilo, perfluoroalcoxi, arilalquilo, alquilarilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alquiltio, $S(O)_s$ -arilo (en donde $s = 0-2$), $S(O)_s$ -heteroarilo (en donde $s = 0-2$) o $-C(=O)-OR'$, en donde R' es como se describió previamente. En ciertas modalidades de la invención, sustituyentes preferidos incluyen halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, perfluoroalquilo, perfluoroalcoxi, arilalquilo, alquilarilo, NO_2 y fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente, como se describe en la presente.

Por ejemplo, cuando las porciones alquilo o alquenilo son sustituidas, pueden ser típicamente mono-, di-, tri- o per-sustituidas. Ejemplos para un sustituyente de halógeno, incluyen 1-bromo vinilo, 1-fluoro vinilo, 1,2-difluoro vinilo, 2,2-difluorovinilo, 1,2,2-trifluorovinilo, 1,2-dibromo etano, 1,2-fluoro etano, 1-fluoro-2-bromo etano, CF_2CF_3 , $CF_2CF_2CF_3$, y similares.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, etc. En algunas modalidades, los grupos cicloalquilo tienen de 3 a 10 átomos de carbono. De preferencia, los grupos cicloalquilo tienen de 3 a 7 átomos de carbono. Como se usa en la presente, cicloalquilo incluye además grupos cicloalquilo insaturados, es decir, grupos cicloalquenilo. Ejemplos de grupos cicloalquilo insaturados, incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, etc.

Los grupos arilo son porciones que poseen por lo menos un anillo aromático que no contiene heteroátomos de anillo (es decir, sin carbono). El término "arilo" incluye sistemas de anillo aromático mono- y policíclico, por ejemplo, de 6 a 15 átomos de carbono, por ejemplo, fenilo, naftilo, etc. Los grupos arilo pueden tener anillos completamente o parcialmente saturados fusionados al anillo aromático. De esta manera, ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, pirenilo, 5,6,7,8-tetrahidronaft-1-ilo, y similares.

Se pretende que el término heteroarilo signifique un sistema de anillo aromático que contenga por lo menos un átomo de anillo no de carbono (por ejemplo, de uno a tres heteroátomos) seleccionados de O, N y S, y que tenga, por ejemplo, de 5 a 14 átomos de anillo. Ejemplos de grupos heteroarilo, incluyen pirrolilo, imidazolilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, quinolilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, tiofenilo, furanilo, oxazolilo, tiazolilo, tienilo, piranilo, tiopiranilo, benzofuranilo, indolilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzopiranilo, benzotiopiranilo, indazolilo,

piridopirrolilo, y similares.

En algunas modalidades, el grupo R' de la porción $-C(=O)-OR'$ de A o A', es alquilo de C₁-C₈. En algunas modalidades, R' es alquilo de C₁₋₄. En algunas modalidades, la porción $-C(=O)-OR'$ es t-butoxicarbonilo (BOC).

5 Como se usa de conformidad con esta invención, el término "que provee", con respecto a que provee un compuesto o sustancia abarcado por esta invención, significa administrar directamente dicho compuesto o sustancia, o administrar un profármaco, derivado o análogo que forme la cantidad efectiva del compuesto o sustancia dentro del cuerpo.

10 Con base en los resultados obtenidos en el procedimiento de prueba farmacológico estándar, como se describe a continuación, los compuestos de la invención son moduladores del receptor de estrógeno útiles en el tratamiento o inhibición de condiciones, trastornos o estados de enfermedad que son por lo menos mediados parcialmente por una deficiencia
15 o exceso de estrógeno, que pueden tratarse o inhibirse a través del uso de un agente estrogénico. Los compuestos de esta invención son particularmente útiles en el tratamiento de un paciente perimenopáusico, menopáusico o post-menopáusico, en el cual los niveles de estrógenos endógenos producidos están ampliamente disminuidos. La menopausia se define en general como el
20 último período menstrual natural, y se caracteriza por el cese de la función ovárica, que lleva a la disminución sustancial de estrógeno circulante en la corriente sanguínea. Como se usa en la presente, la menopausia incluye también condiciones de producción disminuida de estrógeno que pueden ser

causadas quirúrgicamente, químicamente o por un estado de enfermedad que lleve a cese o disminución prematura de la función ovárica.

Por consiguiente, los compuestos de esta invención son útiles en el tratamiento o inhibición de osteoporosis y en la inhibición de desmineralización ósea, que puede resultar de un desequilibrio en la formación de nuevos tejidos óseos y la resorción de tejidos maduros en un individuo, llevando a una pérdida neta de hueso. Dicha depleción ósea resulta en una gama de individuos, en particular en mujeres post-menopáusicas, mujeres que han sufrido ooforectomía bilateral, aquellas que reciben o que han recibido terapias extendidas con corticosteroides, aquellas que experimentan disgenesia gonadal, y aquellas que sufren de síndrome de Cushing. Pueden consignarse también necesidades especiales para el reemplazo de hueso, incluyendo dientes y hueso oral, usando estos compuestos en individuos con fracturas óseas, estructuras óseas defectuosas, y aquellos que reciben cirugías relacionadas con el hueso y/o la implantación de prótesis. Además de los problemas descritos anteriormente, estos compuestos pueden usarse en el tratamiento o inhibición de osteoartritis, espondiloartropatías, hipocalcemia, hipercalcemia, enfermedad de Paget, osteomalacia, osteohalístéresis, mieloma múltiple, y otras formas de cáncer con efectos deletéreos sobre los tejidos óseos.

Los compuestos de esta invención son además útiles en el tratamiento o inhibición de daño a articulaciones secundario a procedimientos artroscópicos o quirúrgicos.

Los compuestos de esta invención son también útiles en el tratamiento o inhibición de crecimiento anormal de tejido benigno o maligno, que incluye hipertrofia prostática, leiomiomas uterinos, cáncer de mama, endometriosis, cáncer endometrial, síndrome de poliquistosis ovárica, pólipos
5 endometriales, enfermedad benigna de la mama, adenomiosis, cáncer ovárico, melanoma, cáncer de próstata, cánceres del colon y cánceres del sistema nervioso central, tales como glioma o astioblastoma.

Los compuestos de esta invención son cardioprotectores, y son útiles en la disminución de los niveles de colesterol, triglicéridos, lipoproteína
10 Lp(a) y lipoproteína de baja densidad (LDL); inhibición o tratamiento de hipercolesteremia; hiperlipidemia; enfermedad cardiovascular; aterosclerosis; enfermedad vascular periférica; restenosis y vasoespasmo; e inhibición del daño a la pared vascular por eventos celulares que llevan hacia daño vascular mediado por el sistema inmune. Estas propiedades cardiovasculares
15 protectoras son de gran importancia cuando se trata a pacientes postmenopáusicas con estrógenos para inhibir la osteoporosis, y en individuos de sexo masculino cuando se indica terapia con estrógeno.

Los compuestos de esta invención son también antioxidantes, y por lo tanto, son útiles en el tratamiento o inhibición de estados de
20 enfermedad inducidos por radicales libres. Situaciones específicas en las cuales se indica que se garantizará terapia con antioxidantes, son con cánceres, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer, enfermedad ósea, envejecimiento, trastornos inflamatorios, enfermedad

vascular periférica, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, sufrimiento respiratorio, enfisema, asma, pleuresía, uveítis, sepsis, choque hemorrágico, prevención de lesión por reperfusión, hepatitis viral, hepatitis activa crónica, tuberculosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de sufrimiento respiratorio del adulto, trauma del sistema nervioso central y apoplejía.

Los compuestos de esta invención son también útiles en la provisión de mejora de la cognición, y en el tratamiento o inhibición de demencia seniles, enfermedad de Alzheimer, declinación cognitiva y trastornos neurodegenerativos, proveyendo neuroprotección o mejora de la cognición.

Los compuestos de esta invención son también útiles en el tratamiento o inhibición de enfermedad inflamatoria del intestino, proctitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y colitis; condiciones relacionadas con la menopausia, tales como síntomas vasomotores, que incluyen bochornos, atrofia vaginal o vulvar, vaginitis atrófica, sequedad vaginal, prurito, dispareunia, disuria, urinación frecuente, incontinencia urinaria, infecciones del tracto urinario, mialgia, artralgia, insomnio, irritabilidad, y similares; calvicie de patrón masculino; atrofia de la piel; acné, diabetes tipo II; hemorragia uterina disfuncional; e infertilidad.

Los compuestos de esta invención son útiles en estados de enfermedad en donde la amenorrea sea ventajosa, tales como en leucemia, ablaciones endometriales, enfermedad hepática o renal crónica o estados o

trastornos de coagulación.

Los compuestos de esta invención pueden usarse como un agente contraceptivo, en particular, cuando se combinen con una progestina.

Cuando se administran para el tratamiento o inhibición de un

5 estado de enfermedad o trastorno particular, se entiende que la dosificación efectiva puede variar dependiendo del compuesto particular usado, el modo de administración, la condición que se esté tratando y la severidad de la misma, así como los varios factores físicos relacionados con el individuo que se esté tratando. La administración efectiva de los compuestos de esta

10 invención puede darse a una dosis oral de aproximadamente 0.1 mg/día a aproximadamente 1,000 mg/día. De preferencia, la administración será de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 600 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 50 mg/día a aproximadamente 600 mg/día, en una dosis individual o en dos o más dosis divididas. Se espera que

15 las dosificaciones diarias proyectadas varíen con la vía de administración.

Dichas dosis pueden administrarse en cualquier forma útil para dirigir los compuestos activos de la presente hacia la corriente sanguínea del receptor, incluyendo oralmente, por medio de implantes, parenteralmente (incluyendo inyecciones intravenosa, intraperitoneal y subcutánea),

20 rectalmente, intranasalmente, vaginalmente y transdérmicamente.

Las formulaciones orales que contienen a los compuestos activos de esta invención pueden comprender cualquier forma oral usada convencionalmente, incluyendo tabletas, cápsulas, formas bucales, trociscos,

pastillas y líquidos orales, suspensiones o soluciones. Las cápsulas pueden contener mezclas de los compuestos activos con llenadores y/o diluyentes inertes, tales como los almidones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, almidón de papa, maíz o tapioca), azúcares, agentes edulcorantes artificiales, 5 celulosas pulverizadas, tales como celulosas cristalina y microcristalina, harinas, gelatinas, gomas, etc. Pueden prepararse formulaciones de tableta útiles por métodos convencionales de compresión, granulación húmeda o granulación seca, y pueden usarse diluyentes farmacéuticamente aceptables, agentes aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, agentes modificadores de 10 superficie (incluyendo agentes tensioactivos), agentes de suspensión o estabilización que incluyen, pero no están limitados a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, lauril sulfato de sodio, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de calcio, polivinilpirrolidona, gelatina, ácido algínico, goma de acacia, goma de xantano, citrato de sodio, silicatos mixtos, 15 carbonato de calcio, glicina, dextrina, sacarosa, sorbitol, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, talco, almidones secos y azúcar pulverizada. Agentes modificadores de superficie preferidos incluyen agentes modificadores de superficie aniónicos y no iónicos. Ejemplos representativos de agentes modificadores de superficie incluyen, pero no 20 están limitados a, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetoestearílico, cera emulsificante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio-magnesio y trietanolamina. Las formulaciones orales de la presente

pueden usar formulaciones de liberación con el tiempo o de demora estándar, para alterar la absorción de los compuestos activos. La formulación oral puede consistir también de administrar el ingrediente activo en agua, o un jugo de frutas, que contenga solubilizadores o emulsificadores adecuados, según sea necesario.

En algunos casos, puede ser deseable administrar los compuestos directamente a las vías aéreas en la forma de un aerosol.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse también parenteralmente o intraperitonealmente. Pueden prepararse soluciones o suspensiones de estos compuestos activos como una base libre o sal farmacológicamente aceptable en agua mezclada adecuadamente con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Pueden prepararse también dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservador que previene el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable, incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida al grado de que exista fácil aplicación por jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo

puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

Para los propósitos de esta descripción, se entiende que las
5 administraciones transdérmicas incluyen todas las administraciones a través de la superficie del cuerpo y los revestimientos internos de pasajes corporales que incluyen tejidos epiteliales y de mucosas. Dichas administraciones pueden llevarse a cabo usando los presentes compuestos, N-óxidos de los mismos, profármacos de los mismos, o sales farmacéuticamente aceptables
10 de los mismos, en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectal y vaginal).

Puede lograrse la administración transdérmica a través del uso de un parche transdérmico que contenga al compuesto activo y un vehículo que sea inerte al compuesto activo, no sea tóxico para la piel, y permita el
15 suministro del agente para absorción sistémica en la corriente sanguínea por medio de la piel. El vehículo puede tomar cualquier número de formas tales como cremas y ungüentos, pastas, geles y dispositivos oclusivos. Las cremas y ungüentos pueden ser líquidos viscosos o emulsiones semisólidas del tipo de aceite en agua o agua en aceite. Pueden ser también adecuadas pastas
20 formadas de polvos absorbentes dispersos en petróleo o petróleo hidrofílico que contengan al ingrediente activo. Puede usarse una variedad de dispositivos oclusivos que liberen al ingrediente activo en la corriente sanguínea, tales como una membrana semipermeable que cubra un depósito que contenga al

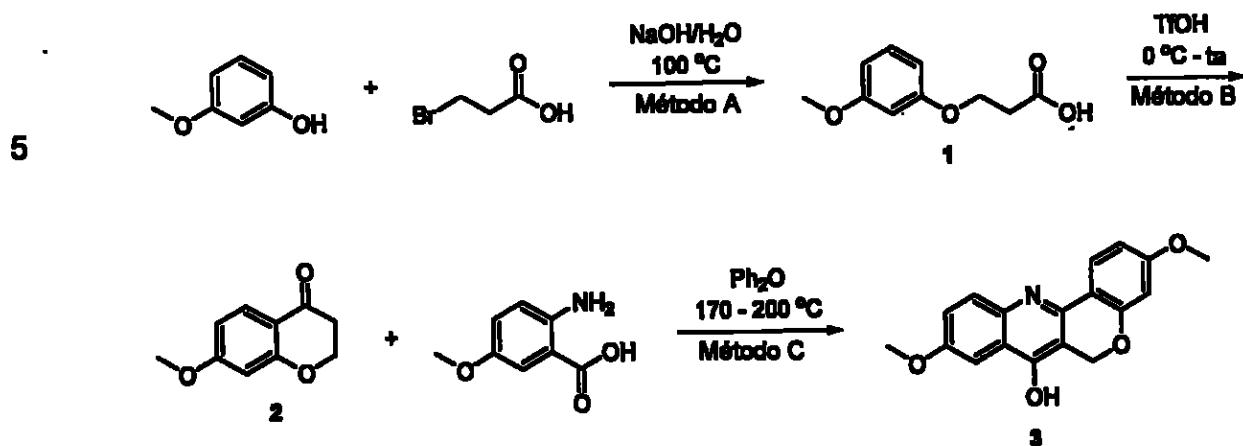
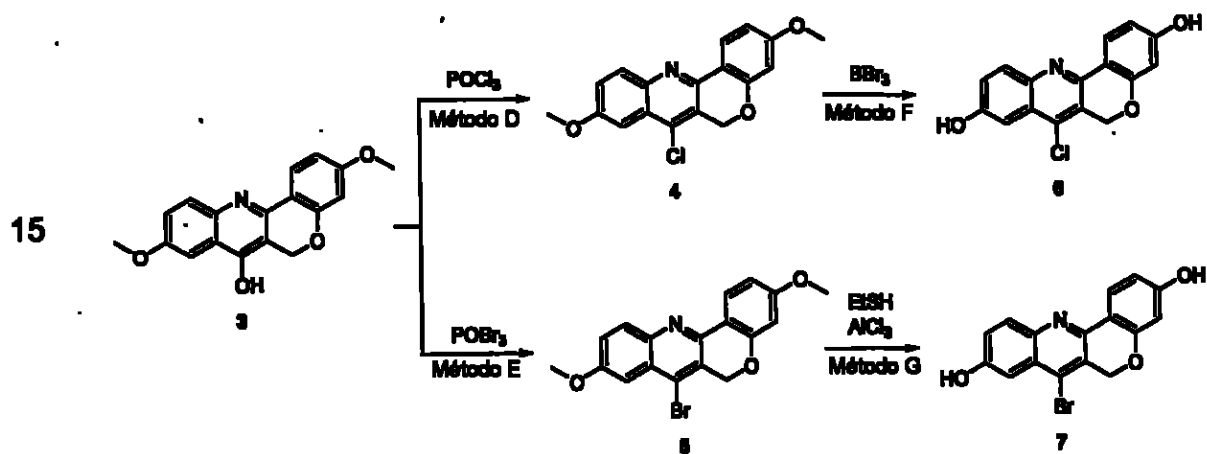
ingrediente activo con o sin un vehículo, o una matriz que contenga al ingrediente activo. Otros dispositivos oclusivos se conocen en la literatura.

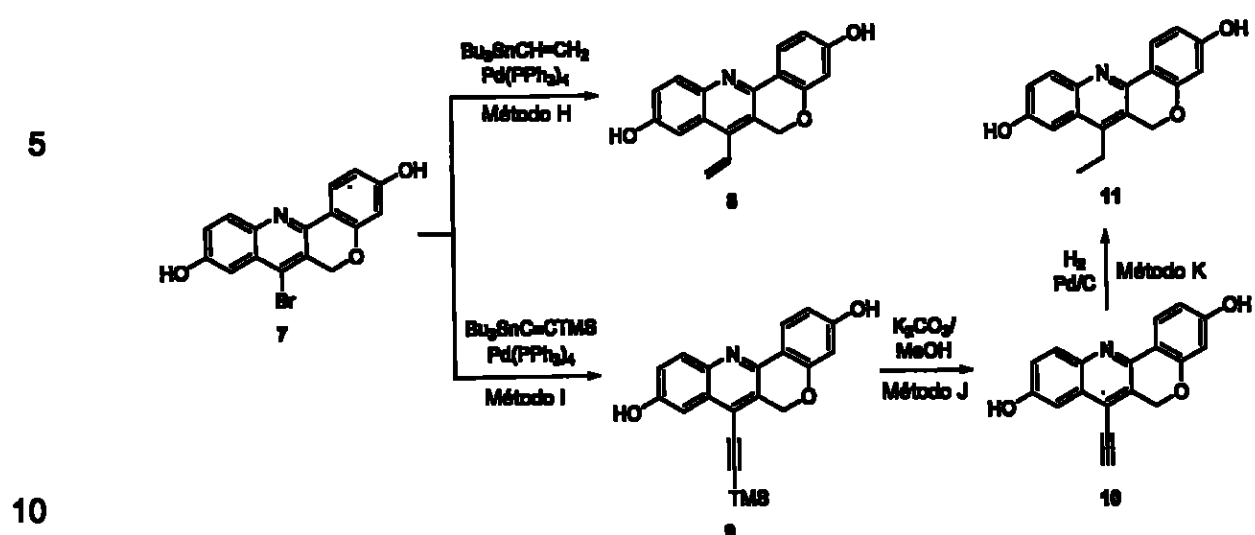
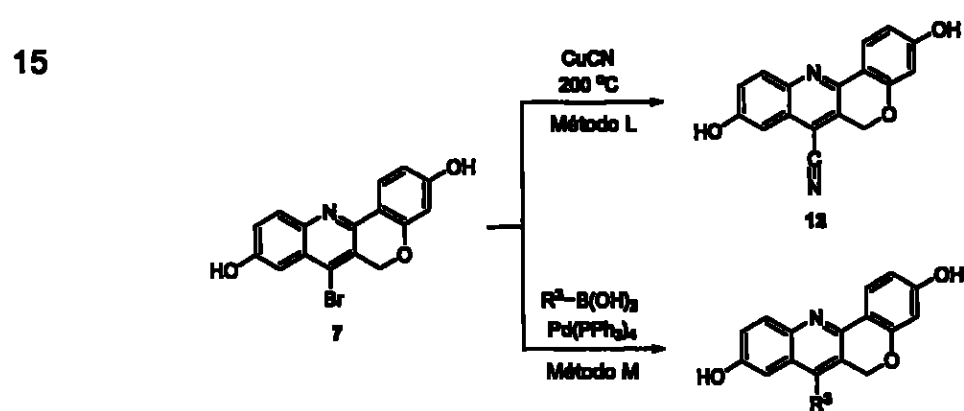
Pueden prepararse formulaciones de supositorio a partir de materiales tradicionales que incluyen manteca de cacao, con o sin la adición de ceras, para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. Pueden usarse también bases de supositorio solubles en agua, tales como polietilenglicoles de varios pesos moleculares.

Síntesis de los compuestos de la invención

10 Los compuestos de esta invención pueden prepararse por medio de métodos conocidos en la técnica de química orgánica. Los reactivos usados en la preparación de los compuestos de esta invención pueden obtenerse comercialmente, o pueden prepararse por procedimientos estándar descritos en la literatura.

15 Las síntesis de ejemplos representativos de esta invención, se describen en los esquemas 1 a 4 siguientes. Los métodos de síntesis A a M referidos en los esquemas 1 a 4, se describen en los ejemplos siguientes.

ESQUEMA 1**ESQUEMA 2**

ESQUEMA 3**ESQUEMA 4**

13, $\text{R}^3 = 4\text{-Cl-fenilo}$

14, $\text{R}^3 = 4\text{-CN-fenilo}$

15, $\text{R}^3 = 4\text{-MeO-fenilo}$

16, R³ = 4-CF₃-fenilo

17, R³ = 3-Cl-fenilo

18, R³ = 3-MeO-fenilo

19, R³ = 3-CN-fenilo

5

EJEMPLOS

Síntesis de compuestos representativos de la invención: Método general

10 Pueden usarse solventes Sure Seal™ de Aldrich, anhidros sin
más purificación para las reacciones descritas en la presente, y pueden
obtenerse de Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). Todas las
reacciones se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno. Se realizó
cromatografía usando gel de sílice de malla 230 a 400 (Merck, grado 60,
15 Aldrich Chemical Company). Se realizó cromatografía de capa delgada con
placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de EM Science (). Se obtuvieron espectros de
¹H y ¹⁹F RMN en un instrumento Bruker AM-400 o Bruker DPX-300 (Bruker,
Billerica, MA) en solventes deuterados tales como CDCl₃, DMSO-d₆ o
acetona-d₆. Los cambios químicos (δ) se dan en partes por millón (ppm)
20 campo abajo de tetrametilsilano (TMS). Se determinaron puntos de fusión en
un aparato Thomas-Hoover, y están no corregidos. Se registraron espectros
Infrarojos (IR) en una rejilla de difracción de Perkin-Elmer o
espectrofotómetros de Perkin-Elmer 784 (Perkin-Elmer, Shelton, CT). Se

registraron espectros de masa en un Kratos MS 50 o espectrómetros de masa Finnigan 8230. Se llegó en general a la nomenclatura de los compuestos por el uso del programa Beilstein Autonom™.

5

EJEMPLO 1

Acido 3-(3-metoxi-fenoxi)-propiónico (1)

Método A: A una mezcla de ácido 3-bromopropiónico (14.70 g, 10 118 mmoles) en agua (100 mL), se añadió lentamente NaHCO₃ (8.40 g, 100 mmoles), y la mezcla resultante se agitó por 5 minutos. A esta solución se añadió una solución de 70 mL de 3-metoxifenol (14.70 g, 96 mmoles) en NaOH acuoso (4.67 g, 119 mmoles), y la mezcla resultante se calentó a 100°C por 3 horas. Después de enfriamiento a temperatura ambiente, la 15 mezcla de reacción se acidificó con HCl a 1N y se extrajo con Et₂O. La capa de Et₂O se lavó con NaHCO₃ acuoso (3x). La capa acuosa se acidificó de nuevo con HCl a 1N y se extrajo con Et₂O. La capa de Et₂O se lavó con agua, salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró, para dar un sólido pardo crudo, el cual se recrystalizó (Et₂O/-20°C) para dar un producto puro como un 20 sólido amarillo. Rendimiento: 17.0 g (23%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2.85 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.24 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 6.50 (m, 3H), 7.18 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 11.45 (br, 1H);

MS (ESI) m/z 195 ([M-H]⁻); análisis calculado para C₁₀H₁₂O₄: C: 61.22, H: 6.16. Encontrado: C: 61.24, H: 6.12.

EJEMPLO 2

5

7-Metoxi-croman-4-ona (2)

Método B: A un recipiente de reacción que contenía ácido 3-(3-metoxi-fenoxi)-propiónico (1) (7.00 g, 35.6 mmoles) a 0°C, se añadió lentamente ácido trifluorometansulfónico (15 mL). La mezcla de reacción se agitó por 3 horas mientras se dejó que se calentara hasta temperatura ambiente. Después de enfriamiento a 0°C, la mezcla de reacción se extinguió con hielo picado y se extrajo entonces con Et₂O (2 x 300 mL). La capa orgánica se lavó con agua (2x), NaHCO₃ acuoso, agua, salmuera, se secó entonces (Na₂SO₄), se filtró y se concentró, para dar un aceite crudo, el cual se purificó por cromatografía de gel de sílice para dar producto puro como un sólido amarillo. Rendimiento: 4.26 g (67%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 2.76 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.52 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 6.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.8 Hz, 1H);

20

MS (ESI) m/z 179 ([M+H]⁺).

EJEMPLO 3

3,9-Dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolin-7-ol (3)

Método C: Una mezcla de ácido 2-amino-5-metoxibenzoico (1.839 g, 11.00 mmoles) y 7-metoxi-croman-4-ona (2) (1.960 g, 11.00 mmoles) en Ph₂O (10 mL), se calentó a 170°C por 1 hora y a 200°C por 7 horas.

- 5 Después de enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió hexano. El precipitado amarillo formado se recogió por filtración y se lavó exitosamente con hexano y Et₂O y se secó en vacío. Rendimiento: 2.171 g (64%). Punto de fusión de 298°C (descomposición);

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.82 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.17
10 (s, 2H), 6.64 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 9.0, 2.9 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 11.56 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 308 ([M-H]⁻), 310 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₈H₁₅NO₄ 310.1074 ([M+H]⁺), encontrado 310.1068.

15

EJEMPLO 4

7-Cloro-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (4)

Método C: Una mezcla de 3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-
20 b]quinolin-7-ol (3) (124 mg, 0.400 mmoles) y POCl₃ (1 mL), se calentó a reflujo por 1 hora. Después de enfriamiento, se removió el exceso de POCl₃ bajo presión reducida. Al residuo sólido se añadieron lentamente agua y entonces K₂CO₃ acuoso, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa

orgánica se lavó con salmuera, y se secó entonces (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para dar un sólido crudo, el cual se hizo pasar a través de una almohadilla corta de gel de sílice, y se recristalizó (heptano caliente/-20°C), para dar un producto puro como un polvo amarillo. Rendimiento: 124 mg
5 (95%); punto de fusión de 190-191°C;

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 6.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.71 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 8.9, 2.8$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H);

10 MS (ESI) m/z 328/330 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$ 328.0735 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), encontrado 328.0728; análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$: C: 65.96, H: 4.31, N: 4.27. Encontrado: C: 65.71, H: 4.17, N: 3.92.

15

EJEMPLO 5

7-Bromo-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (5)

Método E: Una mezcla de 3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolin-7-ol (3) (1.025 g, 3.31 mmoles) y POBr_3 (1.430 g, 5.00 mmoles, 1.5
20 equivalentes) en DMF (15 mL), se calentó a 70°C por 35 minutos. Después de enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron lentamente agua y entonces K_2CO_3 acuoso, y la mezcla de reacción se extrajo con CHCl_3 caliente (2x). La capa orgánica se lavó con agua (2x) y salmuera, se secó

entonces (Na_2SO_4), se filtró a través de una almohadilla corta de gel de sílice, y se concentró para dar un sólido amarillo crudo, el cual se recristalizó (EtOAc caliente/-20°C), para dar un producto puro como agujas amarillas. Rendimiento: 1.127 g (91%); punto de fusión de 196-197°C;

5 ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 5.48 (s, 2H), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H);

MS (ESI) m/z 372/374 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$) calculado para 10 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrNO}_3$ 372.0230 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), encontrado 372.0228; análisis calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrNO}_3$: C: 58.08, H: 3.79, N: 3.76. Encontrado: C: 57.94, H: 3.68, N: 3.73.

EJEMPLO 6

15 7-Cloro-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (6)

Método F: A una solución de 7-cloro-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (4) (68 mg, 0.21 mmoles) en 1,2-dicloroetano (3 mL), se añadió lentamente una solución de BBR_3 (1.0 M, 1 mL, 1 mmol) en CH_2Cl_2 . 20 La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos, y entonces a 40°C por 2 horas. Después de enfriamiento en un baño de hielo, se añadió muy lentamente con agitación vigorosa NaHCO_3 acuoso para extinguir la reacción, y la mezcla de reacción resultante se extrajo con EtOAc.

La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó entonces (Na_2SO_4), se filtró a través de una almohadilla corta de gel de sílice y se concentró para dar un sólido amarillo, el cual se recristalizó (THF/hexano). Rendimiento: 56 mg (90%); punto de fusión de 235°C (descomposición);

5 ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 5.47 (s, 2H), 6.40 (s, 1H), 6.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 10.10 (s, 1H), 10.35 (s, 1H);

HRMS (ESI^+) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ 300.0422 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), encontrado 300.0411.

10

EJEMPLO 7

7-Bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7)

Método G: A una solución de 7-bromo-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (5) (881 mg, 2.37 mmoles) en 1,2-dicloroetano (20 mL), se añadió lentamente AlCl_3 (3.16 g, 23.7 mmoles) y EtSH (2.7 mL, 36 mmoles), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. Después de enfriamiento en un baño de hielo, se añadió muy lentamente con agitación vigorosa NaHCO_3 acuoso para extinguir la reacción, y la mezcla de reacción resultante se extrajo con EtOAc. El precipitado formado se filtró a través de Celite®. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó entonces (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para dar un sólido amarillo crudo, el cual se purificó por cromatografía de gel de sílice, para dar un

producto puro como un sólido anaranjado. Rendimiento: 478 mg (59%); punto de fusión de 240°C (descomposición);

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.44 (s, 2H), 6.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.33 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H),
5 7.88 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 10.09 (s, 1H), 10.35 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 342/344 ([M-H]⁻), 344/346 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₈H₁₀BrNO₃ 343.9917 ([M+H]⁺), encontrado 343.9911.

EJEMPLO 8

10 3,9-Dihidroxi-7-vinil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (8)

Método H: Una mezcla de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) (34.5 mg, 0.100 mmoles), tributil(vinil)estaño (38 mg, 0.120 mmoles, 1.2 equivalentes) y Pd(PPh₃)₄ (11.6 mg, 0.0100 mmoles,
15 10% en moles) en tolueno (1.5 mL), se puso a reflujo bajo nitrógeno hasta que todo el material de partida se consumiera (1-2 hora(s)). La filtración a través de Celite® y la purificación por el paso a través de una almohadilla corta de gel de sílice, dieron un producto puro como un polvo anaranjado. Rendimiento: 24 mg (83%); punto de fusión de 160°C (descomposición);

20 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.36 (s, 2H), 5.47 (dd, J = 17.9, 1.4 Hz, 1H), 5.91 (dd, J = 11.6, 1.4 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 17.7, 11.6 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 8.5 Hz,

1H), 9.94 (s, 1H), 9.95 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 290 ([M-H]⁻), 292 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₈H₁₃NO₃ 292.0968 ([M+H]⁺), encontrado 292.0962.

5

EJEMPLO 9

3,9-Dihidroxi-7-[(trimetilsilil)etinoil]-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (9)

Método I: Una mezcla de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) (51.6 mg, 0.150 mmoles), (trimetilsililetil)tributylestafio (70 mg, 0.180 mmoles, 1.2 equivalentes) y Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 0.015 mmoles, 10% en moles) en tolueno (2 mL), se puso a reflujo bajo nitrógeno hasta que todo el material de partida se consumiera (1-2 hora(s)). La filtración a través de Celite® y la purificación por el paso a través de una almohadilla corta de gel de sílice, dieron un producto puro como un sólido rojo. Rendimiento: 54 mg (99.6%); punto de fusión de 160°C (descomposición);

¹H-RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ 0.43 (s, 9H), 5.53 (s, 2H), 6.52 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.16 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 360 ([M-H]⁻), 362 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₁H₁₉NO₃Si 362.1207 ([M+H]⁺), encontrado 362.1207.

20

EJEMPL 10**3,9-dihidroxi-7-etinil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (10)**

Método J: A una solución de 3,9-dihidroxi-7-[(trimetilsilil)etinil]-

5 6H-cromeno[4,3-b]quinolina (9) (54 mg, 0.15 mmoles) en MeOH (2 mL) se
añadió K₂CO₃ (104 mg, 0.75 mmoles, 5 equivalentes), y la mezcla de reacción
se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se
extinguó con NH₄Cl acuoso (5 mL). Se removió metanol (MeOH) bajo presión
reducida, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se
10 lavó con agua y salmuera, se secó entonces (Na₂SO₄), se filtró y se concentró
para dar un sólido amarillo crudo, el cual se purificó por paso a través de una
almohadilla corta de gel de sílice, para dar un producto puro como un polvo
color vino tinto. Rendimiento: 27 mg (63%); punto de fusión de 220°C
(descomposición);

15 ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.27 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 6.41
(d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz,
1H), 7.41 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H),
10.04 (s, 1H), 10.23 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 288 ([M-H]⁻), 290 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado
20 para C₁₈H₁₁NO₃ 290.0812 ([M+H]⁺), encontrado 290.0808.

EJEMPLO 11**3,9-dihidroxi-7-etil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (11)**

Método K: Una mezcla de 3,9-dihidroxi-7-etil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (10) (13 mg, 0.045 mmoles) y Pd/C (10% en peso) en EtOAc/THF (1.5 mL), se agitó bajo atmósfera de hidrógeno (1 atmósfera, globo) por 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite®, y se concentró para dar un sólido amarillo, el cual se recristalizó (EtOAc/hexano/-20°C). Rendimiento: 13 mg (98%). Punto de fusión de 145°C (descomposición);

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 2.95 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 6.38 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.82 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.93 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 292 ([M-H]⁻), 294 ([M+H]⁺); **HRMS (ESI⁺)** calculado para C₁₈H₁₅NO₃ 294.1125 ([M+H]⁺), encontrado 294.1123.

EJEMPLO 12**7-Clavo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (12)**

Método L: Una mezcla de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) (47 mg, 0.14 mmoles), CuCN (370 mg, 4.13 mmoles) en DMF anhidra (2 mL) se calentó a 200°C en un tubo sellado, hasta que todo el material de partida se consumiera (5 horas). Después de enfriamiento a

temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite® y se enjuagó con EtOAc. Se añadió agua al filtrado, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua (2x) y salmuera, se secó entonces (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar un sólido crudo, el cual se purificó por cromatografía de gel de sílice para dar un producto puro como un polvo pardo. Rendimiento: 9 mg (23%);

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.52 (s, 2H), 6.44 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 10.19 (s, 1H), 10.63 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 289 ([M-H]⁻), 291 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₁₇H₁₀N₂O₃ 291.0764 ([M+H]⁺), encontrado 291.0758.

EJEMPLO 13

7-(4-Clorofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (13)

Método M: Una mezcla de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) (40 mg, 0.12 mmoles) y Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 0.006 mmoles, 5% en moles) en DME (3 mL), se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla se añadieron secuencialmente ácido 4-clorofenilborónico (22 mg, 0.14 mmoles, 1.2 equivalentes) y Na₂CO₃ acuoso (solución a 2 M, 5 equivalentes), y la mezcla de reacción se puso a reflujo hasta que todo el material de partida se consumiera (2-3 horas). Después de

enfriamiento, se añadió NH_4Cl acuoso, y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó entonces (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para dar un sólido crudo, el cual se purificó por paso a través de una almohadilla corta de gel de sílice, para dar un
 5 producto puro como un polvo rojo. Rendimiento: 41 mg (94%); punto de fusión de 215-218°C (descomposición);

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.01 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 9.0
 10 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.98 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 374/376 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 376/378 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (ESI $^+$)
 calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{ClNO}_3$ 376.0735 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), encontrado 376.0728.

EJEMPLO 14

7-(4-Cianofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (14)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 4-cianofenilborónico, de acuerdo al método M. Polvo marfil; rendimiento: 96%; punto de fusión de 295°C
 20 (descomposición);

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.99 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 8.3

Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.99 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 365 ([M-H]⁻), 367 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₁₄N₂O₃ 367.1077 ([M+H]⁺), encontrado 367.1074.

5

EJEMPLO 15

3,9-Dihidroxi-7-(4-metoxifenil)-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (15)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 4-metoxifenilborónico, de acuerdo al método M. Polvo amarillo; rendimiento: 84%; punto de fusión de 195°C (descomposición);

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.87 (s, 3H), 5.03 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.98 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 370 ([M-H]⁻), 372 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₁₇NO₄ 372.1230 ([M+H]⁺), encontrado 372.1226.

20

EJEMPLO 16

3,9-Dihidroxi-7-[4-(trifluorometil)fenil]-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (16)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-

cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 4-trifluorometilfenilborónico, de acuerdo al método M. Polvo amarillo; rendimiento: 95%; punto de fusión de 175-177°C (descomposición);

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.00 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.84 (s, 1H), 10.00 (s, 1H);

¹⁹F-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ -61.43 (s); MS (ESI) m/z 408 ([M-H]⁻), 410 ([M+H]⁺; HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₁₄F₃NO₃ 410.0999 ([M+H]⁺), encontrado 410.0992.

EJEMPLO 17

7-(3-Clorofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (17)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 3-clorofenilborónico, de acuerdo al método M. Polvo anaranjado; rendimiento: 94%; punto de fusión de 162-165°C (descomposición);

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 5.01 (s, 2H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.50 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 3.9, 1.6, Hz, 2H), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 9.98 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 374/376 ($[M-H]^-$), 376/378 ($[M+H]^+$); HRMS (ESI⁺) calculado para $C_{22}H_{14}ClNO_3$ 376.0735 ($[M+H]^+$), encontrado 376.0721.

EJEMPLO 18

5 3,9-Dihidroxi-7-(3-metoxifenil)-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (18)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 3-metoxifenilborónico, de acuerdo al método M. Polvo amarillo; rendimiento: 87%; punto de fusión de 155-158°C (descomposición);

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.82 (s, 3H), 4.99 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.90 (m, 1H), 6.92 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.24 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 8.2, 7.9 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.96 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 370 ($[M-H]^-$), 372 ($[M+H]^+$); HRMS (ESI⁺) calculado para $C_{23}H_{17}NO_4$ 372.1230 ($[M+H]^+$), encontrado 372.1223.

EJEMPLO 19

20 7-(3-Cianofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (19)

Este compuesto se preparó a partir de 7-bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina (7) usando ácido 3-cianofenilborónico, de acuerdo al

método M. Polvo amarillo; rendimiento: 74%; punto de fusión de 275°C (descomposición);

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.98 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.74 (dt, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.05 (dt, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 9.87 (s, 1H), 10.00 (s, 1H);

MS (ESI) m/z 365 ([M-H]⁻), 367 ([M+H]⁺); HRMS (ESI⁺) calculado para C₂₃H₁₄N₂O₃ 367.1066 ([M+H]⁺), encontrado 367.1083.

Procedimientos de prueba farmacológicos

Demostración de la actividad estrogénica

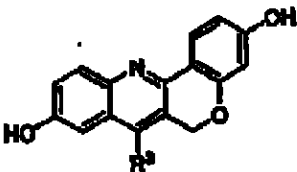
Se evaluaron ejemplos representativos de la invención, para su capacidad para competir con el 17β-estradiol por ERα y ERβ. El procedimiento de prueba usado permite determinar si un compuesto particular se une al receptor de estrógeno y es por lo tanto "estrogénico", y si existe selectividad por ERα o ERβ. Los resultados de ejemplos de compuestos representativos se muestran en el cuadro 1 siguiente, con los valores obtenidos reportados como IC₅₀S. La IC₅₀ se define como la concentración de compuesto que disminuye la unión total al 17β-estradiol por 50%. El procedimiento usado se describe brevemente. Se preparó un lisado crudo de

E. coli que expresa los dominios de unión al ligando del receptor de estrógeno (D, E y F) de ER α o ER β humano. Se diluyeron receptores y compuestos en 1X solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco (DPBS) complementada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 1 mM. Mediante
5 el uso de una placa de microtítulo enmascarada de alta unión, se combinaron 100 μ L de receptor (1 μ G/cavidad) con [^{3} H]-17 β -estradiol a 2 nM y varias concentraciones de compuesto. Después de entre 5 y 15 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron con DPBS/EDTA a 1 mM, y se determinó la radiactividad unida por conteo de escintilación de líquidos.

CUADRO 1

Afinidades de unión y selectividad por el receptor de compuestos representativos de la invención; reportadas como IC₅₀s

5



10

Compuesto	R ³	ERβ (nM)	ERα (nM)	α/β
5	Cl	3.3	88	27
7	Br	3.6	63	18
8	CH=CH ₂	31	548	18
9	C=C-TMS	225	169	0.8
10	C=CH	37	131	3
11	Et	5.0	66	13
12	CN	5.6	40	7
13	4-Cl-Ph	160	3090	19
14	4-CN-Ph	82	1420	17
15	4-MeO-Ph	61	357	6
16	4-CF ₃ -Ph	137	6090	44
17	3-Cl-Ph	130	505	4
18	3-MeO-Ph	86	820	10
19	3-CN-Ph	150	1130	8

15

20

Los resultados obtenidos en este procedimiento de prueba farmacológico, demuestran que los compuestos de esta invención son compuestos estrogénicos, muchos con fuerte afinidad preferencial por el receptor ERβ. Los compuestos de esta invención varían de los que tienen alta

afinidad preferencial por ER β sobre ER α , a afinidad casi igual por ambos receptores. De esta manera, los compuestos de esta invención abarcarán una gama de actividad basada, por lo menos en parte, en sus perfiles de selectividad para afinidad por el receptor. Además, puesto que cada complejo

5 novedoso de ligando-receptor es único y de esta manera su interacción con varias proteínas co-reguladoras es única, los compuestos de esta invención exhibirán diferente comportamiento modulador, dependiendo del contexto celular en el que estén. Por ejemplo, en algunos tipos de células, es posible que un compuesto se comporte como un agonista de estrógeno, mientras que

10 en otros tejidos, como un antagonista. Los compuestos con dicha actividad han sido referidos a veces como SERMs (moduladores selectivos del receptor de estrógeno). Sin embargo, a diferencia de muchos estrógenos, muchos de los SERMs no causan incrementos en el peso húmedo uterino. Estos compuestos son antiestrogénicos en el útero, y pueden antagonizar por

15 completo los efectos tróficos de los agonistas de estrógeno en el tejido uterino. Sin embargo, estos compuestos actúan como agonistas de estrógeno en los sistemas óseo, cardiovascular y nervioso central. Debido a la naturaleza selectiva de estos compuestos por el tejido, son útiles en el tratamiento o prevención en un mamífero, por ejemplo, un humano tal como

20 una mujer, de síndromes o estados de enfermedad que son causados o están asociados con una deficiencia de estrógeno (por ejemplo, en ciertos tejidos tales como el tejido óseo o cardiovascular), o un exceso de estrógeno (por ejemplo, en el útero o las glándulas mamarias).

Incluso más allá de dicha modulación específica de células, los compuestos de esta invención tienen también el potencial de comportarse como agonistas sobre un tipo de receptor, mientras que se comportan como antagonistas sobre el otro. Por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos pueden ser un antagonista sobre ER β , mientras que son un agonista sobre ER α (véase Meyers, Marvin, J. *et al.*, *J. Med. Chem.* 42(13): 2456-2468 (1999)). Dicha actividad ERSAA (antagonista-agonista selectivo del receptor de estrógeno) provee actividad estrogénica farmacológicamente distinta dentro de esta serie de compuestos.

10 Otros procedimientos de prueba farmacológicos están fácilmente disponibles para determinar el perfil de actividad de un compuesto representativo de la invención. Lo siguiente resume brevemente varios procedimientos de prueba representativos. Procedimientos de prueba farmacológicos para SERMs se proveen también en las patentes de E.U.A. 15 Nos. 4,418,068 y 5,998,402, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

Procedimiento de prueba uterotrófica/antiuterotrófica en ratas

20 Las propiedades estrogénicas y antiestrogénicas de los compuestos pueden determinarse en una prueba uterotrófica en ratas inmaduras (4 días) (véase L. J. Black y R. L. Goode, *Life Sciences* 26: 1453 (1980)). Se pusieron a prueba ratas Sprague-Dawley inmaduras (hembras, de 18 días) en grupos de seis. Los animales se trataron por inyección

intraperitoneal (ip) diaria con 10 µg de compuesto, 100 µg de compuesto, 100 µg de compuesto + 1 µg de 17β-estradiol (para verificar la antiestrogenicidad) y 1 µg de 17β-estradiol, con DMSO a 50%/solución salina a 50% como el vehículo de inyección. En el día 4, se sacrificó a los animales por asfixia con CO₂, y sus úteros se removieron y se privaron del exceso de lípidos, se removi6 todo fluido, y se determin6 el peso húmedo. Una pequeña sección de un asta se sometió a histología, y el resto se us6 para aislar ARN total para evaluar la expresión génica del componente 3 del complemento.

10 Procedimiento de prueba en ratas ovariectomizadas de seis (6) semanas – protección ósea y cardioprotección

Se obtienen ratas Sprague-Dawley CD hembras, ovx o sham ovx, 1 día después de la cirugía de Taconic (Greenwood, NY) (escala de peso de 240-275 g). Se aloja a 3 ó 4 ratas/jaula en un sitio bajo un plan de 12/12 horas de luz/oscuridad, y se proveen con alimento (alimento para ratas Purina Mills® 5K96C) y agua a voluntad. El tratamiento para todos los estudios comienza 1 día después de la llegada de los animales, y se dosifica 7 días por semana como se indica para 6 semanas. Un grupo de ratas pseudooperadas de igual edad que no recibieron tratamiento alguno, sirve como un grupo control intacto repleto de estr6geno para cada estudio.

Todos los tratamientos se preparan en Tween 80 a 1% en solución salina normal a concentraciones definidas, de modo que el volumen de tratamiento sea de 0.1 mL/100 g de peso corporal. Se disuelve 17β-

estradiol en aceite de maíz (20 µg/mL) y se suministra subcutáneamente, 0.1 mL/rata. Todas las dosificaciones se ajustan a intervalos de tres semanas de acuerdo a mediciones de peso corporal de la media de grupo.

Cinco semanas después del inicio del tratamiento, y una semana
5 antes de la terminación del estudio, cada rata se evalúa para densidad mineral ósea (BMD). La densidad trabecular y total de la tibia proximal se evalúa en ratas anestesiadas usando un XCT-960M (pQCT (); Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Alemania). Las mediciones se realizan de la manera siguiente: quince minutos antes de la exploración, se anestesia a cada rata con una
10 inyección intraperitoneal de 45 mg/kg de cetamina, 8.5 mg/kg de xilazina y 1.5 mg/kg de acepromazina.

La pata trasera derecha se hace pasar a través de un tubo de policarbonato con un diámetro de 25 mm, y se ata con cinta a un armazón de acrílico con la articulación del tobillo a un ángulo de 90° y la articulación de la
15 rodilla a 180°. El tubo de policarbonato se fija a una plataforma de deslizamiento que lo mantiene perpendicular a la abertura del pQCT. La plataforma se ajusta de modo que el extremo distal del fémur y el extremo proximal de la tibia estén el campo de exploración. Se realiza una vista de reconocimiento bidimensional para una longitud de 10 mm y una resolución de
20 línea de 0.2 mm. Después de que la vista de reconocimiento se muestra en el monitor, se localiza el extremo proximal de la tibia. La exploración del pQCT se inicia 3.4 mm distal de este punto. La exploración del pQCT es de 1 mm de espesor, tiene un tamaño de voxel (pixel tridimensional) de 0.140 mm, y

consiste de 145 proyecciones a través del corte.

Después de que la exploración del pQCT concluye, la imagen se muestra en el monitor. Se esboza una región de interés que incluye la tibia, pero que excluye la fibula. El tejido blando se remueve automáticamente usando un algoritmo iterativo. La densidad del hueso restante (densidad total) se reporta en mg/cm^3 . El 55% exterior del hueso se desprende en una espiral concéntrica. La densidad del hueso restante (densidad trabecular) se reporta en mg/cm^3 . Una semana después de la evaluación de la BMD, se somete a eutanasia a las ratas por sofocación con dióxido de carbono, y se colecta sangre para la determinación de colesterol. Se remueven los úteros y se toman los pesos. Se determina el colesterol total usando un analizador clínico Hitachi 911 de Boehringer-Mannheim usando el equipo de colesterol/HP. Se compararon las estadísticas usando análisis de variancia unidireccional (ANOVA) con prueba de Dunnet.

15

Procedimiento de prueba antiproliferativo en células MCF-7/ERE

Se preparan soluciones de existencia de compuestos de prueba (usualmente a 0.1 M) en DMSO, y se diluyen entonces 10 a 100 veces con DMSO, para obtener soluciones de trabajo de 1 ó 10 mM. Las existencias de DMSO se almacenan a 4°C (0.1 M) o -20°C (< 0.1M). Se hacen pasar células MCF-7 dos veces por semana con medio de crecimiento [medio de D-MEM/F-12 conteniendo suero de bovino fetal a 10% (v/v) inactivado con calor, estreptomycin-penicilina a 1% (v/v) y glutaMax-1 a 2 mM]. Las células se

20

mantienen en matraces ventilados a 37°C dentro de una incubadora con aire humidificado a 95%/CO₂ a 5%. Un día antes del tratamiento, las células se siembran con medio de crecimiento a 25,000/cavidad en placas de 96 cavidades, y se incuban a 37°C durante la noche.

- 5 Se infecta a las células por 2 horas a 37°C con 50 µl/cavidad de una dilución 1:10 de adenovirus 5-ERE-tk-luciferasa en medio experimental [medio de D-MEM/F-12 libre de rojo de fenol conteniendo suero de bovino fetal a 10% (v/v) privado de carbón e inactivado con calor, estreptomicina-penicilina a 1% (v/v), glutaMax-1 a 2 mM, piruvato de sodio a 1 mM]. Las
- 10 cavidades se lavan entonces una vez con 150 µl de medio experimental. Por último, las células se tratan por 24 horas a 37°C en réplicas de 8 cavidades/tratamiento con 150 µl/cavidad de vehículo (DMSO ≤ 0.1% v/v) o compuesto que es diluido ≥ 1000 veces en medio experimental.

- La selección inicial de compuestos de prueba se realiza a una
- 15 dosis individual de 1 µM que se pone a prueba sola (modo agonista) o en combinación con 17β-estradiol a 0.1 nM (EC₈₀; modo antagonista). Cada placa de 96 cavidades incluye también un grupo control de vehículo (DMSO a 0.1% v/v) y un grupo control de agonista (17β-estradiol a 0.1 o 1 nM). Se realizan experimentos de respuesta a la dosis en los modos agonista y/o antagonista,
- 20 en compuestos activos en incrementos logarítmicos de 10⁻¹⁴ a 10⁻⁵ M. A partir de estas curvas de respuesta a la dosis, se generan valores de EC₅₀ e IC₅₀, respectivamente. La cavidad final en cada grupo de tratamiento contiene 5 µl de 3 x 10⁻⁵ M ICI-182,780 (concentración final de 10⁻⁶ M) como un control de

antagonista de ER.

Después del tratamiento, se lisa a las células en un agitador por 15 minutos con 25 μ l/cavidad de 1X reactivo de lisis de cultivo de células (Promega Corporation). Los lisados de células (20 μ l) se transfieren a una
5 placa de luminómetro de 96 cavidades, y se mide la actividad de luciferasa en un luminómetro MicroLumat LB 96 P (EG & G Berthold) usando 100 μ l/cavidad de sustrato de luciferasa (Promega Corporation). Antes de la inyección del sustrato, se hace una medición de fondo por 1 segundo para cada cavidad. Después de la inyección del sustrato, se mide la actividad de luciferasa por
10 10 segundos después de una demora de 1 segundo. Los datos se transfieren del luminómetro a una computadora personal Macintosh, y se analizan usando el software JMP (SAS Institute); este programa resta la lectura de fondo de la medición de luciferasa para cada cavidad, y determina entonces la media y desviación estándar de cada tratamiento.

15 Los datos de la luciferasa se transforman por medio de logaritmos, y se usa el estimador M de Huber para restar el peso de las observaciones transformadas externas. Se usa el software JMP para analizar los datos transformados y ponderados para ANOVA unidireccional (prueba de Dunnett). Los tratamientos con los compuestos se comparan con los
20 resultados del control de vehículo en el modo agonista, o los resultados del control de agonista positivo (17 β -estradiol a 0.1 nM) en el modo antagonista. Para el experimento de dosis individual inicial, si los resultados del tratamiento con el compuesto son significativamente diferentes del control apropiado

($p < 0.05$), entonces los resultados se reportan como el por ciento respecto al control de 17- β estradiol [es decir, $((\text{compuesto} - \text{control de vehículo}) / (\text{control de 17}\beta\text{-estradiol} - \text{control de vehículo})) \times 100$]. El software JMP se usa también para determinar los valores de EC_{50} y/o IC_{50} a partir de las curvas de

5 respuesta a la dosis no lineal.

Inhibición de oxidación de LDL – actividad antioxidante

Se obtienen aortas de porcino de un matadero de reses, se lavan, se transportan en solución salina regulada en su pH con fosfato (PBS)

10 enfriada, y se cosechan células endoteliales aórticas. Para cosechar las células, los vasos intercostales de la aorta se atan, y se sujeta un extremo de la aorta. Se pone colagenasa a 0.2% fresca, filtrada estéril (Sigma, tipo I) en el recipiente, y el otro extremo del vaso se sujeta entonces para formar un sistema cerrado. La aorta se incuba a 37°C por 15 a 20 minutos, después de

15 lo cual la solución de colagenasa se colecta y se centrifuga por 5 minutos a 2000 x g. Cada pella se suspende en 7 mL de medio de cultivo de células endoteliales que consiste de DMEM libre de rojo de fenol/medio F12 de Ham complementado con suero de bovino fetal (FBS; 5%) privado de carbón, NuSerum® (5%), L-glutamina (4 mM), penicilina-estreptomicina (1000 U/ml,

20 100 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (75 $\mu\text{g/ml}$), se siembra en una caja de Petri de 100 mm, y se incuba a 37°C en CO_2 a 5%. Después de 20 minutos, las células se enjuagan con PBS, y se añade medio fresco, y de nuevo, a 24 horas. Las células son confluentes después de aproximadamente 1 semana. Las células

endoteliales se alimentan habitualmente dos veces por semana y, cuando son confluentes, se tripsinizan y se siembran a una relación de 1:7. Se deja que proceda la oxidación mediada por células de 12.5 µg/mL de LDL en presencia del compuesto que se va a evaluar (5 µM) por 4 horas a 37°C. Los resultados se expresan como el por ciento de inhibición del proceso oxidativo medido por el método de TBARS (sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico) para análisis de aldehídos libres (Yagi K., *Biochem Med* 15: 212-216 (1976)).

Procedimiento de prueba de células hipotalámicas D12

- 10 Se subclonan células hipotalámicas D12 de rata de la línea de células precursora RCF17, y se almacenan congeladas. Se desarrollan habitualmente en DMEM: F12 (1:1), glutaMAX-1 (2 mM), penicilina (100 U/ml)-estreptomicina (100 mg/ml), más FBS a 10%. Las células se siembran en medio libre de rojo de fenol (DMEM: F12, glutaMAX, penicilina-estreptomicina)
- 15 conteniendo FBS a 2-10% privado de carbón a una densidad de confluencia ($1-4 \times 10^6$ células/placa de 150 mm). Las células se vuelven a alimentar 24 horas después con medio que contiene suero a 2% privado. Para poner a prueba la actividad agonista, las células se tratan con 17β-estradiol a 10 nM o varias dosis de compuesto de prueba (1 mM o una escala de 1 pM a 1 mM).
- 20 Para poner a prueba la actividad antagonista, las células se tratan con 17β-estradiol a 0.1 nM en ausencia o presencia de dosis variables (100 pM a 1 mM) de compuesto de prueba. Se tratan también placas control con DMSO como un control negativo. Cuarenta y ocho horas después de la adición de

hormonas se lisa a las células, y se realiza un procedimiento de prueba de unión.

Para cada procedimiento de prueba de unión, se incuban de 100 a 150 mg de proteína con ^3H -R5020 a 10 nM + 100 veces exceso de R5020 en un volumen de 150 mL. Se preparan reacciones por triplicado (tres con R5020, tres sin R5020) en una placa de 96 cavidades. El extracto de proteína se añade primero, seguido de ^3H -R5020 o ^3H -R5020 + 100x R5020 no marcado. La reacción se lleva a cabo por 1 a 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe por la adición de 100 mL de carbón a 5% frío (Norit SX-4), dextrán 69K a 0.5% (Pharmacia) en TE, pH 7.4. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, el ligando unido y no unido se separa por centrifugación (5 minutos, 1000 RCF, 4°C). La solución de sobrenadante (~150 ml) se remueve, y se transfiere a un vial de escintilación. Después de la adición de fluido de escintilación (Beckman Ready Protein+), se hace el conteo de las muestras por 1 minuto en un contador de escintilación.

Receptor de progesterona en el área preóptica del SNC

Se realiza ovariectomía de ratas Sprague-Dawley hembras de sesenta (60) días. Se aloja a los animales en una instalación de cuidados animales con un fotoperíodo de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad, y libre acceso a agua de la llave y alimento para roedores.

Se divide aleatoriamente a los animales ovariectomizados en grupos que son inyectados con vehículo (DMSO a 50%, PBS a 40%, vehículo

de etanol a 10%), 17 β -estradiol (200 ng/kg) o el compuesto que se va a poner a prueba. Se inyecta a más animales con el compuesto de prueba 1 hora antes de la inyección de 17 β -estradiol, para evaluar las propiedades antagonistas de este compuesto. Seis horas después de la inyección subcutánea (sc), se somete a los animales a eutanasia con una dosis letal de CO₂, y sus cerebros se colectan y se congelan.

El tejido colectado de los animales se corta en un crióstato a -16°C, y se colecta sobre portaobjetos de microscopio revestidos de silano. Los portaobjetos montados con las secciones se secan entonces en un calentador corredizo mantenido a 42°C, y se almacenan en cajas corredizas desecadas a -80°C. Antes del procesamiento, las cajas corredizas desecadas se calientan lentamente a temperatura ambiente (-20°C por 12 a 16 horas; 4°C por 2 horas; temperatura ambiente por 1 hora), para eliminar la formación de condensación sobre los portaobjetos, y de esta manera reducir al mínimo la degradación del ARN y del tejido. Los portaobjetos secos se cargan en rejillas de metal, son post-fijados en paraformaldehído a 4% (pH 9.0) por 5 minutos, y se procesan como se describió previamente.

Un plásmido que contienen un fragmento de 815 pb del ADNc 9 de PR de rata (dominio de unión al ligando) es linealizado, y se usa para generar una sonda marcada con S 35-UTP que es complementaria a una porción del ARN de PR de rata. Se hibridan portaobjetos montados con secciones procesadas con 200 mL de mezcla de hibridación que contiene a la ribosonda (4-6x10⁶ DPM/portaobjeto) y formamida a 50%, y se incuban

durante la noche en una cámara humidificada a 55°C. En la mañana, los portaobjetos se ponen en rejillas de metal que se sumergen en 2xSSC (NaCl a 0.15 M, citrato de sodio a 0.015 M; pH 7.0)/DTT a 10 mM. Todas las rejillas se transfieren a un gran contenedor, y se lavan en 2xSSC/DTT a 10 mM por 5 15 minutos, a temperatura ambiente con agitación suave. Los portaobjetos se lavan entonces en regulador de pH de ribonucleasa a 37°C por 30 minutos, se tratan con ribonucleasa A (2 mg/ml) por 30 minutos a 37°C, y se lavan por 15 minutos en 1xSSC a temperatura ambiente. Después, los portaobjetos se lavan (2 x 30 minutos) a 65°C en 0.1xSSC para remover la marca no 10 específica, se enjuagan en 0.1xSSC a temperatura ambiente por 15 minutos, y se deshidratan con una serie graduada de alcohol: acetato de amonio (70%, 95% y 100%). Los portaobjetos secados al aire son contrapuestos ante película de rayos X por 3 días, y entonces se procesan fotográficamente. Los portaobjetos de todos los animales se hibridan, se lavan, se exponen y se 15 procesan fotográficamente, para eliminar diferencias debidas a variación en las condiciones entre las pruebas.

Bochornos en ratas - efectos sobre el SNC

Se obtienen ratas Sprague-Dawley hembras ovariectomizadas 20 de 60 días después de cirugía. Las cirugías se realizan un mínimo de 8 días antes del primer tratamiento. Se aloja individualmente a los animales bajo un ciclo de 12/12 horas de luz/oscuridad, y se les da alimento estándar para ratas y agua a voluntad.

Se incluyen dos grupos control en cada estudio. Se preparan dosis basadas en mg/kg de peso corporal medio del grupo en DMSO a 10% en aceite de ajonjolí (estudios subcutáneos) o en Tween 80 a 1.0% en estudios con solución salina ((po)). Se administra a los animales compuestos de prueba a dosis que varían de 0.01 a 10 mg/kg de peso corporal medio del grupo. Se incluyen en cada prueba grupos control de vehículo y de etinil estradiol (EE) (0.1 mg/kg, sc o 0.3 mg/kg, po). Cuando los compuestos se ponen a prueba para su actividad antagonista, se coadministra EE a 0.1 ó 0.3 mg/kg para estudios sc o po, respectivamente. Los compuestos de prueba se administran hasta el día en que se mide la temperatura de la piel de la cola.

Después del período de aclimatación de cuatro días, los animales se tratan una vez diariamente con los compuestos de interés. Existen 10 animales/grupo de tratamiento. La administración del compuesto es por inyección subcutánea de 0.1 ml en la nuca del cuello o por la boca en un volumen de 0.5 ml. En el tercer día de tratamiento, se implanta subcutáneamente una pella de morfina (75 mg de sulfato de morfina). En el quinto día de tratamiento, se implantan una o dos pellas de morfina adicionales. En el octavo día, se inyecta a aproximadamente la mitad de los animales con cetamina (80 mg/kg, intramuscularmente), y un termopar, conectado a un sistema de adquisición de datos MacLab (API Instruments, Milford, MA), se ata con cinta en la cola aproximadamente 2.54 cm de la raíz de la cola. Este sistema permitió la medición continua de la temperatura de la piel de la cola. Se mide la temperatura a la línea de referencia por 15 minutos,

entonces se administra subcutáneamente naloxona (1.0 mg/kg) (0.2 mL) para bloquear el efecto de la morfina, y se mide después la temperatura de la piel de la cola por una hora. En el noveno día, se establece a los animales restantes y se analizan en forma similar.

5

Función vasomotora en anillos aórticos aislados de rata

Se divide a ratas Sprague-Dawley (240-260 g) en 4 grupos:

1. Normales, no ovariectomizadas (intactas)
2. Ovariectomizadas (ovex), tratas con vehículo
- 10 3. Ovariectomizadas, tratadas con 17- β estradiol (1 mg/kg/día)
4. Animales ovariectomizados, tratados con compuesto de prueba (es decir, 1 mg/kg/día).

Se realiza ovariectomía de los animales aproximadamente tres semanas antes del tratamiento. Cada animal recibe 1 mg/kg/día de sulfato de 15 17 β -estradiol o compuesto de prueba suspendido en agua desionizada destilada con Tween-80 a 1% por gavaje gástrico. Los animales tratados con vehículo reciben un volumen aproximado del vehículo usado en los grupos tratados con fármaco.

Se somete a eutanasia a los animales por inhalación de CO₂ y 20 exsanguinación. Sus aortas torácicas se remueven rápidamente, y se ponen en solución fisiológica a 37°C con la siguiente composición (mM): NaCl (54.7), KCl (5.0), NaHCO₃ (25.0), MgCl₂·2H₂O (2.5), D-glucosa (11.8) y CaCl₂ (0.2) gasificado con CO₂-O₂, 95%/5% para un pH final de 7.4. Se remueve la

adventicia de la superficie exterior, y se corta el vaso en anillos de 2 a 3 mm de ancho. Los anillos se suspenden en 10 ml de baño para tejidos con un extremo unido al fondo del baño, y el otro a un transductor de fuerza. Se aplica una tensión de reposo de 1 g sobre los anillos. Los anillos se equilibran por 1 hora, mientras se adquieren y se analizan señales.

Después del equilibrio, los anillos se exponen a concentraciones crecientes de fenilefrina (10^{-8} a 10^{-4} M), y se registra la tensión. Los baños se enjuagan entonces 3 veces con regulador de pH fresco. Después de un descanso, se añade L-NAME a 200 mM al baño para tejidos, y se equilibra por 30 minutos. Se repite entonces la curva de respuesta a la concentración de fenilefrina.

Laberinto radial de ocho brazos - mejora de la cognición

Se usan ratas Sprague-Dawley CD machos (Charles River, Kingston, NY) que pesan 200 a 250 g a la llegada. Por una semana, se aloja a las ratas, seis por jaula, con alimento estándar de laboratorio y agua disponible a voluntad. El alojamiento es en un sitio para las colonias mantenido a 22°C con un ciclo de 12/12 horas de luz/oscuridad con luces encendidas a las seis de la mañana. Después de la habituación a la instalación se aloja individualmente a los animales, y se mantienen a 85% de peso por medio de alimentación libre. Una vez que se alcanzan pesos estables, las ratas se aclimatan al laberinto radial de ocho brazos.

La estructura del laberinto es una adaptación de Peele y Baron

(*Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 29: 143-150 (1988)). El laberinto es elevado a una altura de 75.5 cm, y está formado de un área circular rodeada de 8 brazos que radian desde el centro, equidistantes de algún otro. Cada brazo tiene 58 cm de longitud x 13 cm de altura. Un cilindro de plexiglás claro es abatido para encerrar al animal en la porción central del laberinto antes del inicio de cada sesión. Cada brazo del laberinto está equipado con 3 series de fotoceldas interconectadas a una unidad de adquisición de datos, la cual a su vez está interconectada a una computadora. Las fotoceldas se usan para seguir el movimiento de la rata en el laberinto. Alimentadores de pellas localizados arriba de copas de alimento en el extremo de cada brazo, dispensan dos pellas de chocolate de 45 mg cuando la fotocelda exterior del brazo es activada por primera vez en una sesión determinada. El laberinto se localiza en un sitio de prueba con carteles geométricos negros y blancos en cada pared para servir como señales visuales. Durante todos los procedimientos de prueba y adiestramiento, se escucha ruido blanco (~ 70 db).

El procedimiento de entrenamiento consiste de cinco fases, cada una con sesiones diarias que duran 5 ó 10 minutos. Se impone una demora de 10 segundos entre el tiempo en que la rata es puesta en la porción central del laberinto, y cuando el cilindro es elevado para empezar la sesión. Durante la fase 1, se ponen pares de ratas con alimento restringido en el laberinto por 10 minutos con pellas alimenticias de chocolate de 45 mg dispersas por los 8 brazos del laberinto. Durante la fase II, cada rata se pone individualmente en

el laberinto por un período de 10 minutos, con pellas dispersas de la fotocelda media a la copa de alimento de cada brazo. Durante la fase III, cada rata se pone en el laberinto por un período de 10 minutos, con pellas alimenticias localizadas sólo en las copas de alimento en cada brazo, y alrededor de las mismas. En la fase IV, cada rata se deja por 10 minutos para que colecte dos pellas de cada brazo. La reentrada en un brazo se considera como un error. Las ratas se entrenan diariamente de esta forma, hasta que logran el criterio de desempeño con menos que o igual a 2 errores en total en 3 días de entrenamiento consecutivos. El tiempo total de habituación y entrenamiento es de aproximadamente 3 semanas.

Se prepara compuesto de prueba en solución salina regulada en su pH con fosfato, y se administra en un volumen de 1 ml/kg. El bromhidrato de escopolamina (0.3 mg/kg sc) sirvió como el agente de deterioro, produciendo un incremento en la frecuencia de errores (pérdida de memoria). Se administra intraperitonealmente el compuesto de prueba, simultáneamente con escopolamina, 30 minutos antes de la primera exposición al laberinto en cualquier día de prueba determinado.

Para evaluar el compuesto de prueba, se diseña un cuadrado latino balanceado de 8 x 8 para mediciones repetidas, hasta lograr una alta eficiencia experimental con la menor cantidad de animales. Ocho sesiones experimentales, dos por semana, se llevan a cabo con los 8 tratamientos (vehículo, escopolamina, 3 dosis de compuesto de prueba en combinación con escopolamina) aleatorizados dentro de cada sesión. Cada tratamiento

siguió a cada otro tratamiento, el mismo número de veces. Por lo tanto, el efecto residual de cada tratamiento pudo estimarse y removerse del efecto del tratamiento directo. Después de ANOVA, se realizan comparaciones múltiples usando la prueba bilateral de Dunnett en medias ajustadas.

- 5 Se considera que los animales que no hacen 4 elecciones correctas dentro de 5 minutos durante la primera exposición, o que no han hecho un total de 8 elecciones al final de la segunda exposición, se han "tardado" para esa sesión. Cualquier animal que "se haya tardado" después de la administración de más de una dosis del compuesto de prueba, se
- 10 excluye del análisis.

Neuroprotección

- 15 Inhibición de muerte de las células dependiente del tiempo en cultivos de neuronas corticales primarias

- Se produjeron neuronas corticales primarias a partir de cerebros de ratas que tenían de 0 a 1 día, usando una variación de los métodos descritos por Monyer *et al.*, *Brain Research* 483: 347-354 (1989). Se desarrolló tejido cerebral disperso en DMEM/PDHS (suero de caballo donador
- 20 preñado) a 10% por tres días, y se trató entonces con arabinósido de citosina (ARC) por dos días, para remover células gliales contaminantes. En el día 5, el medio de ARC se removió, y se reemplazó con DMEM/PDHS a 10%. Las células neuronales se cultivaron por otros 4 a 7 días antes de su uso.

Los cultivos neuronales primarios control muestran muerte progresiva de células entre los días 12 y 18 en cultivo. Se evaluaron 12 cultivos en los días 12 y 16 para niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LD) después de la adición del compuesto de prueba a 6 cultivos mantenidos en DMEM y PDHS a 10% en el día 9, y manteniendo los cultivos restantes como controles. Se puso a prueba la LD usando una variación del método de Wroblewski *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 210-213 (1955). La LD es una enzima citosólica que se usa comúnmente en investigación clínica y básica para determinar la viabilidad de los tejidos. Un incremento en la LD del medio, se relaciona directamente con la muerte de las células.

Neuroprotección contra citotoxicidad inducida por hipoglicemia

Se sembraron células de glioma C6 obtenidas de The American Tissue Culture Center (ATCC) en medio del RPMI con FBS a una concentración de 1×10^6 células/mL en matraces de cultivo de tejidos FALCON® de 25 cm². Cuatro horas antes del inicio de la hipoglicemia, el medio de mantenimiento se desechó, las monocapas se lavaron dos veces en el medio adecuado, y se incubaron entonces por cuatro horas a 37°C en medio libre de suero o medio libre de suero más compuesto de prueba. Se usó regulador de pH de fosfato de Ringer de Krebs para lavar las monocapas dos veces antes de la adición del tratamiento adecuado con glucosa. El medio del RPMI contiene 2 mg de glucosa/mL; se dividieron los matraces en grupos de 6, cada uno recibiendo glucosa a 100% (2 mg/ml), glucosa a 80% (1.6

mg/ml), glucosa a 60% (1.2 mg/ml) o glucosa a 0% (regulador de pH), o complementado con compuesto de prueba. Todos los matraces se incubaron por 20 horas, y se evaluaron entonces para número total de células vivas y muertas usando azul tripano.

5

Neuroprotección contra aminoácidos excitotóxicos

Se trataron cinco placas de cultivo que contenían células de neuroblastoma SK-N-SH con compuesto de prueba, y se trataron 5 placas de cultivo con medios del RPMI. Cuatro horas después, se trataron todas las
10 células con NMDA (500 μ M) por 5 minutos. Se determinó entonces el total de células vivas y células muertas.

Neuroprotección contra la privación de glucosa y oxígeno - análisis de núcleos picnóticos para medir apoptosis

15 Se preparan neuronas corticales de fetos de rata E18, y se siembran en portaobjetos con cámara de 8 cavidades pre-revestidos con poli-D-lisina (10 ng/ml) y suero a una densidad de 100,000 células/cavidad. Las células se siembran en DMEM de alto contenido de glucosa conteniendo FCS a 10%, y se mantienen en la incubadora a 37°C con CO₂ a 10%/aire a 90%. Al
20 día siguiente, se remueve suero reemplazando el medio de cultivo con DMEM de alto contenido de glucosa conteniendo complemento B27, y las células se mantienen en la incubadora sin más cambio de medio hasta el día del experimento. En el día 6, se dividen los portaobjetos en dos grupos: un grupo

control y un grupo de OGD. Las células en el grupo control reciben DMEM con glucosa y B27 como de costumbre (sin antioxidantes). Las células en el grupo de OGD reciben DMEM sin glucosa con B27 como de costumbre, el cual se ha desgasificado bajo vacío por 15 minutos. Las células se baldean con N₂ a 5 90%/CO₂ a 10% por 10 minutos en una cámara hermética, y se incuban a 37°C por 6 horas. Después de 6 horas, las células control y de OGD se someten a reemplazo de medio conteniendo vehículo (DMSO) o compuesto de prueba en DMEM conteniendo glucosa con B27 como de costumbre. Las células se regresan a una incubadora normóxica a 37°C. Después de 24 10 horas, las células se fijan en PFA a 4% por 10 minutos a 4°C, y se tiñen con Topro (colorante fluorescente de unión nuclear). Se evalúa la apoptosis usando un citómetro de exploración con láser midiendo los núcleos picnóticos.

Medición de la liberación de LDH como una indicación de la
15 muerte de células

Se preparan neuronas corticales de feto de rata E18, y se siembran en placas de cultivo de 48 cavidades pre-revestidas con polí-D-lisina (10 ng/ml) y suero a una densidad de 150,000 células/cavidad. Las células se siembran en DMEM de alto contenido de glucosa conteniendo FCS a 10%, y 20 se mantienen en la incubadora a 37°C con CO₂ a 10%/aire a 90%. Al día siguiente, se remueve el suero reemplazando el medio de cultivo con DMEM de alto contenido de glucosa conteniendo complemento B27. En el día 6, se divide a las células en dos grupos: un grupo control y un grupo de OGD. Las

células en el grupo control reciben DMEM con glucosa y B27 como de costumbre (sin antioxidantes). Las células en el grupo de OGD reciben DMEM sin glucosa con B27 como de costumbre, el cual se ha desgasificado bajo vacío por 15 minutos. Las células se baldean con N₂ a 90%/CO₂ a 10% por 10 minutos en una cámara hermética, y se incuban a 37°C por 6 horas. Después de 6 horas, las células control y de OGD se someten a reemplazo de medio conteniendo vehículo (DMSO) o compuesto de prueba en DMEM conteniendo glucosa con B27 como de costumbre. Las células se regresan a una incubadora normóxica a 37°C. Después de 24 horas, se evalúa la muerte de las células midiendo la liberación celular de LDH (lactato deshidrogenasa) en el medio de cultivo. Para la prueba de LDH, se transfiere una alícuota de 50 µl de medio de cultivo en la placa de 96 cavidades. Después de la adición de 140 µl de regulador de pH de fosfato de potasio a 0.1 M (pH 7.5) y 100 µl de 0.2 mg/ml de NADH, se deja que la placa repose en la oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos. La reacción se inicia por la adición de 10 µl de piruvato de sodio. La placa se lee de inmediato a 340 nM en un lector de placa Thermomax (Molecular Devices). La absorbancia, un índice de la concentración de NADH, se registra cada 6 segundos por 5 minutos, y la pendiente que indica la rapidez de desaparición de NADH, se usa para calcular la actividad de LDH:

$$\text{Actividad de LDH (U/ml)} = (\Delta A/\text{min}) (\text{TCF})(20) (0.0833)/(.78)$$

en donde:

0.0833 = proporcionalmente constante, y

0.78 = longitud de la trayectoria de luz del instrumento (cm).

Procedimiento de prueba en ratas HLA – enfermedad de Crohn y trastornos inflamatorios del intestino

5 Se obtienen ratas HLA-B27 machos de Taconic, y se proveen con acceso no restringido a un alimento (Purina Mills® LabDiet® 5001) y agua. Al inicio del estudio, las ratas tienen de 22 a 26 semanas.

 Se dosifica a las ratas subcutáneamente una vez por día por siete días con una de las formulaciones enlistadas a continuación. Existen
10 cinco ratas en cada grupo, y la última dosis se administra dos horas antes de la eutanasia.

- Vehículo (DMSO a 50%/PBS de Dulbecco a 50%);
- 17 α -etinil-17 β -estradiol (10 μ g/kg); o
- Compuesto de prueba.

15 Se observa diariamente la calidad de las heces, y se clasifica de acuerdo a la siguiente escala: diarrea = 3; heces blandas = 2; heces normales = 1. Al final del procedimiento de prueba, se colecta suero y se almacena a -70°C. Se prepara una sección de colon para análisis histológico, y se analiza un segmento adicional para actividad de mieloperoxidasa.

20 El siguiente método se usa para medir la actividad de mieloperoxidasa. Se cosecha tejido del colon, y se congela instantáneamente en nitrógeno líquido. Una muestra representativa del colon entero se usa para asegurar la consistencia entre las muestras. El tejido se almacena a -80°C

hasta su uso. Después, el tejido se pesa (aproximadamente 500 mg) y se homogeniza en 1:15 p/v de regulador de pH de lavado de H_2KPO_4 a 5 mM (pH 6). El tejido se centrifuga a 20,000 x g en una centrífuga Sorvall RC 5B por 45 minutos a 2-8°C. Se desecha entonces el sobrenadante. Se resuspende el
5 tejido y se homogeniza en 2.5 mL (1:5 p/v) de H_2KPO_4 a 50 mM con EDTA a 10 mM y bromuro de hexamonio a 0.5%, para ayudar a solubilizar la MPO intracelular. El tejido se congela en nitrógeno líquido, se descongela en un baño de agua a 37°C, y se sonica por 15 segundos para asegurar la lisis de la membrana. Este procedimiento se repite 3 veces. Se mantienen entonces
10 muestras en hielo por 20 minutos, y se centrifugan a 12,000 x g por 15 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se analiza siguiendo estos pasos.

La mezcla de prueba se prepara añadiendo 2.9 mL de H_2KPO_4 a 50 mM con 0.167 O-Dianisidina/ml con H_2O_2 a 0.0005% en un tubo de reacción. Cuando el peróxido de hidrógeno es degradado, la O-Dianisidina es
15 oxidada, y absorbe a 460 nm en una forma dependiente de la concentración. La mezcla se calienta a 25°C. Cien (100) μL del sobrenadante del tejido se añaden al tubo de reacción, y se incuban por un minuto a 25°C, y entonces se transfiere 1 ml a una probeta de plástico desechable. Se mide la densidad óptica (DO) cada 2 minutos de tiempo de reacción a 460 nm contra un blanco
20 que contiene 2.9 ml de mezcla de reacción y 100 μL de la solución de bromuro de amonio a 0.5%.

Las unidades de actividad enzimática se cuantifican por comparación de la absorbancia a 460 nm con una curva estándar preparada

con 31.1 unidades de MPO purificada de humano/vial. La MPO se reconstituye, y se diluye en serie usando H_2KPO_4 a 50 mM con EDTA a 10 mM y bromuro de hexamonio a 0.5% a cuatro concentraciones conocidas. Las absorbancias de las muestras se comparan contra esta curva para determinar la actividad.

Se realiza el análisis histológico de la manera siguiente. Se sumerge tejido colónico en formalina neutra a 10% regulada en su pH. Cada muestra de colon se separa en cuatro muestras para evaluación. Los tejidos fijados en formalina se procesan en un procesador de infiltración a vacío para inclusión en parafina. Las muestras se seccionan a 5 μm , y se tiñen entonces con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluaciones histológicas simuladas usando una escala modificada de Boughton-Smith. Después de que concluyen las puntuaciones, las muestras se observan, y los datos se tabulan y se analizan por elaboración de modelos lineales de ANOVA con comparaciones de media múltiples.

Con base en los resultados obtenidos en los procedimientos de pruebas farmacológicas estándar, como se describe en la presente, los compuestos de esta invención son moduladores del receptor de estrógeno útiles en el tratamiento o inhibición de condiciones, trastornos o estados de enfermedad que son por lo menos mediados parcialmente por una deficiencia o exceso de estrógeno, o que pueden tratarse o inhibirse a través del uso de un agente estrogénico.

Se pretende que cada una de las patentes, solicitudes y

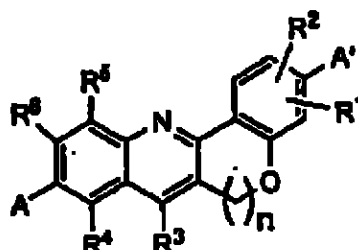
publicaciones impresas, incluyendo libros, mencionados en este documento de patente, se incorpore en su totalidad en la presente como referencia. Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de E.U.A. número de serie 60/607,766, presentada en septiembre 7 de 2004, la cual se

5 incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

Como los expertos en la técnica apreciarán, numerosos cambios y modificaciones pueden hacerse a las modalidades preferidas de la invención, sin que se aparten del espíritu de la invención. Se pretende que dichas variaciones estén dentro del alcance de la invención.

N UVEDAD DE LA INVENCION**REVINDICACIONES**

5 1.- Un compuesto de fórmula I que tiene la estructura:



I

10

en donde: A y A' son cada uno independientemente OH, H u OR; cada R se
selecciona independientemente del grupo que consiste de alquilo de C₁-C₆,
alquenilo, bencilo, acilo, aroilo, -C(=O)-OR', sulfonilo y fosforilo, en donde
cada R' se selecciona independientemente de alquilo de C₁-C₆, alquenilo de
15 C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇ o cicloalquilo de C₃-C₁₀, cada uno de los cuales es
sustituido opcionalmente por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de alquilo de
C₁-C₆ o halógeno; R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que
consiste de H, halógeno, alquilo de C₁-C₆, perhaloalquilo de C₁-C₆, CF₃,
alquenilo de C₂-C₇ y alcoxi de C₁-C₆; R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno
20 independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, CF₃,
perhaloalquilo de C₁-C₆, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-
C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₆, CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo y
heteroarilo; en donde las porciones alquilo o alquenilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶

pueden ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, NO₂ o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R¹⁰ seleccionados independientemente; en donde la
5 porción alquinilo de R³, R⁴, R⁵ y R⁶ puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, -CHO, acilo, trifluoroalquilo, trialquilsililo o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R¹⁰ seleccionados independientemente; en donde la porción fenilo, arilo o heteroarilo de R³, R⁴,
10 R⁵ y R⁶ puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, -CN, alquilo, alcoxi, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi; cada R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo que consiste de halógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, -OH, alcoxi de C₁-C₆, -CN, -CHO, -NO₂, amino, alquilamino de C₁-C₆, dialquilamino de C₁-C₆, tiol
15 y alquiltio de C₁-C₆; y n es 0, 1, 2 ó 3; siempre que: por lo menos uno de A y A' no sea H; si n es 0, entonces R₃ no sea halógeno; y por lo menos uno de R³, R⁴ y R⁵ sea halógeno, alquilo de C₁-C₆, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₆, -CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo o heteroarilo; o un N-óxido del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable
20 del mismo, o un profármaco del mismo.

1.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque A y A' son cada uno OH.

2.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado además porque uno de A y A' es OH, y el otro de A y A' es OR.

3.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque uno de A y A' es OH, y el otro de A y A' es O-alquilo de C₁-C₆.

5 4.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque A y A' son cada uno OR.

5.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque A y A' son cada uno -O-alquilo de C₁-C₆.

6.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1,
10 caracterizado además porque uno de A y A' es H, y el otro de A y A' es OH u OR.

7.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque uno de A y A' es H, y el otro de A y A' es OH u O-alquilo de C₁-C₆.

15 8.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque R³ y R⁵ son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo de C₁-C₆, alqueno de C₂-C₇, alquino de C₂-C₇, -CN, -CHO, acilo o fenilo, sustituido opcionalmente, como se definió previamente.

20 9.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque R³ es diferente de H.

10.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque R³ es halógeno, alquilo

de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, -CN, -CHO, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de C₁-C₈, perfluoroalquilo y CN; y R⁵ es H, halógeno, alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, -CN, -CHO, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de C₁-C₈, perfluoroalquilo y CN.

11.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque dicho fenilo de dicho R³ es sustituido opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, CN, OCH₃ y CF₃.

12.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque R³ es halógeno, alquinilo de C₂-C₇ o -CN.

13.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque R³ y R⁵ son cada uno independientemente halógeno, alquinilo de C₂-C₇ o -CN.

14.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque uno de R¹ y R³ es halógeno.

15.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque uno de R¹ y R² es flúor.

16.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque uno de R¹ y R² es

halógeno, y el otro de R^1 y R^2 es H.

17.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque uno de R^1 y R^2 es flúor, y el otro de R^1 y R^2 es H.

5 18.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque R^1 y R^2 son cada uno independientemente halógeno.

 19.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque R^1 y R^2 son cada uno
10 H.

 20.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado además porque R^1 y R^2 son cada uno flúor.

 21.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 21, caracterizado además porque R^4 es H, halógeno o -CN.

 22.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado además porque R^4 es H.

 23.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 8, caracterizado además porque: R^3 es halógeno, alquilo de C_1-C_8 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 , -CN, -CHO, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de C_1-C_8 , perfluoroalquilo y CN; R^5 es H, halógeno, alquilo de C_1-C_8 , alquenilo de

C₂-C₇, alquínilo de C₂-C₇, -CN, -CHO, o fenilo sustituido opcionalmente con hasta tres grupos seleccionados de halógeno, alcoxi de C₁-C₆, perfluoroalquilo y CN; uno de R¹ y R² es halógeno; y R⁴ es H, halógeno o -CN.

24.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 2,
5 caracterizado además porque R³ es halógeno, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

25.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 2,
caracterizado además porque R³ es OH, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

26.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 2,
10 caracterizado además porque R³ es alquénilo de C₂-C₇, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

27.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 2,
caracterizado además porque R³ es CN, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

28.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 2,
15 caracterizado además porque R³ es alquínilo de C₂-C₇, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

29.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 6,
caracterizado además porque R³ es alquilo de C₁-C₆, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

20 30.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 6,
caracterizado además porque R³ es fenilo sustituido opcionalmente, y R¹, R², R⁴, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

31.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 31,

caracterizado además porque dichos sustituyentes de dicho fenilo se seleccionan del grupo que consiste de halógeno, alcoxi de C₁-C₆, perfluoroalquilo y CN.

32.- El compuesto de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 23 ó 25 a 32, caracterizado además porque n es 1.

33.- El compuesto de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque n es 1.

34.- Un compuesto que es: a) 3,9-Dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolin-7-ol; b) 7-Cloro-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; c) 7-
10 Bromo-3,9-dimetoxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; d) 7-Cloro-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; e) 7-Bromo-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; f) 3,9-Dihidroxi-7-vinil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; g) 3,9-Dihidroxi-7-[(trimetilsilil)etnil]-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; h) 3,9-Dihidroxi-7-etnil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; i) 3,9-Dihidroxi-7-etil-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; j) 7-Ciano-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; k) 7-(4-
15 Clorofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; l) 7-(4-Cianofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; m) 3,9-Dihidroxi-7-(4-metoxifenil)-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; n) 3,9-Dihidroxi-7-[4-(trifluorometil)fenil]-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; o) 7-(3-Clorofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; p) 3,9-Dihidroxi-7-(3-metoxifenil)-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; q) 7-(3-Cianofenil)-3,9-dihidroxi-6H-cromeno[4,3-b]quinolina; o sales, quelatos, complejos o profármacos del mismo farmacéuticamente aceptables.

35.- Una composición que comprende un compuesto de

conformidad con la reivindicación 35.

36.- Una composición que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

37.- Un método para tratar o inhibir osteoporosis, o inhibir desmineralización ósea en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

38.- Un método para tratar o inhibir enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, proctitis ulcerativa o colitis en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

39.- Un método para disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos, Lp(a) o LDL; inhibir o tratar hipercolesteremia; hiperlipidemia; enfermedad cardiovascular; aterosclerosis; enfermedad vascular periférica; restenosis o vasoespasmo; o inhibir daño vascular en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

40.- Un método para proveer mejora de la cognición o neuroprotección; o tratar o inhibir demencias seniles, enfermedad de Alzheimer, declinación cognitiva, apoplejía, ansiedad o trastornos neurodegenerativos en un mamífero que necesita del mismo, que comprende

proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

41.- Un método para tratar o inhibir estados de enfermedad inducidos por radicales libres en un mamífero que necesita del mismo, que
5 comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

42.- Un método para tratar o inhibir atrofia vaginal o vulvar; vaginitis atrófica; sequedad vaginal; prurito; dispareunia; disuria; urinación frecuente; incontinencia urinaria; o infecciones del tracto urinario en un
10 mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

43.- Un método para tratar o inhibir síntomas vasomotores en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero
15 una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

44.- El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque el síntoma vasomotor son bochornos.

45.- Un método de contracepción en un mamífero que necesita
20 del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

46.- Un método para tratar o inhibir artritis reumatoide,

47.- Un método para tratar o inhibir daño de las articulaciones, secundario a procedimientos artroscópicos o quirúrgicos en un mamífero que necesita de mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

49.- Un método para tratar o inhibir isquemia, lesión por
reperusión, asma, pleuresía, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico,
15 mialgia, artralgia, insomnio, irritabilidad, uveítis, sepsis, choque hemorrágico o
diabetes tipo II en un mamífero que necesita del mismo, que comprende
proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de
conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

50.- Un método para tratar o inhibir hipocalcemia, hipercalcemia, enfermedad de Paget, osteomalacia, osteomalacia, osteomalacia o mieloma múltiple en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

51.- Un método para tratar o inhibir crecimiento anormal de tejido benigno o maligno, incluyendo hipertrofia prostática, leiomiomas uterinos, cáncer de mama, endometriosis, cáncer endometrial, síndrome de poliquistosis ovárica, pólipos endometriales, enfermedad benigna de mama, adenomiosis, cáncer ovárico, melanoma, cáncer de próstata, cánceres del colon o cánceres del SNC en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

52.- El método de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque el crecimiento anormal de tejido benigno o maligno es hipertrofia prostática, leiomiomas uterinos, cáncer de mama, cáncer, síndrome de poliquistosis ovárica, pólipos endometriales, enfermedad benigna de mama, adenomiosis, cáncer ovárico, melanoma, cáncer de próstata, cánceres del colon o cánceres del SNC.

53.- El método de conformidad con la reivindicación 53, caracterizado además porque los cánceres del SNC son glioma o astioblastoma.

54.- Un método para tratar o inhibir cánceres, trastornos del sistema nervioso central o trauma, enfermedad ósea, envejecimiento, trastornos inflamatorios, enfermedad vascular periférica, enfermedades autoinmunes, sufrimiento respiratorio, enfisema, hepatitis viral, hepatitis activa crónica, tuberculosis, psoriasis o síndrome de sufrimiento respiratorio del adulto en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a

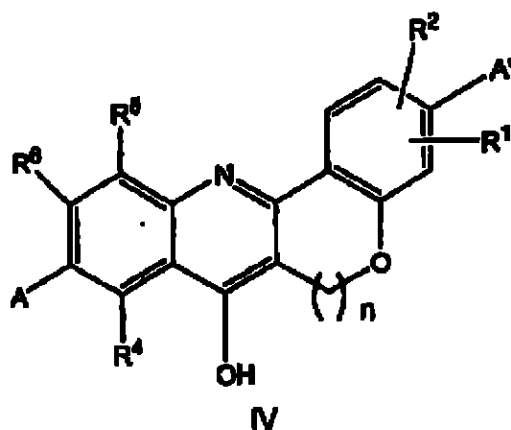
dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

55.- Un método para tratar o inhibir atrofia de la piel, acné o calvicie de patrón masculino en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

56.- Un método para tratar o inhibir leucemia, ablaciones endometriales, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática o enfermedades o trastornos de la coagulación en un mamífero que necesita del mismo, que comprende proveer a dicho mamífero una cantidad efectiva de uno o más compuestos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

57.- Un método para la preparación de un compuesto de fórmula

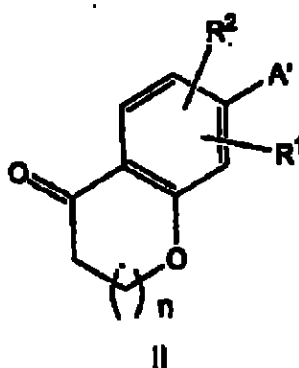
IV:



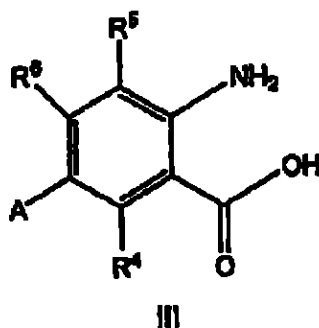
en donde: A y A' son cada uno independientemente OH, H u OR; cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste de alquilo de C₁-C₈,

alquenilo, bencilo, acilo, aroilo, $-C(=O)-OR'$, sulfonilo y fosforilo, en donde cada R' se selecciona independientemente de alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 o cicloalquilo de C_3-C_{10} , cada uno de los cuales es sustituido opcionalmente por 1 a 3 sustituyentes seleccionados de alquilo de C_1-C_6 o halógeno; R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, alquilo de C_1-C_6 , perhaloalquilo de C_1-C_6 , CF_3 , alquenilo de C_2-C_7 y alcoxi de C_1-C_6 ; R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, CF_3 , perhaloalquilo de C_1-C_6 , alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 , cicloalquilo de C_3-C_7 , alcoxi de C_1-C_6 , CN, $-CHO$, acilo, fenilo, arilo y heteroarilo; en donde las porciones alquilo o alquenilo de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 pueden ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, NO_2 o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente; en donde la porción alquinilo de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, $-CN$, $-CHO$, acilo, trifluoroalquilo, trialkilsilo o fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente; en donde la porción fenilo, arilo o heteroarilo de R^3 , R^4 , R^5 y R^6 puede ser cada una sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de halógeno, $-CN$, alquilo, alcoxi, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi; cada R^{10} se selecciona independientemente del grupo que

consiste de halógeno, alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, -OH, alcoxi de C₁-C₈, -CN, -CHO, -NO₂, amino, alquilamino de C₁-C₈, dialquilamino de C₁-C₈, tior y alquiltio de C₁-C₈; y n es 0, 1, 2 ó 3; siempre que: por lo menos uno de A y A' no sea H; si n es 0, entonces R₃ no sea halógeno; y por lo menos uno de R³, R⁴ y R⁵ sea halógeno, alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₈, -CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo o heteroarilo; o un N-óxido del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un profármaco del mismo, que comprende los pasos de: a) proveer un compuesto de fórmula II:

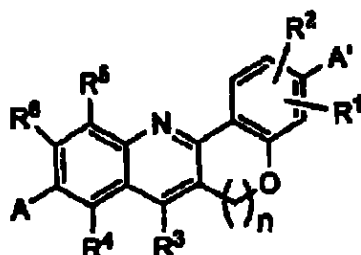


y; b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III:



para producir el compuesto de fórmula IV.

58.- El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado además porque comprende el paso de poner en contacto el compuesto de fórmula IV con un reactivo de modificación para formar un
5 compuesto de fórmula I:



1

10 en donde: R^3 se selecciona del grupo que consiste de H, halógeno, CF_3 , perhaloalquilo de C_1-C_6 , alquilo de C_1-C_6 , alquenilo de C_2-C_7 , alquinilo de C_2-C_7 , cicloalquilo de C_3-C_7 , alcoxi de C_1-C_6 , CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo y heteroarilo; en donde las porciones alquilo o alquenilo de R^3 son sustituidas
15 opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, CN, trifluoroalquilo, trifluoroalcoxi, NO_2 y fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente; en donde la porción alquinilo de R^3 es sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados
20 de halógeno, -CN, -CHO, acilo, trifluoroalquilo, trialquilsililo y fenilo, en donde dicho fenilo es sustituido opcionalmente con hasta tres grupos R^{10} seleccionados independientemente; en donde la porción fenilo, arilo o heteroarilo de R^3 es sustituida opcionalmente con hasta tres sustituyentes

seleccionados de halógeno, -CN, alquilo, alcoxi, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi; siempre que: por lo menos uno de A y A' no sea H; si n es 0, entonces R₃ no sea halógeno; y por lo menos uno de R³, R⁴ y R⁵ sea halógeno, alquilo de C₁-C₈, alquenilo de C₂-C₇, alquinilo de C₂-C₇, cicloalquilo de C₃-C₇, alcoxi de C₁-C₈, -CN, -CHO, acilo, fenilo, arilo o heteroarilo; o un N-óxido del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un profármaco del mismo.

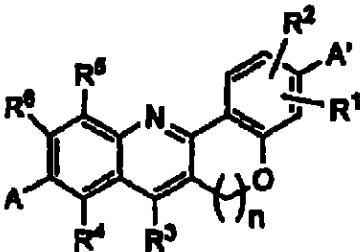
59.- El producto del procedimiento de conformidad con la reivindicación 58.

10 60.- El producto del procedimiento de conformidad con la reivindicación 59.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención provee compuestos de 6H-[1]benzopirano[4,3-b]quinolina que tienen la fórmula I:

5



10

15

MC

20 P07/308F

From the INTERNATIONAL BUREAU

MPS/MAP

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

NO. 173

173

STRAHER, Michael, P.
Cozen O'Connor
1900 Market Street
Philadelphia, PA 19103-3508
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
27 April 2006 (27.04.2006)

(167682)

Applicant's or agent's file reference
AM101545

WYETH 085-500

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/031696International filing date (day/month/year)
06 September 2005 (06.09.2005)Priority date (day/month/year)
07 September 2004 (07.09.2004)

Applicant

WYETH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☐ copy of the international application as published by the International Bureau on under No. WO
- ☒ copy of international application as republished by the International Bureau on 27 April 2006 (27.04.2006) under No. WO 2006/029146
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

RECEIVED
COZEN IP DEPT.

MAY 08 2006

DUE DATE NIA
MAX DATE _____
DOCKETED BY A-TTo: _____
Date: _____
Copy sent to ClientThe International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Philippe Becamel

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 70 90

174 not 73

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 March 2006 (16.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/029146 A3

(51) International Patent Classification:

C07D 491/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/031696

(22) International Filing Date:

6 September 2005 (06.09.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/607,766 7 September 2004 (07.09.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; A corporation of the State of Delaware, Five Ci-
ralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): VU, An-Thien
[US/US]; 1212 Chestershire Drive, Pottstown, PA 19465
(US).

(74) Agents: STRAHER, Michael, P. et al.; Cozen O'Connor,
1900 Market Street, Philadelphia, PA 19103-3508 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

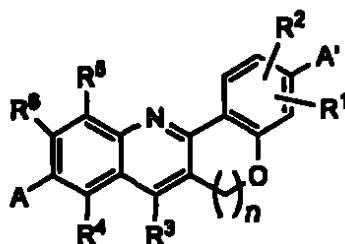
Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
27 April 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: 6H-[1]BENZOPYRANO[4,3-b]QUINOLINES AND THEIR USE AS ESTROGENIC AGENTS



(57) Abstract: This invention provides 6H-[1]benzopyrano[4,3-b]quinoline
compounds having the formula I: The invention further provides compositions
including the compounds, methods for the use of the compounds, and the methods
of preparation of the compounds.

WO 2006/029146 A3

175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D491/06 A61K31/47 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D A61K A61P

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N. MALECKI ET AL: "Synthesis of condensed quinolines and quinazolines as DNA ligands" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 12, no. 3, 2004, pages 641-647, XP002365959 page 643, left column, compound 19c	1,7-23
A	WO 96/19458 A (LIGAND PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 27 June 1996 (1996-06-27) general formulae V-VIII, XII-XVI page 4, line 2 - page 4, line 8; claims	1-60
A	WO 2004/073610 A (MERCK & CO., INC; SUN, WANYING; CAMA, LOVJI, D) 2 September 2004 (2004-09-02) page 5, line 2 - page 5, line 8; claims	1-60

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* 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 document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)

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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2006

Date of mailing of the international search report

09/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmid, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/031696

11/27/05

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 61
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

The set of claims consists of claim 1 and claims 1-60. Since claim 1 is double the search has been performed with an internal numbering of claim 1-60 to claims 2-61.

Although renumbered claims 38-57 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Renumbered claim 61 contains a reference to renumbered process claim 60 which is in fact a product claim. Accordingly it has not been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ation on patent family members

national application No

rC17/US2005/031696

00177

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9619458	A	27-06-1996	AT 269336 T 15-07-2004
			AT 252560 T 15-11-2003
			AU 717251 B2 23-03-2000
			BR 9510486 A 02-06-1998
			CA 2208347 A1 27-06-1996
			CN 1175247 A 04-03-1998
			CN 1626534 A 15-06-2005
			CZ 9701761 A3 16-09-1998
			DE 69531998 D1 27-11-2003
			DE 69531998 T2 22-07-2004
			DE 69533180 D1 22-07-2004
			DE 69533180 T2 14-07-2005
			DK 800519 T3 01-03-2004
			EP 0800519 A1 15-10-1997
			HU 78117 A2 29-11-1999
			JP 10510840 T 20-10-1998
			NO 972591 A 14-08-1997
			NO 20003534 A 14-08-1997
			NO 20003550 A 14-08-1997
			NO 20003551 A 14-08-1997
			NO 20003552 A 14-08-1997
			NZ 300739 A 26-05-2000
			PT 800519 T 31-03-2004
			RU 2191774 C2 27-10-2002
WO 2004073610	A	02-09-2004	NONE

Tr. Asm/Wyeth
D. 21/3/06
Copy sent to Client

From the INTERNATIONAL BUREAU

MPS/IMAP

00178
177

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 23 January 2006 (23.01.2006) C167682)		To: STRAHER, Michael, P. Cozen O'Connor 1900 Market Street Philadelphia, PA 19103-3508 ETATS-UNIS D'AMERIQUE		RECEIVED COZEN IP DEPT. FEB 03 2006 DATE <u>01/03</u> DATE <u>01/03</u> DUCKETED BY <u>AT</u>	
Applicant's or agent's file reference AM101545 WYTH0085-SUG		IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/US2005/031696		International filing date (day/month/year) 06 September 2005 (06.09.2005)			
International publication date (day/month/year) Not yet published		Priority date (day/month/year) 07 September 2004 (07.09.2004)			
Applicant WYETH et al					

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
07 September 2004 (07.09.2004)	60/607,766	US	19 December 2005 (19.12.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Baechler Francois

Facsimile No. +41 22 338 70 90

Telephone No. +41 22 338 95 44

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CP6HSNIR

Retiro folios 179, 180 y 181
"Extorción y fogata."



Carrera 13 No 27-00 Piso 5 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E-mail Info@sl.gov.co
www.sl.gov.co
Bogotá D C Colombia