

ACTIVADORES DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS DESPLEGADAS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad, conforme al Título 35 U. S. C. §119(e), de la
5 Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nro. 62/693.641, presentada el 3 de julio de 2018, que se incorpora en la presente solicitud por referencia.

APOYO GUBERNAMENTAL

Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno bajo la Concesión Nro.
10 RO1DK071909, otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama son ER α positivos. Las terapias
15 endocrinas (hormonales) para estos tumores incluyen inhibidores de la aromatasa que bloquean la producción de estrógenos, tamoxifeno que compite con los estrógenos por unirse a ER α , y fulvestrant/Faslodex/ICI 182.780, que compiten con los estrógenos y promueven la degradación de ER α . Aunque inicialmente son eficaces, a veces se desarrolla resistencia en tumores primarios, y es casi universal en el contexto metastásico. Aunque los mecanismos de
20 resistencia son diversos, estudios recientes muestran que aproximadamente el 30% de estos tumores metastásicos albergan mutaciones ER α , más comúnmente ER α D538G y ER α Y537S. Existe abundante evidencia de que estos tumores exhiben una proliferación independiente de estrógenos y, por lo tanto, son resistentes a los inhibidores de la aromatasa, que bloquean la producción de estrógenos. También son en gran parte resistentes al
25 tamoxifeno, y parcialmente resistentes al fulvestrant. En particular, los pacientes cuyos tumores metastásicos contienen la mutación ER α D538G tienen un tiempo de sobrevida 6 meses más corto, y aquellos con la mutación ER α Y537S tienen un tiempo de sobrevida 12 meses más corto, que los pacientes cuyos tumores metastásicos contienen ER α de tipo salvaje no mutado. Por lo tanto, los esfuerzos para desarrollar agentes quimioterapéuticos
30 dirigidos a las células de cáncer de mama que contienen estas mutaciones son extensos y generalizados.

La patología del cáncer de mama ER α positivo es inusual. Si bien las tasas de sobrevida a 5 años son impresionantes, los tumores suelen reaparecer entre 10 y 20 años

después del diagnóstico inicial. Se cree que esto se debe a la reactivación de la proliferación de células de cáncer de mama latentes. Por lo tanto, es especialmente importante destruir realmente las células tumorales, y no permitir que permanezcan inactivas y susceptibles de reactivación. Las terapias endocrinas actuales son citostáticas, no citotóxicas y, por lo tanto, no destruyen las células residuales del cáncer de mama. Esto permite que las células permanezcan inactivas y se reactiven más adelante en el tiempo. Las opciones terapéuticas para estos tumores recurrentes son malas, y la mayoría de las muertes por cáncer de mama ocurren en pacientes con tumores ER α positivos.

El cáncer de ovario generalmente se presenta en una etapa avanzada. Los tumores suelen reaparecer después de la cirugía. Aunque el 30–70% de los tumores de ovario son positivos para ER α , y la expresión de ER α se asocia con un resultado desfavorable, la terapia endocrina es ineficaz, y los tumores recurrentes suelen tratarse con quimioterapia a base de platino y paclitaxel. Aunque inicialmente responden, después de varios ciclos de tratamiento, los tumores reaparecen como cáncer de ovario resistente, con deficientes opciones terapéuticas. Más de la mitad de los pacientes con cáncer de ovario mueren en 5 años. En el cáncer de ovario, un mecanismo muy común de resistencia al paclitaxel y otros agentes de quimioterapia es la resistencia a múltiples fármacos; el eflujo de fármaco dependiente de energía causado por la sobreexpresión de bombas de eflujo dependientes de ATP (adenosina trifosfato), especialmente, la Proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1)/glicoproteína P/ABCB1. A pesar de los intensos esfuerzos, los inhibidores de MDR1 no tóxicos eficaces siguen siendo esquivos.

Aunque muchos cánceres de endometrio uterino son positivos para ER α , la terapia endocrina funciona de manera deficiente.

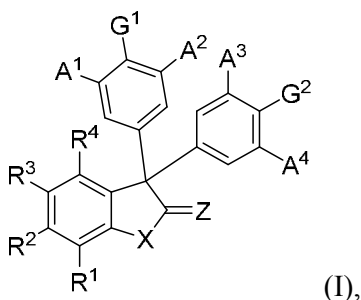
En consecuencia, una meta terapéutica importante es por lo tanto identificar nuevas moléculas pequeñas que sean citotóxicas, no meramente citostáticas, y desarrollar los métodos terapéuticos correspondientes.

SÍNTESIS

Esta divulgación proporciona los beneficios de las moléculas pequeñas con una capacidad mejorada para destruir realmente las células de cáncer de mama resistentes a la terapia, que tienen un potencial terapéutico enormemente aumentado. Específicamente, para prevenir la recurrencia, es fundamental destruir toda la población de células de cáncer de mama resistentes a la terapia en crecimiento y latentes. En comparación con BHPI y con las terapias endocrinas de tamoxifeno y fulvestrant/ICI, el enantiómero activo (–)C–105 tiene

una capacidad mucho mayor para destruir las células del cáncer de mama. Por lo tanto, el compuesto (–)C–105 muestra un potencial terapéutico drásticamente mayor (Figura 4A–4C).

Esta divulgación proporciona un compuesto de Fórmula I:



5 o una de sus sales o solvatos;

en donde

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son cada uno de manera independiente H, halo, $-OR^A$, $-SR^A$, $-N(R^A)_2$, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo;

A^1 , A^2 , A^3 y A^4 son cada uno de manera independiente H, halo, o alquilo;

10 G^1 es halo, $-OR^B$, $-SR^B$, $-S(=O)_2R^B$, o alquilo;

G^2 es halo, $-OR^C$, $-SR^C$, $-S(=O)_2R^C$, o alquilo;

X y Z son cada uno de manera independiente O, S, o $-NR^D$; y

R^A , R^B , R^C y R^D son cada uno de manera independiente H o alquilo, en donde, cuando están presentes, $-OR^B$ y $-OR^C$ no son ambos $-OH$;

15 en donde cada alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

El compuesto anterior puede unirse al receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) y destruir o inhibir el crecimiento de células cancerosas por medio de la hiperactivación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, conforme a sus siglas en inglés) en el retículo endoplasmático.

20 Además, esta divulgación proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto con cáncer $ER\alpha$ positivo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto anterior, de modo de tratar así el cáncer en el sujeto.

La invención proporciona nuevos compuestos de las Fórmulas I–IV, intermediarios para la síntesis de compuestos de fórmulas I–IV, así como métodos para preparar compuestos de las Fórmulas I–IV. La invención también proporciona compuestos de las Fórmulas I–IV que son útiles como intermediarios para la síntesis de otros compuestos útiles. La invención proporciona el uso de compuestos de las Fórmulas I–IV para la fabricación de medicamentos útiles para el tratamiento del cáncer en un mamífero, como un ser humano.

La invención proporciona el uso de las composiciones descritas en este documento para el uso en terapia médica. La terapia médica puede tratar el cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, carcinoma de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de colon. La invención también proporciona el uso de una composición como se describe en este documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, cáncer en un ser humano. El medicamento puede incluir un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la memoria descriptiva, y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertas formas de realización o diversos aspectos de la invención. En algunos casos, las formas de realización de la invención pueden entenderse mejor haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en combinación con la descripción detallada aquí presentada. La descripción y los dibujos adjuntos pueden resaltar cierto ejemplo específico o cierto aspecto de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que se pueden usar partes del ejemplo o aspecto en combinación con otros ejemplos o aspectos de la invención.

Figura 1. Estudio de respuesta a la dosis del efecto de $(\pm)$ -105 en células cancerosas humanas ER α positivas y ER α negativas. Ensayo de muerte de 24 horas con azul Alamar para determinar la IC₅₀ del compuesto 105.

Figura 2. Estudio de respuesta a la dosis que compara la capacidad de BHPI y $(\pm)$ -105 para destruir células T47D positivas para ER α . El compuesto $(\pm)$ -105 induce de forma potente la muerte de las células del cáncer de mama.

Figura 3. Comparación de la capacidad de $(\pm)$ -105 para destruir células ER α positivas y su incapacidad para destruir células ER α negativas.

Figura 4. $(-)$ -105 destruye potente y cuantitativamente las células cancerosas. Células MCF7 (ER+), incubación de 24 horas, leídas mediante fluorescencia de azul Alamar, control muerto: Raptinal, n = 3 (A, B). $(-)$ -105 es eficaz cuando se administra por vía oral (C). Cánceres de mama de xenoinjerto de ratón ortóptico de células TYS, visualización por imágenes bioluminiscentes. Tratamiento: 40 mg/kg diarios $(-)$ -105 durante 3 días, por sonda oral o por inyección intraperitoneal.

Figura 5. Separación quiral de $(\pm)$ -105 que muestra la resolución de enantiómeros individuales.

- Figura 6. Traza de HPLC quiral de ($\pm$)–105 que muestra los picos resueltos.
- Figura 7. Traza de HPLC quiral de (–)–105 de enantiómero aislado.
- Figura 8. Traza de HPLC quiral de (+)–105 del otro enantiómero aislado.
- Figura 9. El enantiómero (–) de 105 está activo, y el enantiómero (+) es inactivo en la
5 línea celular T47D.
- Figura 10. (–)–105 induce la muerte dependiente de la dosis, de células MCF–7; (+)–105 es inactivo.
- Figura 11. El estudio de respuesta a la dosis muestra que (–)–105 es superior a BHPI para destruir células T47D.
- 10 Figura 12. El estudio de respuesta a la dosis muestra que (–)–105 es superior a BHPI en la destrucción de células MCF–7 y TYS.
- Figura 13. El estudio de respuesta a la dosis muestra que (–)–105 es superior al BHPI y las terapias endocrinas actuales, para destruir las células TDG–Luc.
- Figura 14. Estudios de respuesta a la dosis para determinar las IC₅₀ para la destrucción
15 de células cancerosas por (–)–105.
- Figura 15. En experimentos a largo plazo, (–)–105, pero no BHPI, destruye el 100% de las células TYS–Luc.
- Figura 16. En experimentos a largo plazo que simulan la terapia, (–)–105, pero no BHPI, erradica las células letales de cáncer de mama resistentes a la terapia.
- 20 Figura 17. Imágenes bioluminiscentes (BLI) usando luciferasa muestran la casi erradicación de tumores de mama TYS–luc resistentes a la terapia en ratones.
- Figura 18. (–)–105 destruye las células de cáncer de mama resistentes a la destrucción por BHPI.
- Figura 19. (–)–105 activa de forma potente la UPR como se muestra por la inducción
25 de ARNm de XBP–1 empalmado.
- Figura 20. (–)–105 es superior a BHPI en la inhibición de la síntesis de proteínas en células de cáncer de ovario positivas para ER α Caov–3 resistentes a la terapia.
- Figura 21. El bloqueo del flujo de calcio del retículo endoplasmático con 2–APB inhibe la muerte de células cancerosas inducida por (–)–105.
- 30 Figura 22. –105 reduce los niveles de ATP intracelular; esta reducción en los niveles de ATP se bloquea inactivando la bomba SERCA del retículo endoplasmático con tapsigargina.
- Figura 23. El bloqueo de la disminución de los niveles de ATP con tapsigargina inhibe la muerte celular inducida por –105.

Figura 24. Comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células TDG.

Figura 25. Comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células TYS.

5 Figura 26. Comparación de la capacidad de los compuestos de prueba 4, 6, 105 y BHPI para matar células TYS.

Figura 27. Comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células T47D.

10 Figura 28. Ni los compuestos de prueba ni BHPI destruyen células de mama MCF-10A no tumorigénicas ER α negativas.

Figura 29. Evaluación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células T47D.

Figura 30. Estudios de dosis y respuesta que comparan la capacidad de BHPI y compuestos de prueba para inhibir la proliferación de células T47D, TYS y TDG.

15 Figura 31. (–)105 es altamente selectivo para las células cancerosas ER+, lo que incluye frente a los mutantes ER+ letales.

Figura 32. (–)105 tiene el mismo mecanismo de acción (MOA, conforme a sus siglas en inglés) que BHPI.

20 Figura 33. 105, pero no BHPI, destruye las células de cáncer de ovario CaOV-3 de ovario resistentes a la terapia. (±)–105; Ensayo de muerte celular: exclusión automática de azul de tripán (24 horas post (±)–105).

25 Figura 34. (–)105 casi erradica los tumores resistentes a fármacos ER+. Modelo de cáncer de mama ortotópico, células TYS–Luc, 40 mg/kg (–)–105 i. p., por día. La imagen posterior a la inyección 7d es una exposición mucho más larga con una ganancia mayor que la imagen anterior a la inyección.

Figura 35. Diapositiva de PPT adicional (–)–105 es superior a BHPI en experimentos a largo plazo que simulan la terapia del cáncer. Células: T47D–luciferasa.

30 Figura 36. Descubrimiento de SERK–F6 (también conocido como, C(–)–105, (–)–105, (R)–105, (–)–1, o (R)–1), un compuesto que mata células cancerosas ER α positivas. a, Estructuras químicas de BHPI y compuesto racémico 1 (es decir (±)–1), y su actividad citotóxica en células de cáncer de mama T47D después de incubaciones de 24 horas con concentraciones, como se indica en nM. Las células se tiñeron con tintes de anexina V–FITC y PI antes del análisis mediante citometría de flujo. Las barras de error representan S. E. M de 3 réplicas independientes. b, SERK–F6 es citotóxico para la línea celular ER α positiva,

MCF-7, pero tiene efectos mínimos contra la línea celular ER α negativa, MDA-MB-231. Las células se incubaron con SERK-F6 o control positivo, Raptinal, durante 24 horas, y luego se tiñeron con tintes de anexina V-FITC y PI y se analizaron mediante citometría de flujo. Las barras de error representan el S.E.M de 3 réplicas independientes. c, valores de IC₅₀ de SERK-F6 después de 24 horas de incubación frente a un panel de líneas de células cancerosas agrupadas por su estado de ER α informado. La viabilidad celular se midió mediante fluorescencia azul Alamar y se estableció en relación con un control de vehículo y un control muerto cuantitativo tratado con Raptinal. Las barras de error representan S. E. M de 3 experimentos independientes. d, Tinción con violeta cristal de las células T47D después de incubaciones de 24 horas con compuestos y concentraciones como se indica. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. e, f, Experimento de cultivo celular a largo plazo con células T47D, TDG y TYS. Las células se incubaron durante 2 semanas con compuestos (1 μ M), seguido de lavado del compuesto, y las células se cultivaron durante 2 meses. El número de células se determinó mediante MTS.

Figura 37. SERK-F6 es la especie activa que conduce a la erradicación de células ER α positivas. a, Ensayo de exclusión con azul tripán después de 24 horas de incubación del compuesto en un panel de líneas celulares ER α positivas. b, Experimento de cultivo celular a largo plazo con células MCF-7, MDG y MYS incubadas con 1 μ M de BHPI o SERK-F6.

Figura 38. SERK-F6 activa la UPR anticipatoria. a, Inducción de ARNm de sp-XBP1 en células T47D como resultado del tratamiento del compuesto después de los tiempos indicados. Se dosificaron BHPI y SERK-F6 a 1 μ M. Los niveles de ARNm se cuantificaron mediante RT-PCR. Las barras de error representan S. E. M de 6 réplicas biológicas. b, Agotamiento de ATP intracelular (se necesitan detalles aquí), también se necesitan datos de T47D aquí. c, el tratamiento con SERK-F6 (1 μ M) conduce a una inhibición rápida de la síntesis de proteína en las células T47D.

Figura 39. SERK-F6 erradica los tumores ER α de tipo salvaje mediante la hiperactivación de aUPR. a, se establecieron tumores ortotópicos MCF-7 en ratones ovariectomizados con Nu/J suplementados con un pellet E2 de 60 días (0,36 mg), y se cultivaron hasta $\sim 400 \text{ mm}^3$ (28 días para establecer), se aleatorizaron y luego se trataron con vehículo diariamente (n = 3), vehículo semanal (n = 3), fulv. semanalmente (5 mg/ratón, s. c., n = 6), SERK-F6 diariamente (10 o 40 mg/kg p. o.). Se promediaron los brazos del vehículo. Valores de p: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ****: $p \leq 0,0001$. Las imágenes de los tumores se tomaron al final del estudio (día 21) y son representativas de todos los tumores (n = 6). b-e, Las células MCF-7 se injertaron ortotópicamente bilateralmente, y los tumores se

cultivaron hasta que la carga tumoral total fue $\sim 400 \text{ mm}^3$ antes del tratamiento diario con vehículo o SERK-F6 (40 mg/kg p. o.). Los ratones ($n = 5$ por brazo) se sacrificaron después de 3 días (b, c) y 7 días (d, e), y se extrajeron los tumores. La carga tumoral se muestra como la suma de ambos tumores (b, d). c, e, análisis de transferencia de Western de marcadores de aUPR, P-PERK y P-EIF2 α , así como ER α . Se utilizó vinculina (Vin) como control de carga. Las transferencias Western mostradas son representativas de 4 réplicas técnicas. Los pellets de E2 estuvieron presentes durante la progresión de todos los experimentos mostrados. Las barras de error representan S. E. M.

Figura 40. SERK-F6 se tolera, alcanza concentraciones biológicamente relevantes y cruza la barrera hematoencefálica *in vivo*. a, concentraciones séricas de SERK-F6 después de las dosis, vía de administración y tiempo indicados. La concentración se determinó mediante análisis LC/MS/MS. La IC₅₀ promedio de 24 horas de SERK-F6 es 42 nM. b, parámetros farmacocinéticos calculados para SERK-F6. AUC: área bajo la curva, C_{max}: concentración máxima, t_{1/2}: semivida/vida media. c, d, los ratones (CD-1) se trataron con las dosis y los tiempos indicados, luego se sacrificaron, y se recogió su suero y cerebro. Las concentraciones se determinaron mediante análisis LC/MS/MS. El promedio de sangre por ratón se aproximó a 58,5 mL/kg. f-j, tratamiento con SERK-F6 de ratones portadores de tumores MCF-7 ortotópicos. f, cambio porcentual del tumor con la comparación de las mediciones del tumor del Día 0 y el Día 21. Brazos de tratamiento: vehículo diario ($n = 3$), vehículo semanal ($n = 3$), fulv. semanalmente (5 mg/ratón, s. c., $n = 6$), SERK-F6 diariamente (10 o 40 mg/kg p. o.). Se combinaron brazos de vehículos. g, masa de tumores extraídos de ratones. i, peso murino observado durante este estudio de MCF-7 ($n = 6$). i, j, mediciones de tumores para el modelo ortotópico bilateral MCF-7 ($n = 4-5$).

Figura 41. SERK-F6 erradica el cáncer de mama primario y metastásico ER α mutante. a-c, se establecieron tumores ortotópicos TYS-luc. en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, 60 días para establecer), y se dosificaron diariamente como se indica ($n = 5-6$). b, ejemplos representativos de imágenes de bioluminiscencia de ratones tratados con SERK-F6 (7 días). d, e, se establecieron tumores ortotópicos TDG-luc. en ratones ovariectomizados con NSG (sin pellet de E2, 120 días para establecer), que se dosificaron diariamente como se indica ($n = 4-5$). e, imagen de bioluminiscencia de un ratón tratado con SERK-F6, con carga tumoral TDG-luc. después de 7 días. f, tumores ortotópicos MYS-luc. en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, 45 días para establecer) y dosificados diariamente como se indica ($n = 4-5$). g, tumores ortotópicos MDG-luc. en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, 45 días para establecer) y dosificados diariamente

como se indica (n = 4–5). h, modelo metastásico con células MDG–luc. inyectadas en la vena de la cola de ratones ovariectomizados con NSG (sin pellet de E2, 1,5 meses para establecer), y los ratones se dosificaron diariamente como se indica (n = 4–5).

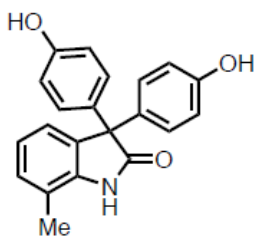
Figura 42. Los resultados muestran que la erradicación de ER α mutante mediada por
5 SERK–F6 depende de la muerte celular cuantitativa. a, el tratamiento se detuvo después de 21 dosis diarias de SERK–F6 (40 mg/kg i. p.), y se siguió la carga tumoral de los ratones mediante bioluminiscencia. b, c peso de ratones portadores de tumor TYS durante el tratamiento con SERK–F6. d, los ratones con tumores TYS tratados con una dosis más baja de SERK–F6 (10 mg/kg, p. o.) mostraron nuevo crecimiento de tumores; sin embargo, el
10 retratamiento de SERK–F6 a una dosis más alta (40 mg/kg, p. o.) conduce a una regresión completa. e, pesos de los ratones observados durante el modelo TDG. f, los ratones portadores de TDG se trataron durante 14 días continuos, y el tratamiento se detuvo, lo que permitió la observación del recrecimiento del tumor mediante imágenes bioluminiscentes. g, se establecieron tumores ortotópicos TDG–luc. en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, ~ 120 días para establecer) y se dosificaron diariamente como se indica (n = 5–6). h,
15 ratones con tumores TDG–luc. tratados con una dosis más baja de SERK–F6 (10 mg/kg, p. o.) mostraron nuevo crecimiento de tumores después de 2 meses sin tratamiento; sin embargo, el retratamiento de SERK–F6 en una dosis más alta (40 mg/kg, i. p.) conduce a una regresión completa. Las barras de error que se muestran son S.E.M.

Figura 43. La erradicación de tumores MYS/MDG mediada por SERK–F6 depende
20 de la destrucción celular cuantitativa. a–b, MYS–luc. Se establecieron tumores ortotópicos en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, ~ 45 días para establecer) y se dosificaron diariamente como se indica (n = 5–6). b, Tratamiento de MYS–luc. los tumores se detuvieron después de 21 dosis diarias de SERK–F6, y se siguió la carga tumoral de los ratones mediante
25 bioluminiscencia. El día 60, los tumores que han vuelto a crecer se dosificaron con SERK–F6 (40 mg/kg diarios i. p.). c, imágenes de bioluminiscencia representativas. c–d, se establecieron tumores ortotópicos MDG–luc. en ratones ovariectomizados NSG (sin pellet de E2, ~ 45 días para establecer) y se dosificaron diariamente como se indica (n = 5–6). Se siguió el volumen del tumor mediante el flujo total de fotones. d, tumores MDG–luc. tratados
30 con 40 mg/kg de SERK–F6 p. o. diariamente volvieron a crecer después de interrumpir el tratamiento. Los tumores que habían crecido nuevamente se volvieron a tratar con 40 mg/kg de SERK–F6 i. p., y se observó la regresión tumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las células cancerosas pueden permanecer inactivas durante períodos prolongados, y luego, reactivarse. Por lo tanto, es deseable destruir las células tumorales, no simplemente para evitar su proliferación. Esta divulgación también proporciona la descripción de diversos ensayos para probar compuestos a fin de determinar la capacidad de destruir células cancerosas, tales como células cancerosas de mama.

Esta divulgación también identifica nuevos compuestos que son más eficaces que BHPI para destruir las células de cáncer de mama que expresan tanto el receptor de estrógeno α de tipo salvaje (ER α) como las mutaciones ER α que son comunes en el cáncer de mama metastásico. Estas mutaciones están asociadas con la resistencia a las terapias actuales. Además, esta divulgación identifica compuestos activos contra células de cáncer de ovario, células de cáncer de útero y otras células cancerosas que contienen ER α .



(BHPI)

El descubrimiento del compuesto C(–)-105 está relacionado en estructura con BHPI. Se determinó que la configuración absoluta del enantiómero levogiratorio del compuesto 105 descubierto tenía la configuración (*R*) (es decir, (*R*)-105). Se identificó que era citotóxico para las células cancerosas, pero no simplemente inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas. El fenotipo de (*R*)-105 destruye las células cancerosas y, a su vez, los tumores. Este hallazgo es sorprendente en vista de los compuestos BHPI, fulvestrant, tamoxifeno y 01-15, ya que estos no destruyen las células cancerosas. Estos compuestos simplemente ralentizan el crecimiento de las células cancerosas, es decir, son citostáticos. Por lo tanto, el (*R*)-105 se identificó por su perfil de citotoxicidad distinto y su capacidad para destruir cuantitativamente las células cancerosas *in vitro*. Los datos recopilados de estudios adicionales *in vivo* han demostrado la eficacia del compuesto en la regresión de tumores.

Definiciones.

Las siguientes definiciones se incluyen para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Como se usan en este documento, los términos enumerados tienen los siguientes significados. Todos los demás términos y

frases utilizados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales, como entenderá el experto en la técnica. Dichos significados ordinarios pueden obtenerse por referencia a diccionarios técnicos, tales como *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* 14th Edition, de R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001.

5 Las referencias en la memoria descriptiva a "una forma de realización", etc. indican que la forma de realización descripta puede incluir un aspecto, característica, estructura, resto o rasgo particular, pero no todas las formas de realización incluyen necesariamente ese aspecto, característica, estructura, resto o rasgo. Además, tales frases pueden referirse, aunque no necesariamente, a la misma forma de realización a la que se hace referencia en
10 otras partes de la memoria descriptiva. Además, cuando un aspecto, rasgo, estructura, resto o característica particular se describe en relación con una forma de realización, está dentro del conocimiento de un experto en la técnica afectar o conectar dicho aspecto, rasgo, estructura, resto o característica con otras formas de realización, descriptas explícitamente o no.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural, a menos
15 que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" incluye una pluralidad de tales compuestos, de modo que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se indica además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración está destinada a servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva, tal como "únicamente",
20 "solo/solamente" y similares, en relación con cualquier elemento descrito en este documento, y/o la cita de elementos de reivindicación o el uso de limitaciones "negativas".

El término "y/o" significa cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos o todos los elementos con los que está asociado este término. Las frases "uno o más" y "por lo menos uno" son fácilmente entendidas por un experto en la técnica,
25 particularmente cuando se leen en el contexto de su uso. Por ejemplo, la frase puede significar uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez, 100 o cualquier límite superior, aproximadamente 10, 100 o 1000 veces mayor que un límite inferior citado. Por ejemplo, uno o más sustituyentes en un anillo de fenilo se refiere a uno a cinco sustituyentes en el anillo.

Como entenderá el experto en la técnica, todos los números, incluidos los que
30 expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., son aproximaciones, y se entiende que están opcionalmente modificadas en todos los casos por el término "alrededor de". Estos valores pueden variar de acuerdo con las propiedades deseadas que pretendan obtener los expertos en la técnica utilizando las enseñanzas de las descripciones de este documento. También se entiende que tales valores

contienen inherentemente variabilidad resultante necesariamente de las desviaciones típicas encontradas en sus respectivas mediciones de prueba. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "alrededor de", se entenderá que el valor particular sin el modificador "alrededor de" también forma un aspecto adicional.

5 Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se utilizan indistintamente. Ambos términos pueden referirse a una variación de $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$ o $\pm 25\%$ del valor especificado. Por ejemplo, "alrededor de 50" por ciento puede en algunas formas de realización tener una variación del 45 al 55 por ciento, o como se define de otra manera en una reivindicación particular. Para rangos de números enteros, el término "alrededor de"

10 puede incluir uno o dos números enteros mayores y/o menores que un número entero mencionado en cada extremo del rango. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pretenden incluir valores, por ejemplo, porcentajes en peso, próximos al rango enumerado que son equivalentes en términos de la funcionalidad del ingrediente, composición o forma de realización individual. Los

15 términos "alrededor de" y "aproximadamente" también pueden modificar los puntos finales de un rango mencionado como se discutió anteriormente en este párrafo.

Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los rangos enumerados en este documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subrangos y

20 sus combinaciones de subrangos, así como los valores individuales que componen el rango, particularmente los valores enteros. Por lo tanto, se entiende que también se describe cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se describen de 10 a 15, entonces también se describen 11, 12, 13 y 14, individualmente y como parte de un rango. Un rango mencionado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos de carbono) incluye cada valor

25 específico, entero, decimal o de identidad dentro del rango. Se puede reconocer fácilmente que cualquier rango enumerado describe suficientemente y permite que el mismo rango se divida en por lo menos mitades, tercios, cuartos, quintos o décimos iguales. Como ejemplo no limitativo, cada rango discutido en este documento se puede dividir fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica,

30 todas las terminologías tales como "hasta", "por lo menos", "mayor que", "menor que", "más que", "o más", y similares, incluyen el número citado, y tales términos se refieren a rangos que se pueden dividir posteriormente en subrangos como es discutido anteriormente. De la misma manera, todas las relaciones enumeradas en este documento también incluyen todas las subrelaciones que caen dentro de la relación más amplia. Por consiguiente, los valores

específicos citados para radicales, sustituyentes y rangos son solo con fines de ilustración; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de rangos definidos para radicales y sustituyentes. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los rangos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

Un experto en la técnica también reconocerá fácilmente que cuando los miembros se agrupan de una manera común, tal como en un grupo Markush, la invención abarca no solo el grupo completo enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal. Además, para todos los propósitos, la invención abarca no solo el grupo principal, sino también el grupo principal en ausencia de uno o más de los miembros del grupo. Por lo tanto, la invención prevé la exclusión explícita de uno o más cualesquiera miembros de un grupo mencionado. Por consiguiente, se pueden aplicar salvedades a cualquiera de las categorías o formas de realización descritas por las que uno o más de los elementos, especies o formas de realización enumerados pueden excluirse de tales categorías o formas de realización, por ejemplo, para su uso en una limitación negativa explícita.

El término "contactar" se refiere al acto de tocar, hacer contacto o llevar a una proximidad inmediata o cercana, incluso al nivel celular o molecular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro* o *in vivo*.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar una enfermedad, un trastorno y/o afección, o para provocar un efecto mencionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir la progresión o la gravedad de la afección o los síntomas que se tratan. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. El término "cantidad eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto descrito en este documento, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos aquí, por ejemplo, que es eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o el trastorno, en un huésped. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado.

Alternativamente, los términos "cantidad eficaz/efectiva" o "cantidad terapéuticamente eficaz/efectiva", como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad suficiente de un agente o de una composición o combinación de composiciones que se administra y que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad o

afección que está siendo tratada. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz/efectiva" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende un compuesto como se describe en el presente

5 documento que se requiere para proporcionar una disminución clínicamente significativa de los síntomas de la enfermedad. Puede determinarse una cantidad "eficaz/efectiva" apropiada en cualquier caso individual usando técnicas, tales como un estudio de aumento de dosis. La dosis se podría administrar en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede sustentarse en factores individuales

10 de cada paciente, incluidos, entre otros, la edad, el tamaño, el tipo o alcance de la enfermedad del paciente, el estadio de la enfermedad, la vía de administración de las composiciones, el tipo o alcance de la terapia complementaria utilizada, el proceso de enfermedad en curso y el tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo frente al convencional).

Los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen (i) prevenir que ocurra una

15 enfermedad, condición patológica o médica (por ejemplo, profilaxis); (ii) inhibir la enfermedad, condición patológica o médica o detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad, patología o condición médica; y/o (iv) disminuir los síntomas asociados con la enfermedad, condición patológica o médica. Por lo tanto, los términos "tratar" y "tratamiento" pueden extenderse a la profilaxis, y pueden incluir prevenir, prevención, disminuir, detener o

20 revertir la progresión o la gravedad de la afección o los síntomas que se tratan. De este modo, el término "tratamiento" puede incluir la administración médica, terapéutica y/o profiláctica, según sea apropiado.

Como se usa en este documento, "sujeto" o "paciente" significa un individuo que tiene síntomas o tiene riesgo de una enfermedad u otra enfermedad maligna. Un paciente puede ser

25 humano o no humano, y puede incluir, por ejemplo, cepas o especies animales utilizadas como "sistemas modelo" con fines de investigación, tales como un modelo de ratón como se describe en el presente documento. Del mismo modo, el paciente puede incluir adultos o jóvenes (por ejemplo, niños). Además, paciente puede significar cualquier organismo vivo, preferentemente un mamífero (por ejemplo, humano o no humano) que pueda beneficiarse de

30 la administración de las composiciones contempladas en este documento. Los ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitación, cualquier miembro de la clase de mamíferos: humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como bovinos, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, tales como ratas,

ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de animales no mamíferos incluyen, sin limitación, aves, peces y similares. En una forma de realización de los métodos proporcionados en este documento, el mamífero es un ser humano.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "proporcionar", "administrar", "introducir" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la colocación de las composiciones de la divulgación en un sujeto mediante un método o una vía que produce la localización por lo menos parcial de la composición en un sitio deseado. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía apropiada que logre el suministro a una ubicación deseada en el sujeto.

10 Las composiciones descriptas en el presente documento se pueden administrar con composiciones adicionales para prolongar la estabilidad y la actividad de las composiciones, o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

Los términos "inhibir, e "inhibición" se refieren a ralentizar, detener o revertir el crecimiento o la progresión de una enfermedad, infección, afección o de un grupo de células.
15 La inhibición puede ser mayor que alrededor del 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95% o 99%, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o la progresión que se produce en ausencia del tratamiento o contacto.

El término "sustancialmente", como se usa en este documento, es un término amplio y se usa en su sentido ordinario, que incluye, sin limitación, que es en gran parte, pero no
20 necesariamente en su totalidad, aquello que se especifica. Por ejemplo, el término podría referirse a un valor numérico que puede no ser el 100% del valor numérico completo. El valor numérico completo puede ser menor que alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 4%, alrededor de 5%, alrededor de 6%, alrededor de 7%, alrededor de 8%, alrededor de 9%, alrededor de 10%, alrededor de 15%, o alrededor del 20%.

25 Esta descripción proporciona métodos para preparar los compuestos y las composiciones de la invención. Los compuestos y las las composiciones pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas aplicables descriptas en este documento, opcionalmente en combinación con técnicas estándares de síntesis orgánica. Muchas técnicas tales como eterificación y esterificación son bien conocidas en la técnica. Sin embargo, muchas de estas
30 técnicas están elaboradas en Compendium of Organic Synthetic Methods (John Wiley & Sons, New York), Vol. 1, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1971; Vol. 2, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1974; Vol. 3, Louis S. Hegedus and Leroy Wade, 1977; Vol. 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; Vol. 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; y Vol. 6; así como textos de referencia a la síntesis orgánica convencionales tales como March's Advanced Organic Chemistry:

Reactions, Mechanisms, and Structure, 5th Ed., de M. B. Smith y J. March (John Wiley & Sons, New York, 2001); Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. In 9 Volumes, Barry M. Trost, Editor-in-Chief (Pergamon Press, New York, 1993 printing); Advanced Organic Chemistry, Part B:

5 Reactions and Synthesis, Second Edition, Cary and Sundberg (1983);

Las fórmulas y los compuestos descriptos en este documento se pueden modificar usando grupos protectores. Los expertos en la técnica conocen grupos protectores de amino y carboxi adecuados (ver, por ejemplo, Protecting Groups in Organic Synthesis, Segunda Edición, Greene, T. W. y Wutz, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, y las referencias allí citadas; Philip J. Cocienski; Protecting Groups (Georg Tieme Verlag Stuttgart, New York, 1994), y referencias allí citadas); y Comprehensive Organic Transformations, Larock, R. C., Second Edition, John Wiley & Sons, New York (1999), y y referencias allí citadas.

Como se usa en este documento, el término "sustituido" o "sustituyente" pretende indicar que uno o más (por ejemplo, 1–20 en diversas formas de realización, 1–10 en otras formas de realización, 1, 2, 3, 4 o 5; en algunas formas de realización, 1, 2 o 3; y en otras formas de realización, 1 o 2) hidrógenos en el grupo indicado en la expresión que utiliza "sustituido" (o "sustituyente") se reemplazan con una selección de los uno o más grupos indicados, o con un grupo adecuado conocido por los expertos en la técnica, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo indicado y que la sustitución logre un compuesto estable. Los grupos indicados adecuados incluyen, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanilo, alcoxycarbonilo, amino, alquiloamino, dialquiloamino, trifluorometililo, difluorometilo, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxi, alquilotio, alquilosulfinilo, alquilosulfonilo y ciano. Además, ejemplos no limitantes de sustituyentes que pueden enlazarse a un átomo de carbono sustituido (u otro) incluyen F, Cl, Br, I, OR', OC(O)N(R')₂, CN, CF₃, OCF₃, R', O, S, C(O), S(O), metilendioxi, etilendioxi, N(R')₂, SR', SOR', SO₂R', SO₂N(R')₂, SO₃R', C(O)R', C(O)C(O)R', C(O)CH₂C(O)R', C(S)R', C(O)OR', OC(O)R', C(O)N(R')₂, OC(O)N(R')₂, C(S)N(R')₂, (CH₂)₀₋₂NHC(O)R', N(R')N(R')C(O)R', N(R')N(R')C(O)OR', N(R')N(R')CON(R')₂, N(R')SO₂R', N(R')SO₂N(R')₂, N(R')C(O)OR', N(R')C(O)R', N(R')C(S)R', N(R')C(O)N(R')₂, N(R')C(S)N(R')₂, N(COR')COR', N(OR')R', C(=NH)N(R')₂, C(O)N(OR')R', o C(=NOR')R', en donde R' puede ser hidrógeno o un resto a base de carbono, y en donde el resto a base de carbono puede en sí mismo estar adicionalmente sustituido. Cuando un sustituyente es monovalente, tal como, por ejemplo, F o Cl, este está enlazado al átomo que está

sustituyendo mediante un enlace único. Cuando un sustituyente es más que monovalente, tal como O, que es divalente, puede estar enlazado al átomo al que está sustituyendo por más de un enlace, es decir, un sustituyente divalente está enlazado por un doble enlace; por ejemplo, un C sustituido con O forma un grupo carbonilo, C = O, en donde C y O tienen doble enlace.

- 5 Alternativamente, un sustituyente divalente tal como O, S, C(O), S(O) o S(O)₂ se puede conectar mediante dos enlaces simples a dos átomos de carbono diferentes. Por ejemplo, O, un sustituyente divalente, puede enlazarse a cada uno de dos átomos de carbono adyacentes para proporcionar un grupo epóxido, o el O puede formar un grupo éter puente entre átomos de carbono adyacentes o no adyacentes, por ejemplo, puenteando los 1,4-carbonos de un
- 10 grupo ciclohexilo para formar un sistema[2.2.1]-oxabicyclo. Además, cualquier sustituyente puede unirse a un carbono u otro átomo mediante un enlazador, tal como (CH₂)_n o (CR'₂)_n donde n es 1, 2, 3 o más, y cada R 'se selecciona independientemente.

El término "halo" o "haluro" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo. De manera similar, el término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

- 15 El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo ramificado o no ramificado que tiene, por ejemplo, de 1 a 20 átomos de carbono y, con frecuencia, de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6 o 1 a 4 átomos de carbono. Como se usa en este documento, el término "alquilo" también abarca un "cicloalquilo", definido a continuación. Los ejemplos incluyen, sin limitación, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo (*iso*-propilo), 1-butilo, 2-metil-1-propilo (*isobutilo*), 2-
- 20 butilo (*sec*-butilo), 2-metil-2-propilo (*t*-butilo), 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo, y similares. El alquilo puede estar no sustituido o sustituido, por ejemplo, con un sustituyente
- 25 que se describe a continuación. El alquilo también puede estar opcionalmente parcial o totalmente insaturado. De este modo, la cita de un grupo alquilo puede incluir tanto grupos alqueno como alquino. El alquilo puede ser un radical hidrocarburo monovalente, como se describió y ejemplificó anteriormente, o puede ser un radical hidrocarburo divalente (es decir, un alquilenio).

- 30 El término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos de, por ejemplo, de 3 a 10 átomos de carbono que tienen un solo anillo cíclico o múltiples anillos condensados. Los grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo único tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similares, o estructuras de anillos múltiples tales como adamantilo y similares. El cicloalquilo puede estar sustituido o no

sustituido. El grupo cicloalquilo puede ser monovalente o divalente y puede estar opcionalmente sustituido como se describe para los grupos alquilo. El grupo cicloalquilo puede incluir opcionalmente uno o más sitios de insaturación; por ejemplo, el grupo cicloalquilo puede incluir uno o más dobles enlaces de carbono-carbono, tales como, por ejemplo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, y similares.

El término "heterocicloalquilo" o "heterociclilo" se refiere a un anillo monocíclico, bicíclico o policíclico saturado o parcialmente saturado que contiene por lo menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, azufre, oxígeno, preferentemente de 1 a 3 heteroátomos en por lo menos un anillo. Cada anillo tiene preferentemente de 3 a 10 miembros, más preferentemente de 4 a 7 miembros. Ejemplos de sustituyentes heterocicloalquilo adecuados incluyen pirrolidilo, tetrahidrofurilo, tetrahidrotiofurano, piperidilo, piperazilo, tetrahidropirano, morfolino, 1,3-diazapano, 1,4-diazapano, 1,4-oxazepano y 1,4-oxatiapano. El grupo puede ser un grupo terminal o un grupo de puente.

El término "aromático" se refiere o bien a un grupo o sustituyente arilo o heteroarilo descrito en el presente documento. Además, un resto aromático puede ser un resto bisaromático, un resto trisaromático, etc. Un resto bisaromático tiene un enlace único entre dos restos aromáticos tal como, pero sin limitación, bifenilo o bipyridina. De manera similar, un resto trisaromático tiene un enlace sencillo entre cada resto aromático.

El término "arilo" se refiere a un grupo hidrocarburo aromático derivado de la eliminación de por lo menos un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático original. El sitio de unión del radical puede estar en un átomo de carbono saturado o insaturado del sistema de anillo original. El grupo arilo puede tener de 6 a 30 átomos de carbono, por ejemplo, alrededor de 6 a 10 átomos de carbono. En otras formas de realización, el grupo arilo puede tener de 6 a 60 átomos de carbono, de 6 a 120 átomos de carbono o de 6 a 240 átomos de carbono. El grupo arilo puede tener un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (fusionados), en donde por lo menos un anillo es aromático (por ejemplo, naftilo, dihidrofenantrenilo, fluorenilo o antrilo). Los grupos arilo típicos incluyen, sin limitación, radicales derivados de benceno, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. El arilo puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido.

El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico que contiene uno, dos o tres anillos aromáticos y que contiene por lo menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo aromático. El heteroarilo puede estar no sustituido o sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular uno a tres, sustituyentes, como se describe en la definición

de "sustituido". Los grupos heteroarilo típicos contienen de 2 a 20 átomos de carbono en el esqueleto del anillo además de uno o más heteroátomos. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, 2H-pirrolilo, 3H-indolilo, 4H-quinolizínico, acridínico, benzo[b]tienilo, benzotiazolilo, β -carbolínico, carbazolilo, croménico, cinolínico, 5 dibenzo[b,d]furanilo, furazanilo, furilo, imidazolilo, imidizolilo, indazolilo, indolisínico, indolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftiridínico, oxazolilo, perimidínico, fenantridínico, fenantrolínico, fenarsazínico, fenazínico, fenotiazínico, fenoxatiínico, fenoxazínico, ftalazínico, pteridínico, purínico, piranilo, pirazínico, pirazolilo, piridazínico, piridilo, pirimidínico, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalínico, tiadiazolilo, 10 tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, tetrazolilo y xantenilo. En una forma de realización, el término "heteroarilo" denota un anillo aromático monocíclico que contiene 5 o 6 átomos de anillo que contienen carbono y 1, 2, 3, o 4 heteroátomos seleccionados de manera independiente de oxígeno no peróxido, azufre y N(Z), en donde Z está ausente o es H, O, alquilo, arilo, o (C₁–C₆)alquiloarilo. En algunas formas de realización, heteroarilo denota un heterociclo bicíclico 15 fusionado en orto de alrededor de ocho a diez átomos en el anillo derivado del mismo, particularmente un derivado benc o uno derivado de la fusión de un dirradical de propileno, trimetileno o tetrametileno.

El término "enriquecido enantioméricamente" ("ee") como se usa en este documento se refiere a mezclas que tienen un enantiómero presente en mayor medida que otro. Las 20 reacciones que proporcionan un enantiómero presente en mayor medida que otro serían, por lo tanto, "enantioselectivas" (o demostrarían "enantioselectividad"). En una forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 2% de ee; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por 25 lo menos alrededor de 5% de ee; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 20%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 50%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se 30 refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 80%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 90%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 95%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido

enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 98%; en otra forma de realización de la invención, el término "enriquecido enantioméricamente" se refiere a una mezcla que tiene por lo menos alrededor de 99%. El término "enriquecido enantioméricamente" incluye mezclas enantioméricamente puras que son mezclas que están
 5 sustancialmente libres de las especies de la actividad óptica opuesta o donde un enantiómero está presente en cantidades muy bajas, por ejemplo, 0,01%, 0,001% o 0,0001%.

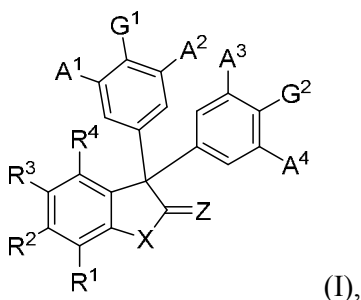
El término "IC₅₀" se define generalmente como la concentración requerida para destruir el 50% de las células en 24 horas.

A lo largo de esta descripción, el término "(–)-105", que se refiere al enantiómero
 10 levogiratorio del compuesto 105, y puede usarse indistintamente con los términos C(–)-105, (–)-1, (R)-105, (R)-1, o SERK-F6. De manera similar, (+)-105 es el enantiómero dextrorrotatorio, también conocido como (S)-105, (S)-1 o (+)-1. Además, el término "(±)-105", que se refiere al racemato del compuesto 105, se puede usar indistintamente con el término (±)-1.

15

Formas de realización de la invención.

Esta divulgación proporciona diversas formas de realización de un compuesto de Fórmula I:



20 o una de sus sales o solvatos; en donde

R¹, R², R³ y R⁴ son cada uno de manera independiente H, halo, –OR^A, –SR^A, –N(R^A)₂, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo;

A¹, A², A³ y A⁴ son cada uno de manera independiente H, halo, o alquilo;

G¹ es halo, –OR^B, –SR^B, –S(=O)₂R^B, o alquilo;

25 G² es halo, –OR^C, –SR^C, –S(=O)₂R^C, o alquilo;

X y Z son cada uno de manera independiente O, S, o –NR^D; y

R^A, R^B, R^C y R^D son cada uno de manera independiente H o alquilo, en donde, cuando están presentes, –OR^B y –OR^C no son ambos –OH;

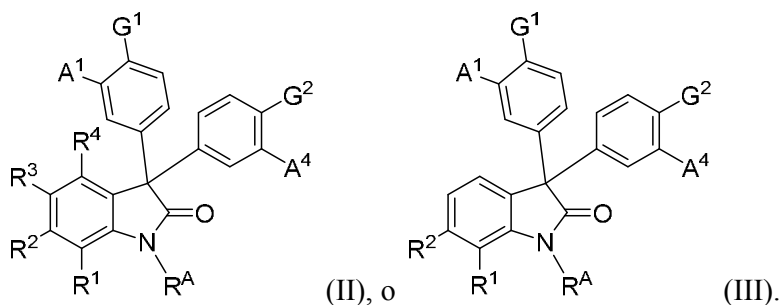
en donde cada alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

En diversas formas de realización de las Fórmulas I–IV que se describen aquí, R⁵ es un sustituyente en la posición *orto* a A¹. En diversas formas de realización, R⁶ es un sustituyente en la posición *orto* a A². En diversas formas de realización, R⁷ es un sustituyente en la posición *orto* a A³. En diversas formas de realización, R⁸ es un sustituyente en la posición *orto* a A⁴. En diversas formas de realización, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno de manera independiente H, halo, –OR^A, –SR^A, –N(R^A)₂, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo.

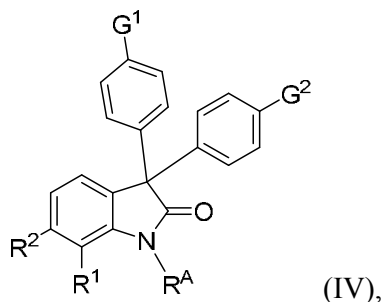
En algunas formas de realización, el compuesto es el enantiómero (*S*). En otras formas de realización, el compuesto es el enantiómero (*R*). En formas de realización adicionales, R^A, R^B, R^C y R^D son cada uno de manera independiente H o –(C₁–C₆)alquilo, y R¹, R², R³ y R⁴ son cada uno de manera independiente H, halo, o –(C₁–C₆)alquilo. En algunas otras formas de realización, A¹, A², A³ y A⁴ son cada uno de manera independiente H o halo, y G¹ es –OR^B. En formas de realización adicionales, X es –NR^D y Z es O. En formas de realización adicionales, R^A, R^B, R^C, R^D, R¹, R², R³ y R⁴ son cada uno de manera independiente –(C₂–C₆)alquilo, –(C₃–C₆)alquilo, o –(C₃–C₆)cicloalquilo.

En diversas formas de realización adicionales, R¹ es CH₃, CH₂CH₃, CF₃, CHF₂, CH₂CF₃, CF₂CH₃, o CF₂CF₃. En aún otras formas de realización adicionales, G¹ es –OR^B, y R^B es H, CH₃, CH₂CH₃, CF₃, CHF₂, CH₂CF₃, CF₂CH₃, o CF₂CF₃.

En formas de realización adicionales, el compuesto es un compuesto de Fórmula II o Fórmula (III):



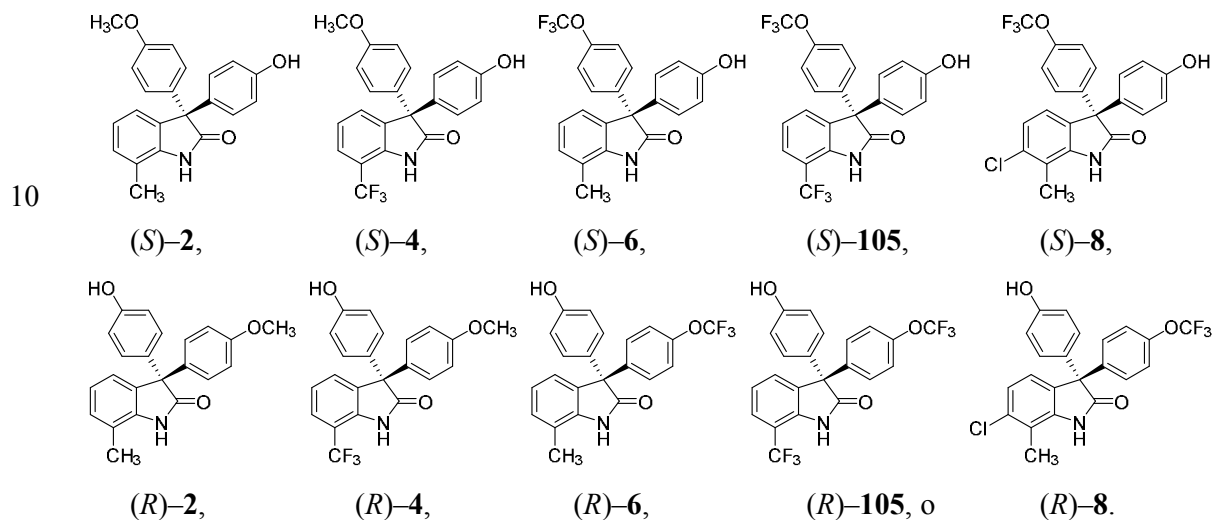
En algunas otras formas de realización, el compuesto es un compuesto de Fórmula IV:



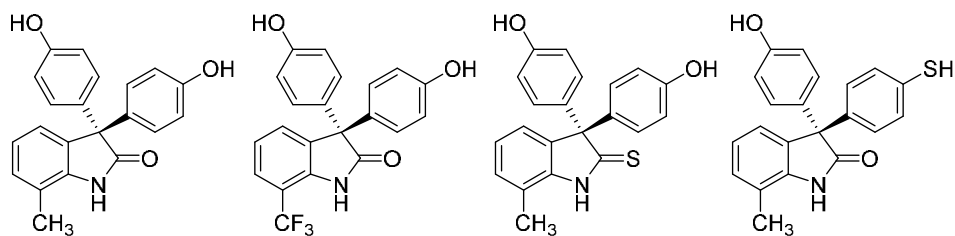
en donde G^1 es $-OR^B$, y R^B y R^1 son cada uno de manera independiente alquilo o cicloalquilo, en donde el alquilo y cicloalquilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos halo.

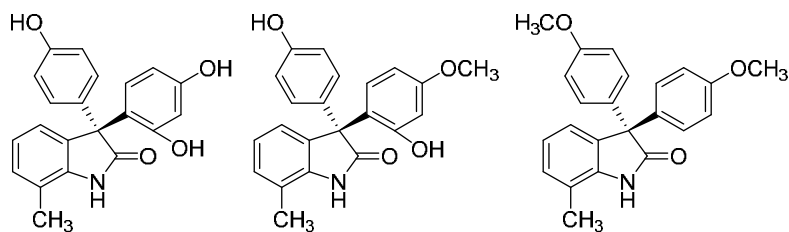
5 En diversas otras formas de realización, uno o más átomos de hidrógeno son deuterio o tritio, uno o más átomos de carbono son un isótopo de carbono, o una de sus combinaciones.

En aún otras formas de realización, el compuesto es cualquiera de los compuestos (*S*)- o (*R*)-**2**, **4**, **6**, **8** o **105**:



15 En formas de realización adicionales, el compuesto es cualquiera de los compuestos que se muestran:





o uno de sus enantiómeros.

En algunas formas de realización adicionales, el compuesto es levorogiratorio. En otras formas de realización, el compuesto es dextrorogiratorio. En otras formas de realización, el compuesto es (*R*)-105 o (*S*)-105. En aún otras formas de realización, el compuesto es (*R*)-105.

En otras formas de realización adicionales, el compuesto (un enantiómero o racemato) tiene una afinidad de unión para el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), y el valor de IC_{50} de la afinidad de unión es inferior a alrededor de 500 nM. En otras formas de realización, el valor de IC_{50} para $ER\alpha$ es alrededor de 1 pM a alrededor de 1000 nM, alrededor de 0,1 nM a alrededor de 750 nM, alrededor de 1 nM a alrededor de 250 nM, alrededor de 5 nM a alrededor de 500 nM, o alrededor de 10 nM a alrededor de 5000 nM. En diversas otras formas de realización, el compuesto destruye o inhibe el crecimiento de células cancerosas por hiperactivación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático. En formas de realización adicionales, las células cancerosas son células de cáncer $ER\alpha$ positivas. En algunas otras formas de realización, las células de cáncer son células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario o células de cáncer de endometrio.

Esta divulgación también proporciona una composición que comprende el compuesto descrito en este documento y un segundo fármaco. La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto en combinación con un diluyente, portador, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización de la composición farmacéutica, el compuesto es una mezcla racémica de (*R*)-105 y (*S*)-105. En diversas formas de realización, una mezcla racémica de un compuesto es una mezcla de enantiómeros en la que la mezcla de enantiómeros tiene una relación de alrededor de 50:50, alrededor de 45:55, alrededor de 40:60, alrededor de 30:70, alrededor de 20:80, alrededor de 10:90, o alrededor de 5:95.

La divulgación proporciona adicionalmente un método para tratar un cáncer que comprende administrar a un sujeto con cáncer $ER\alpha$ positivo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, de modo de tratar así el cáncer en el sujeto. En formas de realización adicionales, el compuesto mata o inhibe el crecimiento de cáncer $ER\alpha$

positivo por hiperactivación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático. En otras formas de realización, el compuesto es una mezcla racémica de (*R*)-**105** y (*S*)-**105**. En otras formas de realización, el cáncer ER α positivo es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, carcinoma de cuello uterino o cáncer de endometrio.

La divulgación proporciona adicionalmente el uso del compuesto para el tratamiento de una enfermedad ER α positiva en un sujeto que lo necesita, en donde se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, de modo de tratar así el cáncer en el sujeto. En diversas formas de realización, la enfermedad ER α positiva es un cáncer ER α positivo. En otras formas de realización, el cáncer ER α positivo es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, carcinoma de cuello uterino o cáncer de endometrio. En formas de realización adicionales, el compuesto se administra por vía oral, por inyección, por vía subcutánea, sublingual, por vía rectal, por infusión, por vía intravenosa, por absorción dérmica, o a través de una cavidad o un orificio corporal.

Esta descripción proporciona rangos, límites y desviaciones de variables tales como volumen, masa, porcentajes, relaciones, etc. Un experto en la técnica entiende que un rango, tal como "número 1" a "número 2", implica un rango continuo de números que incluye números enteros y números fraccionarios. Por ejemplo, 1 a 10 significa 1, 2, 3, 4, 5, ... 9, 10. También significa 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, ..., 9,8, 9,9, 10,0 y también significa 1,01, 1,02, 1,03, etc. Si la variable revelada es un número menor que "número 10", implica un rango continuo que incluye números enteros y números fraccionarios menores que el número 10, como se discutió anteriormente. De manera similar, si la variable revelada es un número mayor que "número 10", implica un rango continuo que incluye números enteros y números fraccionarios mayores que el número 10. Estos rangos pueden modificarse mediante el término "alrededor de", cuyo significado se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión.

El sistema de edición de genes CRISPR/Cas9 se usó para reemplazar ER α de tipo salvaje en células de cáncer de mama humano T47D con las dos mutaciones de ER α más comunes observadas en el cáncer de mama metastásico, ER α Y537S y ER α D538G. Las líneas celulares resultantes TYS-4 (también denominada TYS) y TDG-1 (también denominada TDG) (T47DER α Y537S clon 4 y T47DER α D538G clon 1) exhiben significativa resistencia a tamoxifeno (la forma activa de tamoxifeno es *z*-4-hidroxitamoxifeno; *z*-OHT) y a fulvestrant/ICI. (Mao et al., 2016).

Para permitir la visualización de tumores que albergan estas mutaciones en animales vivos, se aislaron líneas clonales de células TYS y TDG que expresan de manera estable luciferasa de luciérnaga. Los tumores de ratón ortotópicos que contienen estas células TYS–Luc y TYDG–Luc se visualizan en animales vivos mediante imágenes bioluminiscentes (BLI, conforme a sus siglas en inglés). Debido a que el sistema de imágenes in vivo (IVIS, conforme a sus siglas en inglés) tiene un rango de detección de más de 10.000 veces y se puede usar para visualizar la progresión tanto de tumores primarios como de tumores metastásicos, el uso de BLI con IVIS se considera la forma más avanzada de evaluar la eficacia de nuevos fármacos antineoplásicos en modelos animales. Ningún otro equipo de investigación de una universidad, empresa farmacéutica o de biotecnología ha desarrollado líneas celulares que combinen la expresión de las mutaciones ER α de cáncer de mama y la luciferasa para BLI.

Se utilizó un cribado imparcial de alto rendimiento para moléculas pequeñas que bloquean la acción de ER α , a fin de identificar nuevos biomoduladores de ER α . BHPI fue la molécula pequeña líder de primera generación que surgió de esa búsqueda. BHPI es un potente biomodulador de ER α de molécula pequeña no competitivo, el primero en su clase, que destruye las células de cáncer de mama y endometrio ER α positivas resistentes a la terapia y bloquea el crecimiento de las células de cáncer de ovario. BHPI se une en un sitio diferente en ER α que el tamoxifeno y fulvestrant, y tiene un mecanismo de acción diferente. Se demostró que BHPI funciona a través de ER α para inducir una hiperactivación letal persistente de la vía anticipatoria de activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). En los modelos de cultivo celular, BHPI bloquea selectivamente el crecimiento y, con frecuencia, destruye las células cancerosas de mama, ovario y endometrio resistentes a la terapia. En particular, BHPI bloqueó la proliferación de las células TYS y TDG que expresan mutaciones ER α identificadas en el cáncer de mama metastásico.

En un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de mama ER α positivo, en dosis razonables, BHPI detuvo el crecimiento tumoral e indujo una regresión tumoral rápida y sustancial.

En estudios de xenoinjerto que utilizaron células TYS–Luc y TDG–Luc después de 4 semanas, los tumores de mama de control con vehículo se habían aproximadamente cuádruplicado en las células. Por el contrario, los tumores en ratones tratados con BHPI mostraron una regresión del 97% al 99,5%.

En un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario ortotópico utilizando células OVCAR–3, que son altamente resistentes a diversos fármacos contra el cáncer, el taxano

paclitaxel fue ineficaz. BHPI único redujo fuertemente el crecimiento tumoral. En particular, los tumores fueron indetectables en ratones tratados con BHPI más paclitaxel, y los niveles del biomarcador de cáncer circulante CA125 disminuyeron progresivamente a indetectables. En ambos estudios, la BHPI fue bien tolerada por los ratones.

5

Nuevos compuestos con capacidad superior para destruir células de cáncer de mama resistentes a la terapia.

A través de la síntesis y evaluación, se identificaron nuevos compuestos que son superiores a BHPI en su capacidad para destruir células de cáncer de mama resistentes a la
10 terapia. Comparado con BHPI, el compuesto principal de este grupo, el C-105, exhibe una potencia y eficacia superiores.

Se desarrollaron ensayos para compuestos con una capacidad mejorada para destruir células cancerosas. Uno de los ensayos se sustenta en el criterio clásico de la muerte celular, pérdida de la integridad de la membrana medida por la captación del colorante azul tripán.
15 Este es un ensayo sobre la base de instrumentos que determina el porcentaje de células en una población que ha absorbido azul tripán. Todas las células que han absorbido azul tripán están muertas. Este nuevo ensayo es exclusivo del flujo de trabajo de detección descripto. Aunque la absorción de azul tripán se acepta universalmente como una medida de la muerte celular, otros no lo han utilizado para probar fármacos potenciales contra el cáncer. Los ensayos
20 adicionales utilizados para evaluar la muerte celular incluyen la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, conforme a sus siglas en inglés) y los ensayos sobre la base de la inhibición de la proliferación y la determinación del número de células, a veces, junto con raptinal, un compuesto conocido por inducir el 100% de la muerte celular.

A través de la síntesis, se obtuvieron moléculas pequeñas que contienen una
25 característica estructural novedosa que imparte resultados sorprendentes. En comparación con BHPI, la molécula pequeña principal, C-105, exhibe una potencia y eficacia muy superiores. En particular, a diferencia de BHPI, el enantiómero activo (–) de C-105 mató al 100% de las células TYS–Luc en un experimento de cultivo celular a largo plazo.

Además, los fármacos de terapia endocrina actuales tamoxifeno y fulvestrant son
30 citostáticos, y no mostraron ninguna capacidad para destruir las células de cáncer de mama TYS y TDG. Demostrando la especificidad del objetivo, incluso en concentraciones más de 10 veces superiores a las que matan eficazmente las células de cáncer de mama ER α positivas, C-105 no tuvo ningún efecto en varias líneas celulares ER α negativas. Asimismo,

el enantiómero inactivo (+) fue ineficaz y no tóxico en líneas celulares ER α positivas y ER α negativas.

En particular, en un xenoinjerto de ratón, después de la administración de (–) C–105 activo durante solo 3 días, los tumores se destruyeron. Usando BLI para visualizar los tumores, 4 de los 5 tumores se redujeron (retrocedieron) en más del 99,9%, y los cinco se redujeron en más del 99%. Usando calibradores, en siete días, los 5 tumores se habían reducido a un tamaño indetectable. Después de tres semanas, el tumor en un ratón desapareció por completo (regresión completa –100%), y los tumores en 3 de los 4 ratones restantes se redujeron en más del 99,9%. En una prueba de larga duración de si las señales restantes se deben a células tumorales muertas o inactivas, o si las células tumorales volverán a crecer, después de suspender el tratamiento y esperar 4 semanas, el único tumor que desapareció por completo (regresión completa –100%) permaneció en – 100%, y NO HUBO NUEVO CRECIMIENTO DE "MICROTUMOR" en los otros ratones. Esta es una respuesta sin precedentes.

Mecanismo de acción de –105: Las acciones de –105 incluyen, sin limitación, inducir la hiperactivación letal del sensor de estrés del retículo endoplasmático, la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). El sensor de estrés del retículo endoplasmático (EnR) y la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) equilibra la síntesis de nuevas proteínas con la disponibilidad de chaperonas y otras proteínas que ayudan a plegar y transportar proteínas dentro de las células. La vía de UPR anticipatoria se activa en ausencia de proteínas desplegadas, y anticipa las necesidades futuras de nueva capacidad de plegamiento de proteínas (**Figura 32**).

Para inducir la hiperactivación letal de la respuesta a proteínas desplegadas, –105 se une a ER α en las células cancerosas. Esto conduce a la activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ). PLC γ activada produce enzimáticamente inositol trifosfato (IP $_3$). El IP $_3$ se une y abre los canales de calcio del receptor IP $_3$ del retículo endoplasmático en el EnR. La apertura de los canales de calcio de IP $_3$ R produce una salida muy rápida de calcio almacenado en el lumen (interior) del retículo endoplasmático hacia el cuerpo celular. Esto hiperactiva la UPR. Cuando se activa, un brazo de la UPR, el brazo PERK, inhibe la síntesis de proteínas. La activación de otro brazo de la UPR, IRE1 α , induce la formación del corte y empalme activo del ARNm que codifica el factor de transcripción XBP–1 (spXBP–1). Para restaurar la homeostasis del calcio, potentes bombas SERCA en la membrana del retículo endoplasmático llevan a cabo un bombeo de calcio dependiente de ATP desde el cuerpo celular hacia el interior del EnR. Debido a que los canales de calcio de IP $_3$ R permanecen abiertos, el calcio

bombeado al lumen del EnR vuelve a salir. Esto crea un ciclo inútil que agota el ATP intracelular.

Marcadores e inhibidores de la UPR: La formación de ARNm de spXBP-1 se utiliza como marcador para la activación de la UPR. La molécula pequeña 2-APB ampliamente
5 utilizada bloquea los IP₃R cerrados y previene el flujo de calcio y la hiperactivación de la UPR. La taspigargina de molécula pequeña (THG) inhibe de forma potente las bombas SERCA y evita que la célula agote sus reservas de ATP.

En un estudio de tumor de ratón de tratamiento y controlado por vehículo, se diseñaron células de cáncer de mama humano para contener tanto la mutación letal
10 ER α Y537S que se encuentra en el cáncer de mama metastásico, como el gen de la luciferasa de luciérnaga; cuando se agrega la sustancia química adecuada, la luciferasa de luciérnaga rompe la sustancia química, y se produce luz. Usando un detector sensible llamado sistema de imágenes, esto nos permite obtener imágenes de los tumores dentro de ratones vivos. Esto se llama imágenes bioluminiscentes, o BLI. Se dejó que se formaran grandes tumores. Luego se
15 inyectó (–)105 diariamente debajo de la piel durante tres semanas. Utilizando el sistema de imágenes, se controló el efecto de (–)105 sobre los tumores. Al mismo tiempo, también se controló el efecto del vehículo en el que se disolvió (–)105 sobre los tumores. Estos tumores se trataron de manera idéntica, excepto que no recibieron el fármaco de prueba (–)105.

La imagen de la **Figura 17** muestra uno de los tumores de control inyectado con
20 vehículo al final del estudio en una comparación lado a lado con 4 de los 5 ratones tratados con (–)105 (el generador de imágenes solo puede fotografiar 5 ratones a la vez). La Tabla 1 muestra la luz emitida por los tumores. En un xenoinjerto de ratón, (–)105 induce una regresión rápida y profunda de grandes tumores de mama resistentes a la terapia. Aunque los tumores de la **Figura 17** no pueden observarse visualmente, al aumentar en gran medida el
25 tiempo de exposición y la sensibilidad, se pueden obtener imágenes de pequeñas cantidades de células emisoras de luz en los ratones tratados (**Figura 34**).

Se realizó un estudio para determinar qué sucede después de suspender el tratamiento con (–)105 (Tabla 2). El estudio fue diseñado para mostrar si los microtumores
30 permanecerían inactivos, o si volverían a crecer. Al final del tratamiento de tres semanas, hay material residual que emite una pequeña cantidad de luz que se denominan "microtumores". Sobre la base de la sensibilidad del sistema de imágenes, se cree que estos microtumores contienen entre 0 y ~ 1000 células cancerosas; los microtumores no serán visibles a simple vista. Verlos requiere un potente sistema de imágenes o un microscopio. Para evaluar si estas células están muertas, o ya no se dividen y están latentes, se tomaron imágenes de las células

dos y cuatro semanas después de que dejaron de recibir cualquier tratamiento. Este estudio evaluó si se han erradicado las células cancerosas en crecimiento; este estudio continúa.

Las imágenes bioluminiscentes (BLI) que utilizan luciferasa muestran la casi erradicación de los tumores de mama resistentes a la terapia, en ratones en las imágenes de lado a lado de un ratón de control inyectado con vehículo y 4 de 5 ratones tratados con (–)–105 (**Figura 17**). En un estudio de 3 semanas, los tumores de mama grandes estaban presentes al inicio del tratamiento y retrocedieron como se muestra en la imagen de la **Figura 17**. El estudio se realizó usando TYS–Luc ortotópico (células inyectadas: células de cáncer de mama humano T47DER α Y537–Luc), p. ej., la mutación ER α más letal en humanos en cáncer de mama metastásico. Los tumores se desarrollaron en ratones NSG. En los Ejemplos se proporcionan más detalles.

Tabla 1. Evaluación de (–)–105 en tumores de xenoinjerto de ratón ortotópico usando imágenes bioluminiscentes (BLI) de tumores de mama que expresan la mutación letal ER α Y537S observada en cáncer de mama metastásico.

Grupo	Ratón	Día 0 Flujo (millones de fotones/seg)	Día 3 Flujo (millones de fotones/s)	Día 3 % Cambio en flujo de tumor	Día 7 Flujo (millones de fotones/s)	Día 7 % Cambio en flujo de tumor	Día 14 Flujo (millones de fotones/s)	Día 14 % Cambio en flujo de tumor	Día 21 Flujo (millones de fotones/s)	Día 21 % Cambio en flujo de tumor
Vehículo	126	182	356	+196	168	–8	270	+148	451	+247
Vehículo	146	409	462	+113	338	–17	374	–9	382	–7
Vehículo	148	49.7	159	+318	122	+244	116	+232	348	+700
Vehículo	149	201	314	+157	238	+118	296	+147	206	+102
Vehículo	150	1250	2320	+186	3040	+243	2710	+217	3460	+277

Grupo	Ratón	Día 0 Flujo (millones de fotones/seg)	Día 3 Flujo (millones de fotones/s)	Día 3 % Cambio en flujo de tumor	Día 7 Flujo (millones de fotones/s)	Día 7 % Cambio en flujo de tumor	Día 14 Flujo (millones de fotones/s)	Día 14 % Cambio en flujo de tumor	Día 21 Flujo (millones de fotones/s)	Día 21 % Cambio en flujo de tumor
(–)–105	127	2130	0,22	–99,99	0,082	–99,996	0,246	–99,99	0,051	–99,998
(–)–105	128	277	0,043	–99,98	0,041	–99,99	0,039	–99,99	0,16	–99,94
(–)–105	131	72,6	0,40	–99,45	0,17	–99,77	0,245	–99,66	0,14	–99,81
(–)–105	134	1880	0,29	–99,98	0,059	–99,996	0	–100	0	–100
(–)–105	147	1650	0,17	–99,99	0,18	–99,99	0,071	–99,996	0,046	–99,997

El sistema de imágenes utilizado para el estudio es más sensible y capaz de captar pequeñas cantidades de células tumorales que los sistemas de

5 medición estándares, tales como calibradores que miden el tamaño del tumor, o pesar los tumores después de disecarlos de los ratones.

Tabla 2. Sin nuevo crecimiento de microtumores 4 semanas después de detener el tratamiento de (–)–105.

Grupo	Ratón	Flujo de recuperación inicio (millones de fotones/seg)	Inicio sin fármaco: % cambio en flujo de tumor	Semana 2 Sin fármaco Flujo de tumor (millones de fotones/seg)	Semana 2 Sin fármaco % Cambio en flujo de tumor	Semana 4 Sin fármaco Flujo de tumor (millones de fotones/seg)	Semana 4 Sin fármaco % Cambio en flujo de tumor
(–)–105	127	0,051	–,99,997	0,17	–99,991	0,038	–99,998
(–)–105	128	0,16	–99,94	0,13	–99,95	0,038	–99,98
(–)–105	131	0,14	–99,81	0,11	–99,84	0,084	–99,88
(–)–105	134	0	–100	0	–100	0	–100
(–)–105	147	0,046	–99,997	0	–100	0,048	–99,997

Los hallazgos clave de los estudios mostraron lo siguiente:

- 5 (a) (–)–105 destruyó los tumores de manera rápida y drástica. Después de solo tres días, los tumores en los 5 ratones se redujeron o retrocedieron en más del 99%. Cuatro de los cinco tumores se redujeron en más del 99,9%.
- (b) Al final del estudio de tres semanas, no había tumor detectable en un ratón (el tumor fue erradicado; –100%), los tumores en los otros cuatro ratones estaban casi erradicados, con dos de ellos muy cerca del límite que puede detectar el sistema de imágenes.
- 10 (c) Dos semanas después de la interrupción del tratamiento, los microtumores no habían comenzado a crecer nuevamente. Dos de los cinco ratones no tenían tumores detectables (el tumor fue erradicado; –100%); dos bajaron muy levemente, y uno subió muy levemente.
- 15 (d) En general, los tumores tratados con vehículo de control continuaron creciendo. Por lo tanto, la drástica regresión del tumor que se observó se debe a la administración del fármaco de prueba (–)–105.
- (e) Usando calibradores para medir el tamaño del tumor, los tumores en los 5 ratones se habían reducido (retrocedido) hasta indetectables después de solo 3 días de tratamiento con (–)–105.
- 20 (f) En general, la salud de los ratones tratados con (–)–105 fue buena. Sin toxicidad.

Métodos sintéticos generales.

- 25 La invención también se refiere a métodos para preparar los compuestos y las composiciones de la invención. Los compuestos y las composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas aplicables de síntesis orgánica, por ejemplo, las técnicas descriptas en este documento. Muchas de estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Sin

embargo, muchas de las técnicas conocidas se elaboran en *Compendium of Organic Synthetic Methods* (John Wiley & Sons, New York), Vol. 1, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1971; Vol. 2, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1974; Vol. 3, Louis S. Hegedus and Leroy Wade, 1977; Vol. 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; Vol. 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; y
5 Vol. 6, Michael B. Smith; así como en textos de referencia orgánica estándares tales como *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th Ed., de M. B. Smith y J. March (John Wiley & Sons, New York, 2001), *Comprehensive Organic Synthesis; Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry*, en 9 Volúmenes, Barry M. Trost, Ed.-in-Chief (Pergamon Press, New York, impresión 1993); *Advanced*
10 *Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, Second Edition*, Cary and Sundberg (1983); *Protecting Groups in Organic Synthesis, Second Edition*, Greene, T. W., y Wutz, P. G. M., John Wiley & Sons, New York; y *Comprehensive Organic Transformations*, Larock, R. C., Second Edition, John Wiley & Sons, New York (1999).

A continuación se proporcionan varios métodos ejemplares para la preparación de los
15 compuestos de la invención. Estos métodos pretenden ilustrar la naturaleza de tales preparaciones, y no pretenden limitar el alcance de los métodos aplicables.

Generalmente, las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo de reacción, solventes, procedimientos de trabajo y similares, serán las habituales en la técnica para la reacción particular por realizar. El material de referencia citado, junto con el material
20 allí citado, contiene descripciones detalladas de tales condiciones. Típicamente, las temperaturas serán de -100°C a 200°C , los solventes serán apróticos o próticos según las condiciones requeridas, y los tiempos de reacción serán de 1 minuto a 10 días. El trabajo consiste típicamente en apagar los reactivos que no han reaccionado seguido de una partición entre un sistema de capa orgánica/agua (extracción) y la separación de la capa que contiene el
25 producto.

Las reacciones de oxidación y reducción se llevan a cabo típicamente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (alrededor de 20°C), aunque para las reducciones de hidruro metálico, con frecuencia la temperatura se reduce a 0°C a -100°C . También se puede usar calentamiento cuando sea apropiado. Los solventes son típicamente apróticos para las
30 reducciones, y pueden ser próticos o apróticos para las oxidaciones. Los tiempos de reacción se ajustan para lograr las conversiones deseadas.

Las reacciones de condensación se llevan a cabo típicamente a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, aunque para las condensaciones controladas cinéticamente que no se equilibran, también son comunes las temperaturas reducidas (0°C a -100°C). Los

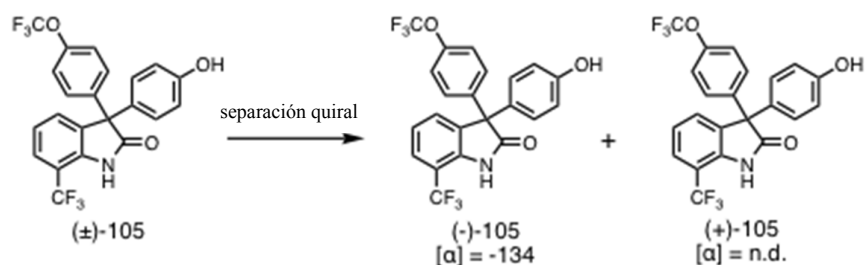
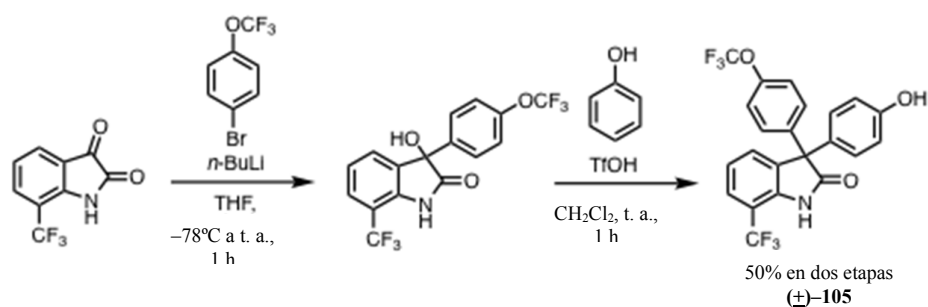
solventes pueden ser próticos (habituales en reacciones de equilibrio) o apróticos (habituales en reacciones controladas cinéticamente). Las técnicas sintéticas estándares tales como la eliminación azeotrópica de los subproductos de la reacción y el uso de condiciones de reacción anhidras (por ejemplo, entornos de gas inerte) son comunes en la técnica, y se aplicarán cuando corresponda.

Grupos protectores. El término "grupo protector" se refiere a cualquier grupo que, cuando se une a un hidroxilo u otro heteroátomo, evita que se produzcan reacciones no deseadas en este grupo, y puede eliminarse mediante etapas químicas o enzimáticas convencionales para restablecer el grupo hidroxilo. El grupo protector removible particular empleado no siempre es crítico, y los grupos bloqueantes de hidroxilo removibles preferidos incluyen sustituyentes convencionales tales como, por ejemplo, alilo, bencilo, acetilo, cloroacetilo, tiobencilo, bencilideno, fenacilo, metil metoxi, silil éteres (por ejemplo, trimetilsililo (TMS), t-butil-difenilsililo (TBDPS), o t-butildimetilsililo (TBS)) y cualquier otro grupo que pueda introducirse químicamente en una funcionalidad hidroxilo, y luego, eliminarse selectivamente por métodos químicos o enzimáticos en condiciones leves compatibles con la naturaleza de el producto.

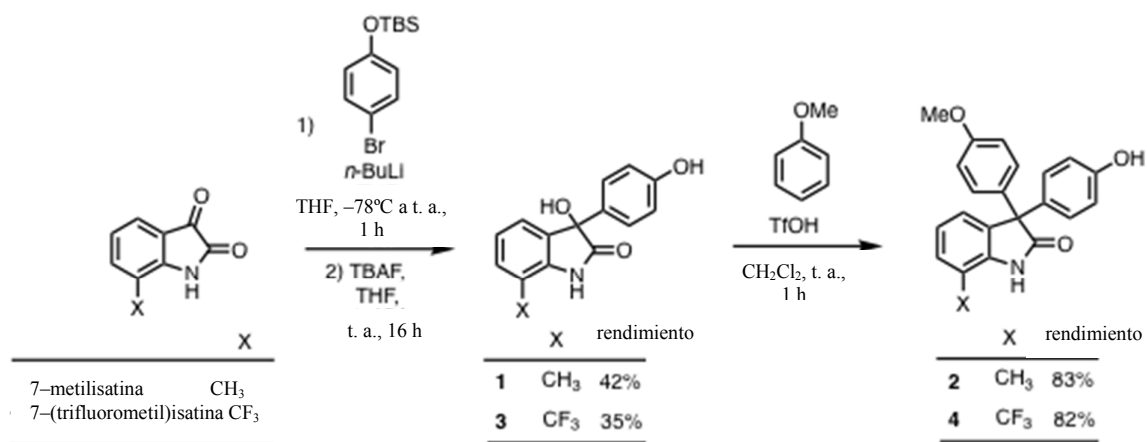
Los expertos en la técnica conocen grupos protectores de hidroxilo adecuados, que se describen con más detalle en T. W. Greene, *Protecting Groups In Organic Synthesis*; Wiley: New York, 1981 ("Greene") y las referencias allí citadas; y Cocienski, Philip J.; *Protecting Groups* (Georg Tieme Verlag Stuttgart, New York, 1994), ambos, incorporados en la presente memoria por referencia.

Los grupos protectores están disponibles, se conocen y se usan comúnmente, y se usan opcionalmente para prevenir reacciones secundarias con el grupo protegido durante los procedimientos sintéticos, es decir, vías o métodos para preparar los compuestos mediante los métodos de la invención. En su mayor parte, la decisión sobre qué grupos proteger, cuándo hacerlo y la naturaleza del grupo protector químico "PG" dependerá de la química de la reacción contra la que se protegerá (p. ej., ácida, básica, oxidativa, reductora u otras condiciones) y la dirección prevista de la síntesis.

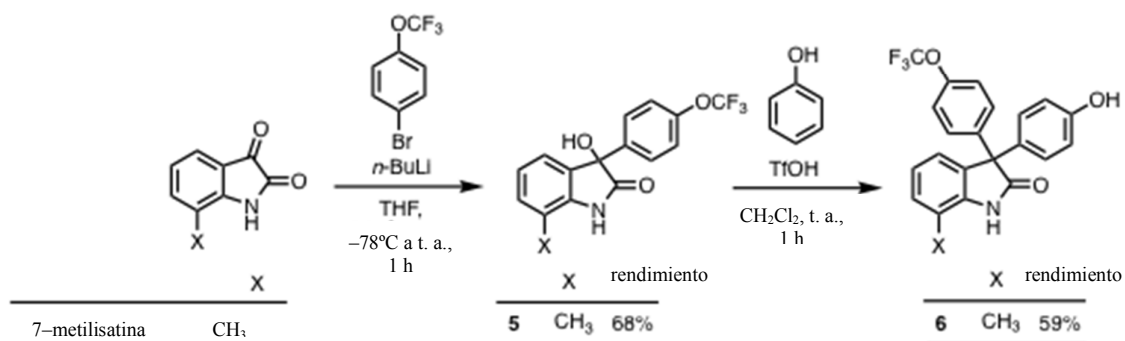
Esquema 1. Síntesis de (+) 105 y (–) 105.



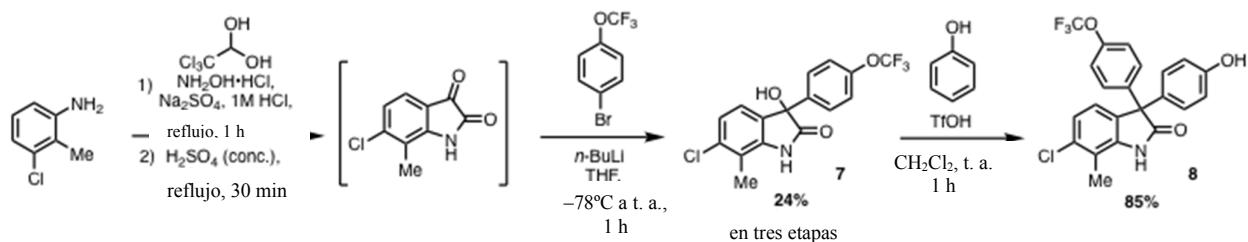
Esquema 2. Ruta sintética general para la síntesis de compuestos 1–6.



*rendimientos dos etapas



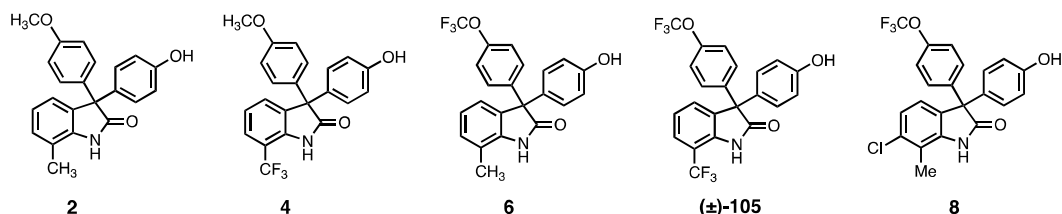
Esquema 3. Síntesis de compuestos 7 y 8.



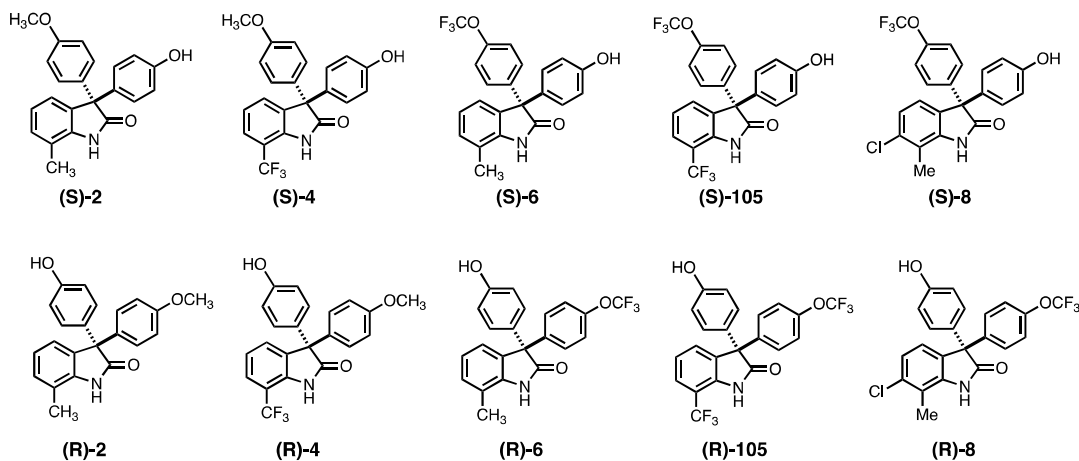
Los **Esquemas 1–3** muestran la síntesis general de los compuestos aquí divulgados, tales como los compuestos en el **Esquema 4**. Las condiciones experimentales detalladas se proporcionan en los Ejemplos.

Esquema 4. Estructuras de compuestos sintetizados preparados por los Esquemas 1–3.

Racémicos



Enantiómeros



10

Base de los ensayos para la destrucción de células cancerosas.

AZUL TRIPÁN: Durante décadas, las células viables se han medido por su capacidad para excluir el tinte azul tripán. Las células con membranas intactas no absorben azul tripán. Las células muertas, que han perdido la integridad de la membrana, absorben el tinte y son azules. Por lo tanto, el porcentaje de células muertas es el porcentaje de células que son

15

positivas para azul tripán de la población celular total. La evaluación cuantitativa de la absorción de azul tripán utiliza un contador celular de Fisher. Dado que el ensayo es sobre la base de un instrumento, no hay sesgo del observador en la determinación del porcentaje de células positivas para azul tripán.

5 ENSAYO DE AZUL ALAMAR/RAPTINAL: Las células vivas mantienen un ambiente reductor. El ingrediente no fluorescente permeable a las células de Alamar Blue® (resazurina) es absorbido por las células. En las células vivas, se reduce al compuesto fluorescente resorufina. Utilizando una curva estándar de número de células frente a la fluorescencia, se puede determinar el número de células vivas en una muestra de prueba. En
10 altas concentraciones, el raptinal mata el 100% de las células. El vehículo en el que se disuelve el compuesto de prueba no es tóxico. Por lo tanto, después de sustraer el blanco para el medio solo, la lectura de fluorescencia para el vehículo corresponde al 100% de las células viables, y la señal para raptinal corresponde al 0% de las células viables. Si bien este ensayo proporciona una medición menos directa de la muerte celular que el ensayo de azul tripán, es
15 ampliado más fácilmente a un gran número de muestras.

 CITOMETRÍA DE FLUJO (FITC): las células moribundas exhiben cambios específicos que pueden ser monitoreados usando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS, conforme a sus siglas en inglés). Uno de esos cambios es la pérdida de polaridad de la membrana plasmática. Esto se monitorea utilizando anexina V. Las células
20 moribundas también absorben el tinte yoduro de propidio. El yoduro de propidio (PI) emite fluorescencia cuando se intercala en el ADN. Estos ensayos monitorean las células en etapas específicas de la muerte celular. Por ejemplo, las células que están muertas y cuyo ADN ha sido destruido y está en trozos tan pequeños que ya no absorben PI están muertas, pero ya no se consideran PI positivas.

25

Ejecución y condiciones del ensayo.

ENSAYOS DE AZUL TRIPÁN: Los ensayos se realizan en células en placas de 6 pocillos: se siembran 300.000 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos en 3 mL de medio. Después de 24 horas, se añade el vehículo DMSO o el compuesto indicado (en
30 milésimas del volumen). Las células se incuban durante 24 horas más, y luego se recogen en 0,25 mL de tripsina, seguido, después de la cosecha, de 0,75 mL de medio. Las células se centrifugan y se resuspenden en 100–200 µL de medio que queda sobre el sedimento celular (se resuspenden las células pipeteando hacia arriba y hacia abajo algunas veces). Se agregan 10 µL a 10 µL de azul tripán. Luego se insertan 10 µL en el portaobjetos de conteo. Después

de insertar el portaobjetos en el instrumento Fisher TC20, el recuento es automático (esta gran cantidad de células son necesarias, porque una relación precisa de células positivas para azul tripán a negativas para azul tripán requiere alrededor de 200 células en el campo que el instrumento cuenta).

5 *ENSAYOS DE AZUL ALAMAR RAPTINAL*: Las células se sembraron en placa a 4000–10.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos), habitualmente en, 50 µL de medio. Después de alrededor de 18 horas, se añadieron a cada pocillo 50 µL adicionales de medio que contenía 2 veces la concentración final deseada del compuesto de prueba (C–105). Después de 24 horas, se añadió el reactivo Alamar Blue (azul alamar), y se leyó la
10 fluorescencia en los pocillos (BMG PheraStar o Molecular Devices Spectra Max M3 Microplate Reader). El % de muerte relativa se determinó estableciendo la lectura para las células tratadas con raptinal en 100% de células muertas, y la lectura para las células tratadas con vehículo, en 0% de células muertas.

ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO (FITC): Las células se sembraron en placas
15 de 12 pocillos, 75.000 células/pocillo, y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se agregaron las concentraciones indicadas de raptinal (control positivo), (–)–105, (±)–105 y (+)–105, y se dejaron incubar a 37°C durante 24 horas (Volumen final: 1 mL, DMSO al 0,1%). Después de la incubación, las células se recogieron y se resuspendieron en 350 µL de tampón de unión a anexina frío (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4)
20 premezclado con tintes de Anexina V–FITC y PI. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Biosciences LSRII, y el análisis de los datos se realizó utilizando FSC Express Versión 5–6. La muerte celular se evaluó en relación con un control tratado con DMSO.

Líneas celulares utilizadas para el objetivo terapéutico: células de cáncer de mama
25 ERα positivas.

TDG y TDG–LUC (T47DERαD538G clon 1): ambas copias del gen ERα de tipo salvaje reemplazadas con la mutación ERαD538G observada en el cáncer de mama metastásico. Estas células crecen sin estrógeno, con un aumento más modesto en la tasa de crecimiento al agregar estrógeno. Resistencia sustancial a z–OHT (la forma activa de
30 tamoxifeno) y fulvestrant//Faslodex/ICI 182.780. Ligeramente menos resistente a z–OHT y fulvestrant/ICI que las células ERαY537S. ERαD538G es la mutación única más común en el cáncer de mama metastásico. Por lo tanto, estas células son críticas para las pruebas. (TDG–LUC). Células TDG transfectadas de forma estable para expresar luciferasa de

luciérnaga. La transcripción del gen de la luciferasa está dirigida por un promotor de CMV constitutivamente activo.

5 *TYS y TYS-LUC (T47DER α Y537S CLON 4)*: Ambas copias del gen ER α de tipo salvaje reemplazadas por la mutación ER α Y537S observada en el cáncer de mama metastásico. Crecimiento rápido sin estrógenos. No hay estimulación adicional del crecimiento por estrógeno. Resistencia sustancial a z-OHT y fulvestrant/ICI. Ligeramente más resistente a los fármacos actuales que las células ER α D538G. Esta es la mutación más letal en el cáncer de mama metastásico. (TYS-Luc). Células TYS transfectadas de forma estable para expresar luciferasa de luciérnaga. La transcripción del gen de la luciferasa está
10 dirigida por un promotor de CMV constitutivamente activo.

T47D: ER α positiva, requiere estrógeno para crecer, sensible a z-OHT y fulvestrant/ICI; línea celular parental, ampliamente utilizada, pero menos común que las células MCF-7. Los niveles más bajos de ER α en las células T47D, en comparación con las células MCF-7, están más en línea con los niveles de ER α en los cánceres de mama reales.
15 Las células T47D se probaron, en parte, porque las células T47D requieren concentraciones más altas de BHPI para inhibir la proliferación y destruir, que las dos líneas celulares que expresan ER α mutante.

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7): ER α positiva, la línea celular de cáncer de mama ER α positiva más ampliamente utilizada. El estrógeno estimula en gran medida su
20 crecimiento; sensible a z-OHT y fulvestrant/ICI.

ECC-1: Células cancerosas uterinas positivas para ER α .

Caov3: Células de cáncer de ovario positivas para ER α resistentes a fármacos. BHPI bloquea el crecimiento de las células Caov-3, pero no las destruye. Estas células son completamente resistentes al tamoxifeno y fulvestrant, y parcialmente resistentes al cisplatino
25 y al paclitaxel.

Células ER α negativas utilizadas para evaluar la toxicidad y los efectos fuera del objetivo.

HeLa: Estas son células ER α negativas de origen de cuello uterino. La línea celular
30 humana más ampliamente utilizada.

Células MDA-MB-231: Estas son células ER α negativas, y son el modelo más común de cáncer de mama triple negativo. Altamente metastásico. Estas células se utilizan porque, en este trabajo, son más sensibles a la inhibición del crecimiento no específico que la

mayoría de las otras líneas celulares. Por lo tanto, son una prueba estricta para la toxicidad no específica.

MCF-10A (Michigan Cancer Foundation-10A): línea celular de cáncer de mama ER α negativa, inmortal, pero no tumorigénica.

5

Estadísticas.

A menos que se indique lo contrario, hay por lo menos 3 réplicas biológicas de cada muestra ($n = 3$). Los datos se presentan como el promedio de las réplicas $\pm$ S. E. M. Por razones de significación estadística, las comparaciones son para las células tratadas con el
10 vehículo en comparación con las células tratadas con la misma concentración de 105, BHPI u otros compuestos, en donde $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, todos, utilizando la prueba de la T de Student.

Formulaciones farmacéuticas.

15 Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas terapéuticas, por ejemplo, combinando los compuestos con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se pueden añadir a un portador en forma de sal o solvato. Por ejemplo, en los casos en los que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no
20 tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y β -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas,
25 incluidas las sales de clorhidrato, haluro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Se pueden obtener sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos estándares bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido adecuado para proporcionar un compuesto iónico fisiológicamente aceptable. Las sales de metales alcalinos (por ejemplo,
30 sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos también pueden prepararse mediante métodos análogos.

Los compuestos de las fórmulas descriptas en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano, en una diversidad de formas. Las formas pueden adaptarse

específicamente a una vía de administración elegida, por ejemplo, administración oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Los compuestos descritos en este documento se pueden administrar sistémicamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Para la administración oral, los compuestos pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse como comprimidos, o incorporarse directamente en la comida de la dieta de un paciente. Los compuestos también pueden combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones contienen típicamente por lo menos 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar, y puede ser convenientemente de alrededor de 0,5% a alrededor de 60%, alrededor de 1% a alrededor de 25%, o alrededor de 2% a alrededor de 10% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles puede ser tal que se pueda obtener un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico y similares; y un lubricante tal como estearato de magnesio. Puede agregarse un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo; o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes diversos otros materiales tales como revestimientos, o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa, como agente edulcorante; metil y propil parabenos, como conservantes; un tinte y saborizante, tal como sabor de cereza o naranja. Cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales pueden prepararse en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina o sus mezclas, o en un
5 aceite farmacéuticamente aceptable. En condiciones normales de almacenamiento y uso, las preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles, dispersiones o polvos estériles que comprenden el
10 ingrediente activo adaptado para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o de infusión estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol,
15 propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes
20 antibacterianos y/o antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el solvente apropiado, con diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido opcionalmente de la esterilización por filtración. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden incluir técnicas de secado al vacío y
25 liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en la solución.
30

Para la administración tópica, los compuestos se pueden aplicar en forma pura, por ejemplo, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrar el agente

activo a la piel como una composición o formulación, por ejemplo, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido, un líquido, un gel o similar.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles
5 incluyen agua, dimetil sulfóxido (DMSO), alcoholes, glicoles o mezclas de agua–alcohol/glicol, en las que un compuesto puede disolverse o dispersarse en niveles eficaces, opcionalmente, con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden agregar coadyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales, para optimizar las propiedades para un uso determinado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse desde
10 almohadillas absorbentes, pueden usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o pueden rociarse sobre el área afectada usando un rociador de aerosol o de tipo bomba.

También se pueden emplear espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados, con portadores líquidos para formar pastas untables, geles, ungüentos,
15 jabones y similares, para su aplicación directa a la piel del usuario.

Se conocen en la técnica ejemplos de composiciones dermatológicas para suministrar agentes activos a la piel; por ejemplo, ver las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.992.478 (Geria), 4.820.508 (Wortzman), 4.608.392 (Jacquet et al.) y 4.559.157 (Smith et al.). Dichas composiciones dermatológicas se pueden usar en combinaciones con los compuestos
20 descriptos en este documento, donde un ingrediente de tales composiciones se puede reemplazar opcionalmente por un compuesto descrito en este documento, o se puede añadir un compuesto descrito en este documento a la composición.

Las dosificaciones útiles de los compuestos descriptos en este documento se pueden determinar comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en modelos animales. Se
25 conocen en la técnica métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales a seres humanos; por ejemplo, ver la Patente de EE. UU. Nro. 4.938.949 (Borch et al.). La cantidad de un compuesto, o una sal activa o su derivado, requerida para el uso en el tratamiento variará no solo con el compuesto o la sal particular seleccionados, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la
30 edad y condición del paciente y, en última instancia, quedará a criterio del médico o especialista tratante.

En general, sin embargo, una dosis adecuada estará en el rango de alrededor de 0,5 a alrededor de 100 mg/kg, por ejemplo, de alrededor de 10 a alrededor de 75 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 a alrededor de 50 mg por kilogramo de peso corporal del

receptor por día, preferentemente en el rango de 6 a 90 mg/kg/día, más preferentemente en el rango de 15 a 60 mg/kg/día.

El compuesto se formula convenientemente en forma de dosificación unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 1000 mg, convenientemente de 10 a 750 mg, más convenientemente de 50 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. En una forma de realización, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención formulado en dicha forma de dosificación unitaria.

El compuesto se puede administrar convenientemente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contenga de 5 a 1000 mg/m², convenientemente de 10 a 750 mg/m², más convenientemente, de 50 a 500 mg/m² de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una sola dosis, o como dosis divididas administradas con intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí misma puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones distintas espaciadas libremente.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una sola dosis, o como dosis divididas administradas con intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí misma puede dividirse además, por ejemplo, en varias administraciones distintas espaciadas libremente, tales como múltiples inhalaciones de un insuflador, o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser agentes antitumorales eficaces, y tienen mayor potencia y/o toxicidad reducida en comparación con BHPI. Preferentemente, los compuestos de la invención son más potentes y menos tóxicos que BHPI, y/o evitan un sitio potencial de metabolismo catabólico encontrado con BHPI, es decir, tienen un perfil metabólico diferente al de BHPI.

La invención proporciona métodos terapéuticos para tratar el cáncer en un mamífero, que implican administrar a un mamífero que tiene cáncer una cantidad eficaz de un compuesto o de una composición descritos en este documento. Un mamífero incluye un primate, humano, roedor, canino, felino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, bovino y similares. El cáncer se refiere a cualquier tipo diverso de neoplasia maligna, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de mama, melanoma y leucemia, y en general, se caracteriza por una proliferación celular indeseable, por ejemplo, crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión local de tejidos y metástasis.

La capacidad de un compuesto de la invención para tratar el cáncer puede determinarse usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen el diseño

de protocolos de tratamiento, la evaluación de la toxicidad, el análisis de datos, la cuantificación de la destrucción de células tumorales y la significación biológica del uso de cribados de tumores trasplantables. Además, la capacidad de un compuesto para tratar el cáncer puede determinarse usando las Pruebas que se describen a continuación.

5

Los siguientes Ejemplos están destinados a ilustrar la invención anterior, y no deben interpretarse como una restricción a su alcance. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los Ejemplos sugieren muchas otras formas en las que se podría poner en práctica la invención. Debe entenderse que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones, sin dejar de estar dentro del alcance de la invención.

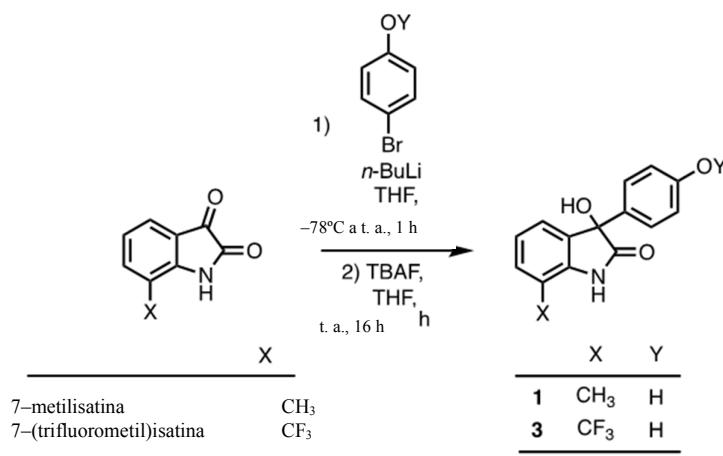
10

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procedimientos sintéticos.

Información general: A menos que se establezca lo contrario, todos los reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin secado o purificación adicional. Los solventes usados aquí se secaron después de haber sido pasados a través de columnas de alúmina activada. Todas las reacciones se ejecutaron en recipientes de vidrio secados con llama, bajo una presión positiva de gas nitrógeno. Los experimentos de ^1H RMN y ^{13}C RMN se condujeron en una criosonda Bruker a 500 MHz y 188 MHz, respectivamente. Los espectros obtenidos en CD_3OD se referenciaron para 3,31 ppm y 49,00 ppm para espectros de ^1H y ^{13}C RMN, respectivamente. Las multiplicidades de RMN se informan como: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete. Las multiplicidades de ^{13}C son todos singuletes, a menos que se observe lo contrario.

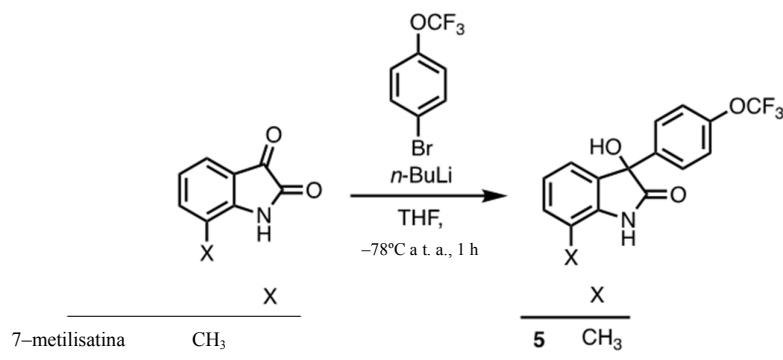
20



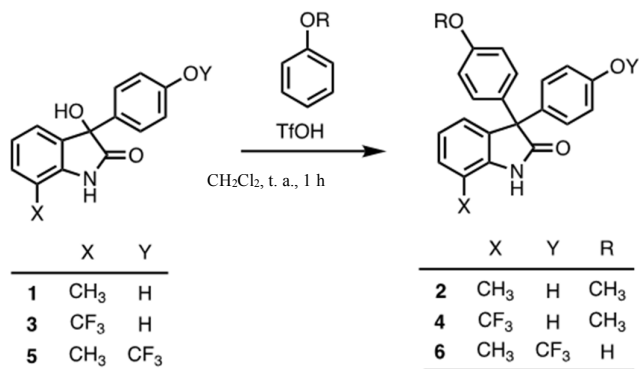
25

Procedimiento A: Un matraz de base redonda se cargó con bromuro de fenilo deseado (3,08 mmol) y se disolvió en THF (3,0 mL). La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C , y

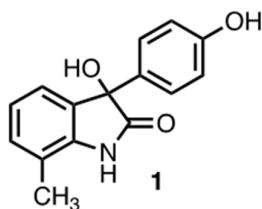
una solución de *n*-BuLi (2,77 mmol, 1,7 mL) se agregó por goteo durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 1 hora. En otro matraz, se agregó la isatina deseada (1,54 mmol), y se disolvió en THF (9,4 mL). Esta solución de isatina se agregó al recipiente de reacción por goteo durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 hora, se entibió hasta t. a., y luego se agitó durante 1 hora. La reacción se apagó con agua (10 mL). La solución se extrajo con etil acetato (3x), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El aceite resultante se pasó a través de un tapón de sílice (gradiente de solvente de elución: 10% EtOAc/Hexanos aumentado a 100% EtOAc). La especie eluida luego se cargó en un matraz de base redonda, se purgó con aire, se colocó bajo atmósfera de nitrógeno, y se disolvió en THF (15,4 mL). Se agregó una solución de fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (5,4 mL) al recipiente de reacción. Después de 16 horas de agitación, la reacción se apagó con una solución 1:1 de cloruro de amonio saturado ac.:agua (30 mL). La solución se extrajo con etil acetato (3x), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El aceite resultante luego se purificó por medio de la cromatografía de columna.



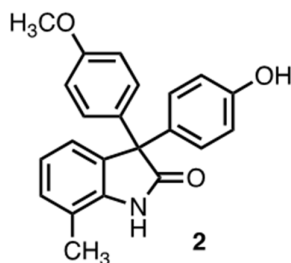
Procedimiento B: Un matraz de base redonda se cargó con bromuro de fenilo deseado (3,35 mmol) y se disolvió en THF (2,8 mL). La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C , y una solución de *n*-BuLi (2,79 mmol, 1,8 mL) se agregó por goteo durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 1 hora. En otro matraz, la isatina deseada (1,86 mmol) se agregó y se disolvió en THF (5,6 mL). Esta solución de isatina se agregó al recipiente de reacción por goteo durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 hora, se entibió hasta t. a., y luego se agitó durante 1 hora. La reacción se apagó con agua (10 mL). La solución se extrajo con etil acetato (3x), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El aceite resultante se pasó a través de un tapón de sílice (gradiente de solvente de elución: 10% EtOAc/Hexanos aumentado a 100% EtOAc).



- Procedimiento C:* Un matraz de base redonda se cargó con alcohol terciario deseado (0,93 mmol) y fenol deseado (4,2 mmol), y la mezcla se disolvió en diclorometano (4,7 mL).
- 5 La mezcla de reacción luego se colocó en un baño de hielo, y se agregó luego ácido trifílico (TfOH, 0,42 mL) por goteo. El recipiente de reacción se extrajo del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción luego se vertió en bicarbonato de sodio con hielo, y la solución acuosa se extrajo con etil acetato (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El
- 10 aceite resultante luego se purificó por medio de la cromatografía de columna.



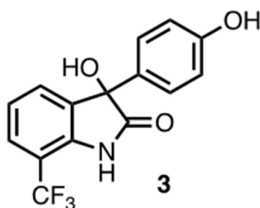
- 3-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-7-metilindolin-2-ona (1):** Utilizando el Procedimiento General A, **1** se aisló en 45% de rendimiento en dos etapas. ¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz): δ 7,19 (d, J = 8,86 Hz 2H), 7,10 (d, J = 7,59 Hz 1H), 7,02 (d, J = 7,46 Hz 1H), 6,96 (dd, J = 7,54 Hz, 7,49 Hz 1 H), 6,71 (d, J = 8,72 Hz 2H), 2,29 (s, 3 H).
- ¹³C RMN (CD₃OD, 188MHz): δ 182,20, 158,40, 141,39, 134,47, 132,71, 131,78, 128,23, 123,86, 123,48, 121,00, 115,93, 79,17, 16,58.



3-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)-7-metilindolin-2-ona (2): Utilizando el Procedimiento General C, **2** se aisló en 83% de rendimiento. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,12 (d, $J = 8,93$ Hz, 2H), 7,02 (m, 3H), 6,94 (m, 2H), 6,82 (d, $J = 6,82$ Hz, 2H), 6,69 (d, $J = 8,74$ Hz), 3,74 (s, 3H), 2,30 (s, 3H).

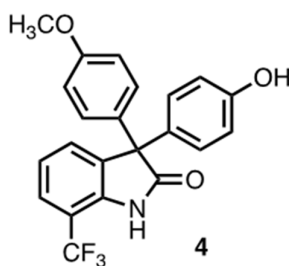
5 ^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 182,87, 160,24, 157,71, 140,70, 135,73, 135,65, 134,26, 130,58, 130,54, 130,38, 124,48, 123,51, 121,02, 116,02, 114,64, 63,36, 55,67, 16,81.

HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346,1443, hallada: 346,1442.



10 **3-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-7-(trifluorometil)indolin-2-ona (3):** Utilizando el Procedimiento General A, **3** se aisló en 35% de rendimiento en dos etapas. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,54 (m, 1H), 7,43 (d, $J = 7,49$ Hz, 1H), 7,19 (m, 3H), 6,74 (d, $J = 8,74$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 181,60, 158,73, 140,54 (q, $J = 2,25$ Hz), 136,85, 131,80, 129,89, 128,89, 126,90 (q, $J = 4,6$ Hz), 125,16 (q, $J = 270,76$ Hz), 123,74, 116,16, 113,56 (q, $J = 33,17$ Hz), 77,66.

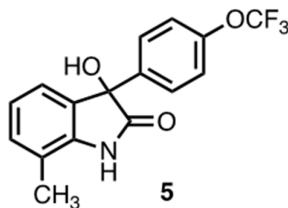


3-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)-7-(trifluorometil)indolin-2-ona (4):

20 Utilizando el Procedimiento General C, **4** se aisló en 82% de rendimiento. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,50 (dd, $J = 8,09$ Hz, 0,62 Hz, 1H), 7,40 (dd, $J = 7,76$ Hz, 0,64 Hz, 1H), 7,18 (ddd, $J = 8,08$ Hz, 7,46 Hz, 0,87 Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 8,87$ Hz, 2H), 7,01 (d, $J = 8,76$ Hz, 2H), 6,86 (d, $J = 8,87$ Hz, 2H), 6,72 (d, $J = 8,75$ Hz, 2H), 3,77 (s, 3H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 182,24, 160,55, 158,10, 139,74 (m), 137,85, 134,73, 133,30, 130,98, 130,50, 130,49, 125,72 (q, $J = 4,6$ Hz), 125,23 (q, $J = 270,71$ Hz), 123,32, 116,27, 114,89, 113,55 (q, $J = 33,50$ Hz), 62,12, 55,72.

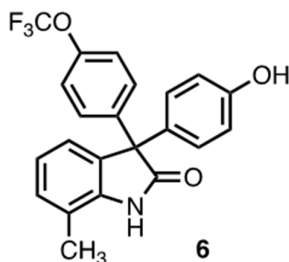
HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 400,1161, hallada: 400,1154.



3-hidroxi-7-metil-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)indolin-2-ona (5): Utilizando el Procedimiento General B, **5** se aisló en 68% de rendimiento en dos etapas. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,46 (d, $J = 8,83$ Hz 2H), 7,22 (dd, $J = 1,02$ Hz, 8,98 Hz, 2H), 7,13 (m, 1H),

5 6,98 (m, 2H), 2,31 (s, 3H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 181,41, 150,1 (q, $J = 1,6$ Hz), 141,55, 141,46, 134,03, 132,19, 128,67, 124,13, 123,4, 121,90 (q, $J = 255,61$ Hz), 121,32, 79,04, 16,61.

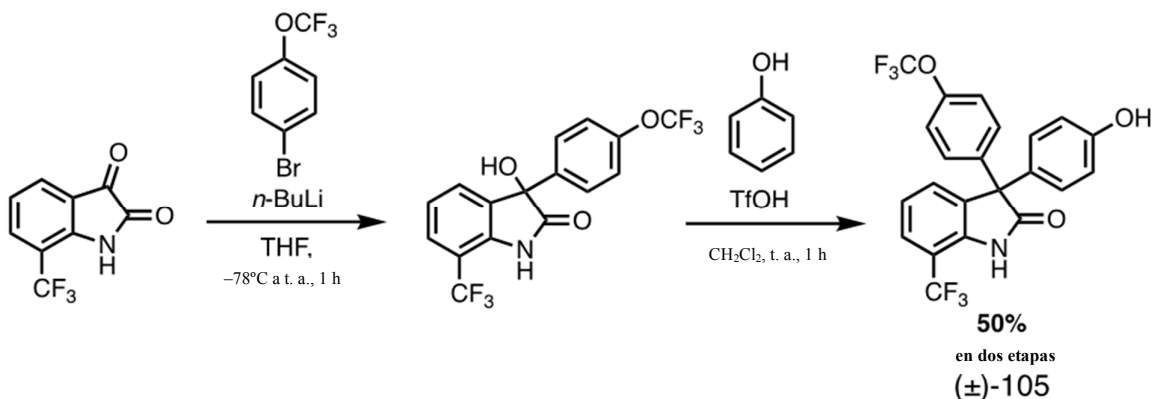


10 **3-(4-hidroxifenil)-7-metil-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)indolin-2-ona (6):**

Utilizando el Procedimiento General C, **6** se aisló en 59% de rendimiento. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,30 (d, $J = 8,86$ Hz 2H), 7,20 (m, 2 H), 7,08 (m, 1H), 7,03 (d, $J = 8,74$ Hz, 2H), 6,99 (m, 2H), 6,72 (d, $J = 8,73$ Hz, 2H), 2,31 (s, 3H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 182,00, 158,02, 149,56 (q, $J = 1,47$ Hz), 143,12, 140,82, 134,85, 133,55, 131,22, 130,77, 130,56, 124,51, 123,73, 121,89 (q, $J = 255,61$ Hz), 121,78, 121,32, 116,23, 63,49, 16,82.

HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{F}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 400,1161, hallada: 400,1163.



Síntesis de 3-(4-hidroxifenil)-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)-7-

(trifluorometil)indolin-2-ona ((±)-105): Un matraz de base redonda se cargó con 1-bromo-4-(trifluorometoxi)benceno (3,08 mmol), y este se disolvió en THF (3,0 mL). La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C , y una solución de *n*-BuLi (2,77 mmol, 1,7 mL) se agregó por goteo durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 1 hora. En otro matraz, la isatina deseada (1,54 mmol) se agregó y se disolvió en THF (9,4 mL). Esta solución de isatina se agregó al recipiente de reacción por goteo durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 hora, se entibió hasta t. a., y luego se agitó durante 1 hora. La reacción se apagó con agua (10 mL). La solución se extrajo con etil acetato (3x), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. Un nuevo matraz de base redonda se cargó con alcohol terciario bruto y fenol (6,95 mmol), y la mezcla se disolvió en diclorometano (7,7 mL). La mezcla de reacción luego se colocó en un baño de hielo, y luego se agregó ácido triflico (TfOH, 0,7 mL) por goteo. El recipiente de reacción se extrajo del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción luego se vertió en bicarbonato de sodio con hielo, y la solución acuosa se extrajo con etil acetato (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El aceite resultante luego se purificó por medio de la cromatografía de columna. **((±)-105)** se aisló en 50% de rendimiento en dos etapas sintéticas.

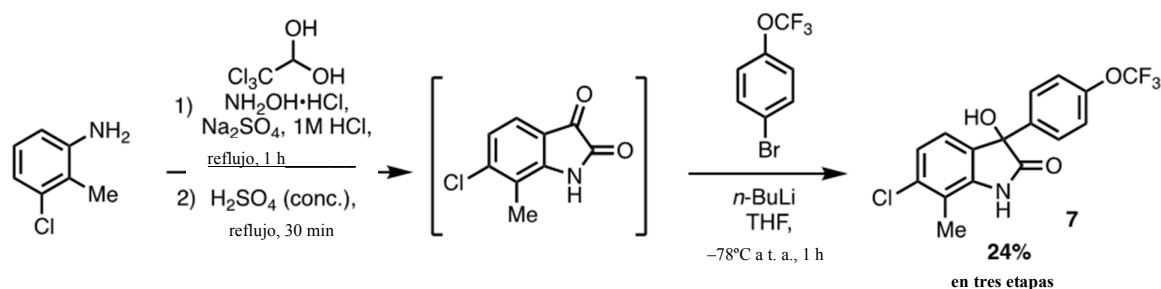
^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,54 (d, $J = 7,95$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 7,48$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,91$ Hz 2 H), 7,22 (m, 3H), 7,03 (d, $J = 8,85$ Hz, 2H), 6,75 (d, $J = 8,80$ Hz, 2H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 181,35, 158,37, 149,81 (q, $J = 1,78$ Hz), 142,17, 139,84 (q, $J = 2,29$ Hz), 136,92, 132,65, 131,22, 131,06, 130,48, 126,12 (q, $J = 4,58$ Hz), 125,15 (q, $J = 270,89$ Hz), 123,55, 121,88 (q, $J = 255,84$ Hz), 122,01, 116,48, 113,77 (q, $J = 33,32\text{Hz}$), 62,22.

HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{F}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 454,0878, hallada: 454,0878.

Separación quiral de ((±)-105): **((±)-105)** se separó en sus respectivos enantiómeros usando separación de HPLC quiral preparatoria (Lux® 5 μM Celulosa-1, columna LC, 250 x 21,2 mm, AXIA™ Packed, isocrático: 7% *i*-PrOH/hexanos). Las fracciones recogidas produjeron (–)-105 (pico A) y (+)-105 (pico B): Figura 5. Este método de separación quiral produce (–)-105 en forma de un sólido de color blanco (pureza enantiómera = >99%, $^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} = -14,6^{\circ} (\pm 0,1^{\circ})$) y (+)-105 en forma de un sólido de color blanco (pureza enantiómera = ~98–99%, $^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} = -13,8^{\circ} (\pm 0,1^{\circ})$) (ver **Ejemplo 4**). La determinación de pureza enantiómera se condujo por columna de HPLC quiral analítica: CHIRALPAK® IB-3

(tamaño de partícula 3 μ M, dimensiones: 4,6 mm x 100 mm, método de separación, isocrático 7.5% *i*-PrOH/hexanos) (**Figura 6–8**).

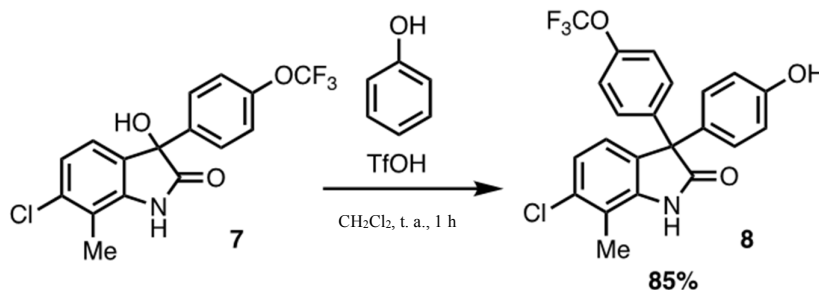


5 **6–cloro–3–hidroxi–7–metil–3–(4–(trifluorometoxi)fenil)indolin–2–ona (7):** Un recipiente de reacción se cargó con anilina sustituida (2,82 mmol), 1 M HCl (2,82 mL), agua (18,8 mL), sulfato de sodio anhidro (16,92 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (9,17 mmol). La mezcla se calentó hasta ebullición, y luego se agregó hidrato de cloral en una porción. La reacción se mantuvo a reflujo durante 40 minutos, luego se enfrió hasta reflujo, y la solución acuosa se extrajo con etil acetato (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. Se agregó luego ácido sulfúrico concentrado (3 mL) al residuo resultante. Esta solución se calentó hasta 80°C durante 20 minutos, luego se vertió en hielo. La mezcla acuosa resultante se extrajo con etil acetato (3x), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El sólido de color rojo amarronado obtenido luego de la concentración demostró ser escasamente soluble en la mayoría de los solventes orgánicos.

En un nuevo recipiente de reacción, se agregó el bromuro de fenilo deseado (3,08 mmol), y se disolvió en THF (3,0 mL). La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C , y una solución de *n*-BuLi (2,77 mmol, 1,73 mL) se agregó por goteo durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 1 hora. En otro matraz, se agregó 6–cloro–7metilisatina (1,54 mmol), que se disolvió en THF (9,4 mL). Esta solución de isatina se agregó al recipiente de reacción por goteo durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 1 hora, se entibió hasta t. a., y luego se agitó durante 1 hora. La reacción se apagó con agua (10 mL). La solución se extrajo con etil acetato (3x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron al vacío. El aceite resultante se pasó a través de un tapón de sílice (gradiente de solvente de elución: 10% EtOAc/Hexanos aumentado a 100% EtOAc).

Se aisló **7** en 24% de rendimiento en tres etapas sintéticas. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,46 (d, J = 8,85 Hz 2H), 7,23 (d, J = 7,98 Hz, 2H), 7,10 (d, J = 7,97 Hz 1H), 6,98 (d, J = 8,02 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 181,25, 150,17 (q, $J = 1,83$ Hz), 143,14, 140,98, 136,68, 132,74, 128,63, 124,53, 124,40, 121,88 (q, $J = 255,75$ Hz), 121,86, 119,76, 78,91, 14,11.
HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{F}_3\text{ClNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 380,0277, hallada: 380,0284.



5

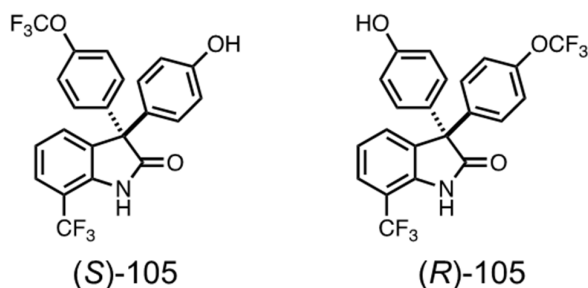
6-cloro-3-(4-hidroxifenil)-7-metil-3-(4-(trifluorometoxi)fenil)indolin-2-ona

(8): Utilizando el Procedimiento General C, **8** se aisló en 85% de rendimiento. ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7,30 (d, $J = 8,91$ Hz 2H), 7,21 (m, 2H), 7,10 (d, $J = 8,10$ Hz, 1H), 7,02 (m, 4H), 6,73 (d, $J = 8,80$ Hz, 2H), 2,35 (s, 3H).

^{13}C RMN (CD_3OD , 188 MHz) δ : 181,81, 158,16, 149,67 (q, $J = 2,02$ Hz), 142,6, 142,38, 135,34, 133,50, 133,10, 131,18, 130,47, 125,48, 124,12, 121,89 (q, $J = 255,49$ Hz), 121,8, 119,66, 116,35, 63,45, 14,30.

10

HRMS (ESI): m/z calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{F}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 434,0771, hallada: 434,0764.



15

Separación de enantiómeros de 105: Mezclas racémicas de 105 se separaron en sus respectivos enantiómeros (**Figura 5**), usando separación de HPLC quiral preparatoria (Lux® 5 μM Celulosa-1, Columna LC, 250 x 21,2 mm, AXIA™ empaquetada, isocrático: 7% *i*-PrOH/hexanos). Las fracciones recogidas produjeron (–)-105 (pico A) y (+)-105 (pico B).
Este método de separación quiral produce (–)-105 en forma de un sólido de color blanco (pureza enantiómera = > 99%, $[\alpha] = -134$) y (+)-105 en forma de un sólido de color blanco (pureza enantiómera = 98 – > 99%, $[\alpha] =$ no determinado). La determinación de pureza enantiómera se condujo por columna de HPLC quiral analítica: CHIRALPAK® IB-3 (tamaño de partícula 3 μM , dimensiones: 4,6 mm x 100 mm, método de separación, isocrático 7,5% *i*-PrOH/hexanos). El compuesto (–)-105 dobla la luz en la dirección

20

25

negativa (valor $[\alpha]$). La **Figura 6** es una traza de HPLC quiral cuantitativa que muestra los picos separados de $(\pm)$ -105 que están presentes en concentraciones aproximadamente iguales. La **Figura 7** muestra que el pico activo $(-)$ -105 es altamente puro luego de la separación. La **Figura 8** muestra que el pico inactivo $(+)$ -105 también es puro después de la separación.

- 5 Debido a que hay una traza del activo $(-)$ -105 en esta preparación, y debido a la sobresaliente potencia de $(-)$ -105, en concentraciones extremadamente altas, $(+)$ -105 puede exhibir cierta actividad.

Ejemplo 2. Estudios de muerte de células cancerosas del Compuesto 105.

- 10 *Detalles experimentales de los xenoinjertos:* se inyectaron células TYS-Luc (5.000.000 de células en Matrigel) en la almohadilla de grasa mamaria superior de ratones hembra NSG (SCID) ovariectomizados (Jackson labs). Después de 10 semanas, el día 0, estaban presentes tumores grandes (rango de tamaño: 100–600 mm³). Los ratones se trataron con el vehículo usado para disolver $(-)$ -105, o $(-)$ -105 a 40 mg/kd al día mediante inyección subcutánea. Para la formación de imágenes bioluminiscentes (BLI) de los tumores, los
- 15 ratones se anestesiaron con isoflurano, y se inyectó en los ratones Luciferin, el sustrato de luciferasa. El flujo, el miembro total de fotones de luz que inciden en el detector en un segundo, se midió utilizando un IVIS (sistema de imágenes *in vitro*). Se muestra el flujo (en millones de unidades por segundo) para toda el área que contiene cada tumor, o un área
- 20 equivalente cuando el tumor es pequeño o indetectable y el cambio porcentual en el tamaño del tumor cada vez que se tomó una medición (día 0, día 3, semana 1, semana 2, semana 3). Luego se detuvo el tratamiento, y se tomó otra medida a las dos semanas. Obsérvese que los tumores también se midieron con calibradores. Dado que algunos tumores no sobresalen mucho, esto es mucho menos preciso que BLI. Después de tres días, todos los tumores $(-)$ -
- 25 105 habían disminuido hasta indetectables, usando calibradores.

- La Figura 1 muestra el efecto de respuesta a la dosis de $(\pm)$ -105 en células cancerosas humanas ER α positivas y ER α negativas, de modo de demostrar actividad anticancerígena. Las células ER α positivas de cáncer de mama MCF-7, cáncer de ovario Caov-3 y de cáncer de útero ECC-1 y células de cáncer de mama humano ER α negativas MDA-MB-231, y
- 30 HeLa, células de carcinoma cervical humano y células epiteliales mamarias humanas MCF-10A fueron colocadas en placa a 10.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos) en 50 μ L de medio. Después de aproximadamente 18 horas, se añadieron a cada pocillo 50 μ L adicionales de medio que contenía el doble de la concentración final deseada del compuesto de ensayo (C-105) (volumen final 100 μ L/pocillo). Después de 24 horas, se añadió el reactivo Alamar

Blue (azul Alamar), y se leyó la fluorescencia en los pocillos después de 1 hora (BMG PheraStar Microplate Reader). El % de muerte relativa se determinó estableciendo la lectura para células tratadas con raptinal 10.000 nM, en 100% de células muertas, y la lectura para las células tratadas con vehículo, en 0% de células muertas. (Los datos son el $\pm$ SEM promedio de 3 experimentos independientes con 5 réplicas biológicas para cada muestra dentro de cada experimento independiente).

La **Figura 2** muestra la respuesta a la dosis comparando la capacidad de BHPI y ($\pm$)–105 para destruir células T47D positivas para ER α . Se sembraron en placa células de cáncer de mama humano T47D, a 75.000 células/pocillo. Al día siguiente, se agregó vehículo DMSO, 10 μ m de raptinal (control para el 100% de muerte celular), o 0, 50, 100, 500 y 1000 nM de BHPI o ($\pm$)–105, o 1000 nM ICI/fulvestrant o 1000 nM OHT. Después de 24 horas, se determinaron las células viables mediante FACS utilizando tintes V–FITC y yoduro de propidio. (n = 3 experimentos independientes $\pm$ SEM). Los resultados de este experimento de citometría de flujo (que detecta células muertas) muestran que ($\pm$)–105 es citotóxico y no citostático. Mientras que los compuestos OHT, ICI y BHPI son todos citostáticos, sobre la base de la baja actividad observada. La actividad observada de ($\pm$)–105 en este ensayo es similar al control positivo, raptinal, un compuesto que también destruye cuantitativamente las células cancerosas (ver también la **Figura 36A**).

La **Figura 3** compara la capacidad de ($\pm$)–105 para matar células ER α positivas y ER α negativas. La respuesta a la dosis prueba la capacidad de ($\pm$)–105 para matar rápidamente las células ER α positivas y ER α negativas. Líneas celulares: cáncer de mama ER α positivo: T47D, MCF–1 TYS (Y537S); endometrial: ECC–1; líneas celulares ER α negativas: MDA–MB–231 de mama; melanoma: OMM1, A375; pulmón: H3122; colon: HT–29; fibroblasto: HFF–1. Se sembraron 4000–8000 células/pocillo. Al día siguiente se añadió ($\pm$)–105 en concentraciones de 0–10.000 nM. Después de 24 horas se añadió reactivo Alamar Blue (azul Alamar), y se leyó la fluorescencia en los pocillos. El % de muerte relativa se determinó estableciendo la lectura para las células tratadas con raptinal 1000 nM en 100% de células muertas, y la lectura para células tratadas con vehículo, en 0% de células muertas. (n = 3 $\pm$ SEM). Estos resultados muestran que el compuesto racémico 105 es selectivo para las líneas de células cancerosas positivas para ER α ; también se demostró con (–)–105 enantioméricamente puro en la **Figura 36F**.

La **Figura 4A** ilustra cómo se determinaron las IC₅₀ para la muerte celular. **4B** prueba la capacidad de destrucción de BHPI, (–)–105 y 01–15. **4C** muestra que (–)–105 es eficaz cuando se administra por vía oral. Se dejó que se formaran grandes tumores de mama

ortotópicos de células TYD–Luc (células de cáncer de mama humano T47DER α D538G–luciferasa) durante 4 meses en ratones NSG inmunosuprimidos. Los ratones se trataron durante 3 días con vehículo solo (vehículo), sonda oral de 40 mg/kg de (–)–105 (oral) o inyección diaria de 40 mg/kg de (–)–105 (inyectada). Los tumores se visualizaron mediante
5 imágenes bioluminiscentes utilizando luciferasa. La línea discontinua representa –100%; regresión del tumor hasta indetectable. Por lo tanto, el resultado muestra que (–)–105 es superior a BHPI y 01–15.

La **Figura 9** muestra que el enantiómero (–) de 105 es activo, y el enantiómero (+) es inactivo. Se colocaron en placa por pocillo 75.000 células de cáncer de mama humano T47D
10 ER α positivas. Al día siguiente, vehículo DMSO, 10 μ m de raptinal (control del 100% de muerte celular), o 100, 500 y 1000 nM de (+)–105, o (–)–105. Después de 24 horas, se determinaron las células viables mediante FACS utilizando tintes V–FITC y yoduro de propidio. (n = 1).

La **Figura 10** muestra que (–)–105 induce la muerte dependiente de la dosis de
15 células MCF–7; (+)–105 es inactivo. Se colocaron en placa por pocillo 75.000 células de cáncer de mama humano T47D ER α positivas.. Al día siguiente, se añadieron vehículo DMSO, 10 μ m de raptinal (control para el 100% de muerte celular) o 1–500 nM de (–)–105 o 1000 nM (+)–105 o 1000 nM ($\pm$)–105. Después de 24 horas, se determinaron las células viables mediante FACS utilizando tintes V–FITC y yoduro de propidio. (n = 3 experimentos
20 independientes $\pm$ SEM).

La **Figura 11** muestra la respuesta a la dosis para la destrucción de células T47D–Luc por BHPI y por el enantiómero activo (–)–105 de C–105. El ensayo de muerte celular con azul tripán se usó para comparar la capacidad del enantiómero activo (–) de C–105 y BHPI para destruir células de cáncer de mama humano T47D positivas para el receptor de
25 estrógeno α (ER α) que expresan luciferasa (células T47D–Luc). Se sembraron 300.000 células T47D–Luc/pocillo en FBS al 10% en una placa de 6 pocillos por triplicado. 24 horas después de la siembra en placa, se añadieron a las células las concentraciones indicadas del enantiómero activo (–) de C–105 [(–)–105] o BHPI, o vehículo [Veh]. Después de 24 horas, se recogieron las células, y se determinó el % de células muertas mediante exclusión
30 automática con azul tripán utilizando el hemocitómetro automático Countess II. El porcentaje de células viables se calculó haciendo 100 – (% de muerte celular). (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 12** muestra que la respuesta a la dosis de (–)–105 es superior a BHPI en la destrucción de células MCF–7 y TYS–Luc. El ensayo de muerte celular con azul tripán se usó para evaluar la capacidad del enantiómero activo de 105 (–) [(–)–105] para matar las

células de cáncer de mama humano ER α positivo MCF-7 y TYS-Luc. Se sembraron 300.000 células T47D/pocillo en FBS al 10% en una placa de 6 pocillos por triplicado. 24 horas después de la siembra en placa, se agregaron las concentraciones indicadas de BHPI, o el enantiómero activo 105 (-) de C-105 [(-)-105]. Después de 24 horas, se recogieron las células, y se determinó el % de células muertas mediante exclusión automática con azul tripán utilizando el hemocitómetro automático Countess II. El porcentaje de células viables se calculó haciendo 100 - (% de muerte celular). (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 13** muestra que el estudio de respuesta a la dosis de (-)-105 es superior al BHPI y las terapias endocrinas actuales para matar las células TDG-Luc. En la figura superior, la respuesta a la dosis muestra que (-)-105 es superior a BHPI en la destrucción de células TDG-Luc. La figura inferior izquierda muestra que las terapias endocrinas actuales, ICI/Fulvestrant/Faslodex y z-4-hidroxitamoxifeno (la forma activa de tamoxifeno) no matan las células TDG-Luc. La figura inferior derecha muestra que el enantiómero (+)-105 es inactivo y no mata las células TDG-luc. El ensayo de muerte celular con azul tripán se usó para evaluar la capacidad del enantiómero activo de C-105 [(-)-105] para matar las células TDG-Luc ER α positivas. Para todos los estudios, se sembraron 300.000 células TDG-Luc por pocillo en FBS al 10% en una placa de 6 pocillos por triplicado. 24 horas después de la siembra en placa, se añadieron las concentraciones indicadas el enantiómero activo de (-)-105, o BHPI (arriba) ICI, u OHT (abajo a la izquierda) o (+)-105 (abajo a la derecha). Después de 24 horas, se recogieron las células, y se determinó el % de células muertas mediante exclusión automática con azul tripán utilizando el hemocitómetro automático Countess II. El porcentaje de células viables se calculó haciendo 100 - (% de muerte celular). (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 14** muestra los IC₅₀ para la destrucción de células cancerosas por (-)-105. Líneas celulares: cáncer de mama ER α positivo: T47D, MCF-7 TYS (T47D Y537S) TDG (T47D D538G), BT-474; células de cáncer de mama ER α negativo MDA-MB-231; 6000 células por pocillo (placa de 96 pocillos) se sembraron en placa en 100 μ l de medio. DMSO Conc. se ajustó a 1% en cada pocillo. Se agregó (-)-105 en concentraciones de 0-100.000 nM. Después de 24 horas, se agregó el reactivo Alamar Blue (azul Alamar) (10 μ l de 0,1 mg/mL). Después de 2-4 horas, se leyó la fluorescencia en los pocillos (λ_{ex} : 555 nM, λ_{em} : 585 nM, lector de placa Spectra Max M3 Plate reader). El % de muerte relativa se determinó estableciendo la lectura para células tratadas con 10.000 nM raptinal en 100% células muertas, y la lectura para células tratadas con vehículo, en 0% de células muertas (n=3 $\pm$ SEM).

La **Figura 15** muestra experimentos a largo plazo en los que (–)-105, pero no BHPI, mata el 100% de las células TYS–Luc. Para simular el efecto de varias semanas de tratamiento de un tumor en un xenoinjerto de ratón, se realizaron experimentos de cultivo celular a largo plazo. Las células TYS–Luc (células T47DER α Y537S–Luc; ER α Y537S es la mutación ER α más letal observada en el cáncer de mama metastásico) se sembraron a 4000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se mantuvieron inicialmente durante 2 semanas en medio que contenía vehículo DMSO, enantiómero (+) inactivo 1 μ M de C–105, BHPI 1 μ M o 1 μ M del enantiómero activo (–) de C–105 (tratamiento). Después de 2 semanas (cambio de medio cada 2 días) se determinó el número de células usando MTS y una curva estándar de absorbancia frente al número de células para las células TYS–Luc. Notas: (i) Las barras indican los brazos BHPI y (–)-105 del experimento. No hay fármaco presente durante el nuevo crecimiento. (ii) Debido a que los valores de absorbancia son extremadamente bajos, el ensayo MTS no puede cuantificar con precisión menos de 200 células por pocillo. (iii) Después de la separación, el enantiómero inactivo todavía contiene ~ 1–2% de enantiómero activo; por lo tanto, retiene algo de actividad cuando se usa en alta conc. de 1000 nM); otro conjunto de pocillos tratados de manera similar no se ensayó con MTS, y después de 4 lavados con PBS, se colocó en medio libre de estrógenos que contenía 10% de cd–FBS durante 4 semanas (cambio de medio cada 2 días) (nuevo crecimiento). Esto permite que las células supervivientes vuelvan a crecer. Después de 4 semanas, las células se analizaron usando MTS. En particular, no hubo nuevo crecimiento de células tratadas con (–) C–105 activo, y fuerte rebrote de células tratadas con BHPI. (Nota: la inspección visual de los pocillos confirmó que no había células en el pozo tratado durante 2 semanas con el activo (–)-105). Para probar si las células que volvieron a crecer después del tratamiento con BHPI eran resistentes a BHPI, se volvieron a tratar para otro ciclo (Tratamiento repetido de BHPI), y se ha demostrado que retienen la sensibilidad a la muerte por BHPI. (n = 8 réplicas biológicas $\pm$ SEM).

La **Figura 16** muestra experimentos a largo plazo que simulan la terapia, en los que (–)-105, pero no BHPI, erradica las células letales de cáncer de mama resistentes a la terapia. Células: MCF–7Y537S (MCF–7 ER α Y537S–luciferasa (derivada de células de cáncer de mama humano MCF–7. Las células MCF–7 son la línea más extendida de células de cáncer de mama humano. Esta es la mutación más letal y la segunda más común en cáncer de mama metastásico). Las condiciones experimentales son como en la leyenda de la Figura 15. El enantiómero (+)-105 es inactivo.

La **Figura 18** muestra que (–)–105 destruye las células de cáncer de mama resistentes a la destrucción por BHPI. Las células de cáncer de mama humano T47D que contienen ER α capaces de sobrevivir en 1 μ M de BHPI se seleccionaron mediante excrecencia clonal. Se evaluó el efecto de BHPI 100 nM y 1 μ M y (–)–105 sobre el crecimiento de las células T47D parentales (sensibles a BHPI) y los clones 1, 3, 8 y 11 de T47D parcialmente resistentes a BHPI. Se sembraron 4000 células por pocillo. El número de células fue por ensayo MTS a partir de una curva estándar de absorbancia frente al número de células. Conclusiones: BHPI bloqueó el crecimiento y mató muchas de las células T47D, y (–)–105 mató todas las células T47D. BHPI inhibió el crecimiento pero no pudo detener el crecimiento de los clones resistentes; (–)–105 bloqueó completamente el crecimiento de los clones resistentes y redujo su número de células por debajo del número de células original de 4000 células por pocillo. Por lo tanto, en 4 días (–)–105 destruyó algunas, pero no todas, las células resistentes.

Con respecto al mecanismo de acción de –105 para la respuesta a proteínas desplegadas anticipatoria (UPR), la **Figura 19** muestra que (–)–105 induce de manera potente la formación de ARNm de XBP–1 empalmado. Las células de cáncer de mama humano T47D–luciferasa ER α positivas se mantuvieron durante los tiempos indicados en vehículo (Ctl, control), BHPI 100 nm o (–)–105 nM 100 nM. En los momentos indicados se aisló el ARN, y se cuantificaron los niveles de ARNm de sp–XBP1 por qRT–PCR. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). La activación de (–) 105 o BHPI de la UPR activa el sensor de UPR IRE1 α , lo que produce la escisión del ARNm de XBP1 inactivo, a ARNm activo empalmado (sp)–XBP1.

El aumento del ARNm de sp–XBP1 es un marcador ampliamente utilizado para la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Por lo tanto, (–)–105 es un hiperactivador de UPR e inductor de sp–XBP1 mucho más fuerte que BHPI.

La **Figura 20** muestra que (–)–105, pero no BHPI, induce una inhibición casi cuantitativa de la síntesis de nuevas proteínas. Las células de cáncer de ovario humano ER α positivo Caov–3 se trataron durante los tiempos indicados con 1000 nm de BHPI o 1000 nM (–)–105. Las células se marcaron brevemente con ^{35}S –metionina. La incorporación de ^{35}S –metionina marcada en la proteína se determinó mediante precipitación con ácido tricloroacético y atrapando la proteína precipitada, pero no los aminoácidos libres, en pequeños filtros sin cenizas endurecidos Whatman. Después de solubilizar la proteína en los filtros con base y neutralizar con ácido, las muestras se contaron en un contador de centelleo líquido. Se muestra el porcentaje de inhibición promedio ($n > 3$) de la síntesis de proteínas en comparación con la muestra de tiempo 0. La inhibición casi cuantitativa de la síntesis de proteínas por (–)–105 es consistente con la inducción de (–)–105 de una hiperactivación letal

del brazo PERK de la UPR. Incluso las células que no crecen están degradando proteínas constantemente y produciendo nuevas proteínas. Las células en las que se inhibe casi la totalidad (> 90%) de la síntesis de proteínas no pueden crecer y finalmente morirán.

La **Figura 21** muestra el bloqueo del eflujo de calcio del retículo endoplasmático con 2-APB que inhibe la muerte de células cancerosas inducida por (–)-105. Se trataron células ER α positivas MCF-7 y TYS-Luc con vehículo DMSO (Veh), o BHPI o (–)-105 más o menos 2-APB durante los tiempos indicados. La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. A los 30 minutos, 2-APB bloqueó casi por completo la muerte celular inducida por (–)-105, y a los 45 y 60 minutos, bloqueó parcialmente la muerte celular. Esto es consistente con la inducción de (–)-105 de la poderosa activación letal de la vía anticipatoria de UPR. (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 22** muestra que –105 reduce los niveles de ATP intracelular; esta reducción en los niveles de ATP se bloquea inactivando la bomba SERCA con tapsigargina. Las células TYS-Luc se mantuvieron con vehículo DMSO (Veh), BHPI 1000 nM, 1000 nM –105 con y sin tapsigargina (THG) 10.000 nM durante los tiempos indicados. Los niveles de ATP se determinaron usando un equipo, y los niveles relativos de ATP fueron de una curva estándar. Obsérvese que en 1 hora, THG bloqueó completamente la disminución inducida por –105 en los niveles de ATP intracelular. (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 23** muestra el bloqueo de la disminución de los niveles de ATP con tapsigargina inhibiendo las muertes celulares inducidas por –105. Las células TYS-Luc se mantuvieron en vehículo DMSO (Veh) o BHPI, o (–)-105 con o sin tapsigargina (THG) durante los tiempos indicados. El bloqueo de la disminución de los niveles de ATP (Figura 19) con THG inhibió la muerte celular inducida por (–)-105. Obsérvese que cuando estaba presente THG, hubo una fuerte inhibición de la muerte celular inducida por (–)-105 en 1 hora. (n = 3 $\pm$ SEM).

Ejemplo 3. Datos adicionales para compuestos relacionados con 105.

La **Figura 24** muestra una comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para destruir células TDG. Las células TDG se incubaron durante 24 horas con 75 nM de BHPI o 75 nM de cada uno de los compuestos de prueba indicados: 4, 6 y ($\pm$)-105 (enantiómeros no separados). La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. Las estructuras están en la sección de Síntesis. Conclusión: En comparación con BHPI, los compuestos 4 y 105 exhiben una capacidad mucho mayor para matar las células TDG. (n = 3 $\pm$ SEM).

La **Figura 25** muestra una comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células TYS. Las células TYS se incubaron durante 24 horas con 35 nM de BHPI o 35 nM de cada uno de los compuestos de prueba indicados: 2, 4 y 105. La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Por lo tanto, en comparación con BHPI, los compuestos 4 y 105 muestran una capacidad mucho mayor para destruir las células TYS.

La **Figura 26** muestra una comparación de la capacidad de los compuestos de prueba 4, 6, 105 y BHPI para destruir células TYS. Las células TYS se incubaron durante 24 horas con 50 nM de BHPI o 50 nM de cada uno de los compuestos de prueba indicados: 4, 6 y 105. La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Por lo tanto, en comparación con BHPI, los compuestos 4 y 105 exhiben una mayor capacidad para destruir las células TYS.

La **Figura 27** muestra una comparación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células T47D. Las células T47D se incubaron durante 24 horas con 75 nM de BHPI o 75 nM de cada uno de los compuestos de prueba indicados: 4 y 6. La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Por lo tanto, el compuesto 4 muestra una capacidad mucho mayor para destruir las células de cáncer de mama que contienen el receptor de estrógeno de tipo salvaje.

En la **Figura 28**, ni los compuestos de prueba, ni el BHPI destruyen las células de mama MCF-10A ER α negativas no tumorigénicas. Las células ER α negativas MCF-10A se mantuvieron durante 24 horas en vehículo DMSO o 75 nM de BHPI o 75 nM de cada uno de los compuestos de prueba indicados: 4, 6 y 105. La muerte celular se determinó utilizando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Por lo tanto, a 75 nM, ni BHPI ni ninguno de los compuestos de prueba inducen una muerte significativa de las células MCF-10A ER α negativas.

La **Figura 29** muestra la evaluación de la capacidad de los compuestos de prueba y BHPI para matar células T47D. Las células T47D se trataron durante 24 horas con BHPI 100 nM, o con 100 nM de cada uno de los compuestos de prueba: 6, 8 y 105. ($n. s.$: no significativo). La muerte celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul tripán sobre la base de instrumentos. ($n = 3 \pm \text{SEM}$). Por lo tanto, en comparación con BHPI, los compuestos 105 muestran una mayor capacidad para matar células T47D.

La **Figura 30** compara la capacidad de BHPI y los compuestos de prueba para inhibir la proliferación de células T47D, TYS y TDG. Las células T47D estaban en un medio que

5 contenía 10 FBS (que contiene estrógeno), las células TYS-4 y TDG-1 estaban en un medio que contenía cd-FBS al 10% (con agotamiento de estrógeno). Las células se cultivan en placas a 2000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas en medio que contenía FBS o FBS tratado con carbón-dextrano (agotado en estrógenos endógenos), se
añadió la concentración indicada de cada compuesto (en DMSO a 1/1000 del volumen del medio). Después de 2 días se cambió el medio, y se agregaron de nuevo los compuestos. Después de 2 días adicionales (4 días en total), se utilizaron ensayos MTS para evaluar la proliferación celular. ($n = 6 \pm \text{S.E.M.}$). Por lo tanto, BHPI y los nuevos compuestos inhiben eficazmente la proliferación de las células T47D, TYS-4 y TDG-1. Los datos sugieren que
10 los compuestos 2, 4, 6 y 105 son más eficaces que BHPI para matar estas células de cáncer de mama ER α positivas.

Los datos adicionales se muestran en las **Figuras 31 y 33-43**. A través de una campaña de química medicinal, se descubrió que ($\pm$)-1 mostraba un fenotipo citotóxico inesperado (**Figura 36A**). Todas las terapias dirigidas conocidas para el receptor alfa de estrógeno (ER α) son citostáticas, lo que significa que solo previenen el crecimiento celular y no destruyen las células cancerosas. La cromatografía en columna quiral preparatoria proporcionó acceso a material enantioméricamente puro (**Ejemplo 4**) identificado por polarimetría como (-)-105 y (+)-105. La derivación química y la cristalografía de rayos X caracterizaron además el enantiómero activo que tiene la configuración (*R*) y el enantiómero
15 inactivo que tiene la configuración (*S*) (**Esquema 5**). Los datos biológicos (**Figura 36B y Ejemplo 4**) demuestran que (*R*)-1 es citotóxico para células ER α (MCF-7), con efectos mínimos observados en células ER α negativas (MDA-MB-231). Por lo tanto, el compuesto se renombró como SERK-F6, para "Selective Estrogen Receptor Killer" (Destructor del Receptor de Estrógeno Selectivo), con esta versión con seis flúor). La actividad dependiente
20 de la dosis de SERK-F6 se determinó frente a un panel de líneas de células cancerosas (**Figura 36C y Figura 37A**) para ER α .

Un aspecto importante de la terapia citotóxica es la capacidad de destruir cuantitativamente una población celular. SERK-F6 destruye cuantitativamente las líneas celulares ER α en un ensayo rápido de cristal violeta de 24 horas (**Figura 36D**) y en
30 experimentos de cultivo celular a largo plazo (**Figura 36E-F y Figura 37B**). SERK-F6 destruye a través de la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) anticipatoria (**Figura 38**). Los marcadores importantes de este mecanismo son los niveles aumentados de XBP1 empalmado (sp-XBP1) (**Figura 38A**), la rápida disminución de los niveles de ATP celular (**Figura 38B**) y la rápida inhibición de la síntesis de proteínas (**Figura 38C**).

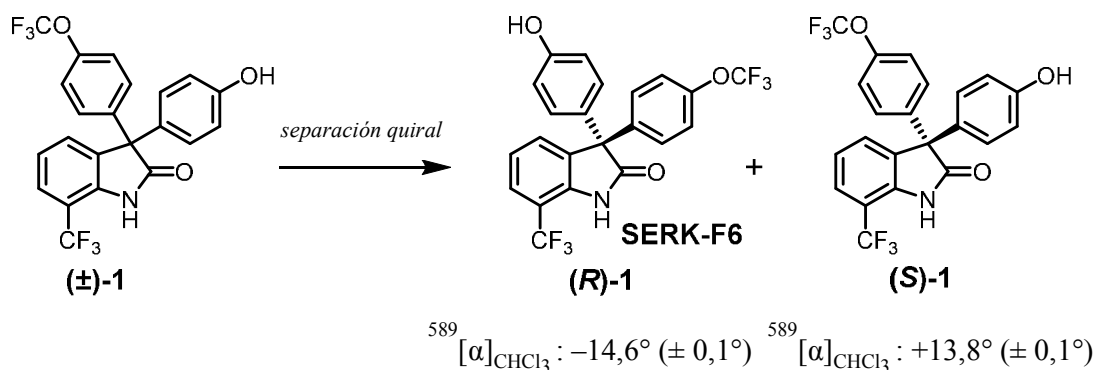
Se midió la farmacocinética de SERK-F6 en ratones (**Figura 40A–B**). Estudios adicionales mostraron que SERK-F6 era un penetrante de la barrera hematoencefálica (**Figura 40C–D**). Además, el tratamiento a largo plazo de SERK-F6 no elimina los tejidos ER α , según lo medido por los niveles circulantes de estradiol (**Figura 40E**). Estos datos demuestran que SERK-F6 puede alcanzar concentraciones biológicamente relevantes *in vivo*, y ser bien tolerado.

Para probar la eficacia de SERK-F6 para destruir tumores ER α positivos, se desarrollaron grandes tumores MCF-7 y luego se intervinieron con terapia. El tratamiento con SERK-F6 produce regresiones drásticas del tumor (**Figura 39A y Figura 40F–G**). Debido a que la terapia actual (es decir, fulvestrant, Fulv.) es citostática, no se obtienen efectos drásticos contra estos tumores grandes y establecidos. Además, el tratamiento diario con SERK-F6 no produjo ningún cambio en el peso murino durante el estudio, lo que demuestra la tolerancia de SERK-F6 *in-vivo* (**Figura 40H**). Además, para demostrar el mecanismo de acción *in vivo* de SERK-F6, se injertaron tumores MCF-7 en ratones y luego se trataron con SERK-F6. A continuación, se sacrificaron los ratones antes de la erradicación completa del tumor. Estos datos mostraron la activación de la UPR con aumentos en los niveles de P-PERK y P-eiF2alfa (**Figura 39B–E y Figura 40I–J**).

Debido a que las mutaciones ER α que conducen a la activación constitutiva y la resistencia a la terapia representan un desafío clínico, se demostró que SERK-F6 también puede abordar estos tumores resistentes. Por lo tanto, SERK-F6 erradica los tumores Y537S (es decir, la línea celular TYS) de una manera dependiente de la dosis y en administraciones de dosificaciones múltiples (es decir, administración i. p. y oral), y también fue tolerado (**Figura 41A–D y Figura 42B–C**). Luego del cese del tratamiento, los tumores no volvieron a crecer, lo que indica una erradicación completa del tumor (**Figura 42A**). Con una dosis subterapéutica más baja de SERK-F6 (es decir, 10 mg/kg oral), los tumores volvieron a crecer, pero el tratamiento repetido de estos tumores con dosis más altas de SERK-F6 demostró que estos tumores que han vuelto a crecer todavía son sensibles a SERK-F6 y no son resistente (**Figura 42D**). Este resultado muestra la importancia de la destrucción celular completa para erradicar el cáncer. El tratamiento con SERK-F6 también conduce a la destrucción de tumores mutantes D538G (línea celular TDG) (**Figura 41D–E**). El tratamiento con SERK-F6 se toleró nuevamente (**Figura 42E**) en dosis más altas y suficientes para erradicar tumores (**Figura 42F**). Si bien las dosis más bajas no erradican completamente los tumores, el tratamiento repetido de estos tumores con dosis más altas de SERK-F6 hace retroceder los tumores (**Figura 42G–H**).

Para confirmar que las regresiones tumorales no solo se observan con líneas celulares de fondo T47D (TYS y TDG), las células MCF-7 se trataron con mutaciones Y537S o D538G en sus proteínas ER α (células MYS y MDG, respectivamente) con SERK-F6. Se observaron regresiones drásticas del tumor (**Figura 41F-G** y **Figura 43A-D**). Nuevamente, se necesitan dosis más altas para respuestas tumorales completas, mientras que las dosis más bajas conducen a un crecimiento tumoral no resistente (**Figura 43 B-D**). El tratamiento con SERK-F6 también erradica la carga tumoral metastásica (**Figura 41I**).

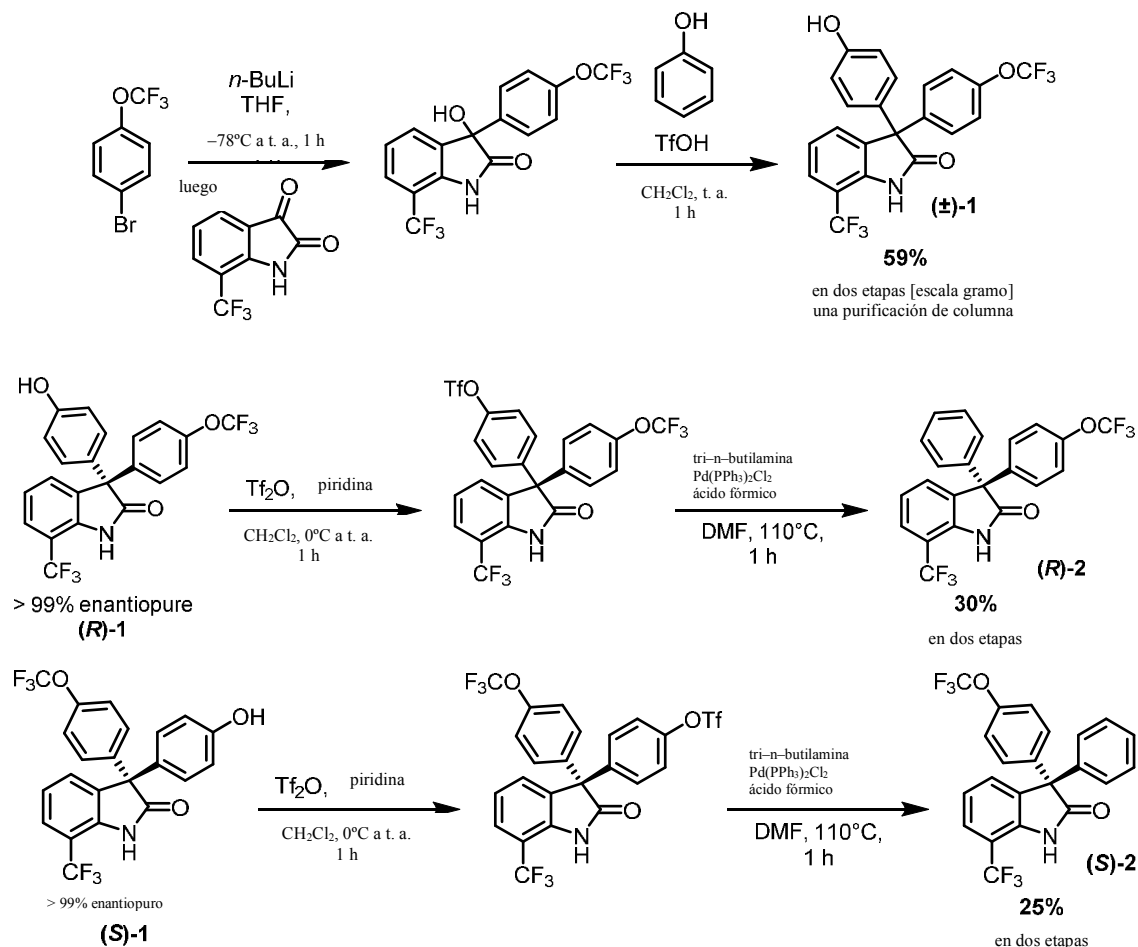
Ejemplo 4. Determinación de la configuración absoluta e IC₅₀ de los enantiómeros del Compuesto 1 (105).



Especie	IC ₅₀ (nM)	S. E. M.
(±)-1	42,6	1,9
(<i>R</i>)-1	20,3	0,9
(<i>S</i>)-1	> 1000	—

La separación quiral preparatoria en escala de gramos de (±)-1 produce (*R*)-1 y (*S*)-1 enantiopuros, con rotaciones ópticas opuestas (**Esquema 5**). Los valores de IC₅₀ de (±)-1, (*R*)-1 y (*S*)-1 contra células MCF-7 revelan que (*R*)-1 es la especie activa, denominada **SERK-F6**. Los valores se obtuvieron después de 24 horas de incubación utilizando un ensayo de fluorescencia azul Alamar normalizado a los controles vivos y muertos (tratados con vehículo y raptinal). El IC₅₀ de (*S*)-1 es > 1 μM. Error mostrado como S. E. M.

Esquema 5. Secuencia sintética para acceder a derivados cristalizables (**R**)-1 y (**S**)-1: determinación de rayos X de las estructuras de (**R**)-2 y (**S**)-2.



Ejemplo 5. Formas de dosificación farmacéuticas.

Las siguientes formulaciones ilustran formas de dosificación farmacéuticas representativas que se pueden usar para la administración terapéutica o profiláctica de un compuesto de una fórmula descrita en el presente documento, un compuesto descrito específicamente en el presente documento o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo (en lo sucesivo denominado "Compuesto X"):

	<u>(i) Comprimido 1</u>	<u>mg/comprimido</u>
15	'Compuesto X'	100,0
	Lactosa	77,5
	Povidona	15,0
	Croscarmelosa sódica	12,0
	Celulosa microcristalina	92,5
20	Estearato de magnesio	3,0
		300,0

	<u>(ii) Comprimido 2</u>	<u>mg/comprimido</u>
	'Compuesto X'	20,0
5	Celulosa microcristalina	410,0
	Almidón	50,0
	Glicolato de almidón sódico	15,0
	Estearato de magnesio	<u>5,0</u>
		500,0
10	<u>(iii) Cápsula</u>	<u>mg/cápsula</u>
	'Compuesto X'	10,0
	Dióxido de silicio coloidal	1,5
	Lactosa	465,5
15	Almidón pregelatinizado	120,0
	Estearato de magnesio	<u>3,0</u>
		600,0
	<u>(iv) Inyección 1 (1 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
20	'Compuesto X' (forma de ácido libre)	1,0
	Fosfato sódico dibásico	12,0
	Fosfato sódico monobásico	0,7
	Cloruro de sodio	4,5
	1,0 N Solución de hidróxido de sodio	c. s.
25	(ajuste de pH a 7,0–7,5)	
	Agua para inyección	c. s. agregar 1 mL
	<u>(v) Inyección 2 (10 mg/mL)</u>	<u>mg/mL</u>
	'Compuesto X' (forma de ácido libre)	10,0
30	Fosfato sódico monobásico	0,3
	Fosfato sódico dibásico	1,1
	Polietilenglicol 400	200,0
	0,1 N Solución de hidróxido de sodio	c. s.
	(ajuste de pH a 7,0–7,5)	
35	Agua para inyección	c. s. agregar 1 mL
	<u>(vi) Aerosol</u>	<u>mg/can</u>
	'Compuesto X'	20
	Ácido oleico	10
40	Tricloromonofluorometano	5000
	Diclorodifluorometano	10.000
	Diclorotetrafluoroetano	5000
	<u>(vii) Gel tópico 1</u>	<u>% en peso</u>
45	'Compuesto X'	5%
	Carbómero 934	1,25%
	Trietanolamina	c. s.
	(ajuste de pH a 5–7)	

	Metil parabeno	0,2%
	Agua purificada	c. s. a 100 g
	<u>(viii) Gel tópico 2</u>	<u>% en peso</u>
5	'Composición X'	5%
	Metilcelulosa	2%
	Metil parabeno	0,2%
	Propilo parabeno	0,02%
	Agua purificada	c. s. a 100 g
10	<u>(ix) Ungüento tópico</u>	<u>% en peso</u>
	'Compuesto X'	5%
	Propilenglicol	1%
	Base de ungüento anhidra	40%
15	Polisorbato 80	2%
	Metil parabeno	0,2%
	Agua purificada	c. s. a 100 g
	<u>(x) Crema tópica 1</u>	<u>% en peso</u>
20	'Compuesto X'	5%
	Cera de abejas blanca	10%
	Parafina líquida	30%
	Bencil alcohol	5%
	Agua purificada	c. s. a 100 g
25	<u>(xi) Crema tópica 2</u>	<u>% en peso</u>
	'Compuesto X'	5%
	Ácido esteárico	10%
	Gliceril monoestearato	3%
30	Polioxietileno estearil éter	3%
	Sorbitol	5%
	Isopropil palmitato	2 %
	Metil Parabeno	0,2%
	Agua purificada	c. s. a 100g

35 Estas formulaciones se pueden preparar mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas anteriores se pueden variar de acuerdo con técnicas farmacéuticas bien conocidas para adaptarse a diferentes cantidades y tipos de ingredientes activos de "Compuesto X". La

40 formulación en aerosol (vi) puede usarse junto con un dosificador de aerosol de dosis medidas estándar. Además, los ingredientes y las proporciones específicos tienen fines ilustrativos. Los ingredientes se pueden intercambiar por equivalentes adecuados, y las proporciones se pueden variar, de acuerdo con las propiedades deseadas de la forma de dosificación de interés.

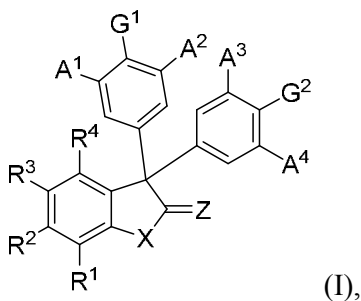
45

Si bien se han descripto anteriormente formas de realización específicas con referencia a las formas de realización y ejemplos descriptos, tales formas de realización son solo ilustrativas, y no limitan el alcance de la invención. Se pueden realizar cambios y modificaciones de acuerdo con la experiencia ordinaria en la técnica sin apartarse de la invención en sus aspectos más amplios como se define en las siguientes reivindicaciones.

Todas las publicaciones, patentes y documentos de patentes se incorporan aquí como referencia, como si se incorporaran individualmente como referencia. No deben entenderse a partir de ellos limitaciones incompatibles con esta divulgación. La invención se ha descripto con referencia a diversas formas de realización y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, debe entenderse que se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones sin dejar de encontrarse dentro del espíritu y alcance de la invención.

La invención reivindicada es:

1. Un compuesto de Fórmula I:



o una de sus sales o solvatos;

en donde

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son cada uno de manera independiente H, halo, $-OR^A$, $-SR^A$, $-N(R^A)_2$, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, o heteroarilo;

A^1 , A^2 , A^3 y A^4 son cada uno de manera independiente H, halo, o alquilo;

G^1 es halo, $-OR^B$, $-SR^B$, $-S(=O)_2R^B$, o alquilo;

G^2 es halo, $-OR^C$, $-SR^C$, $-S(=O)_2R^C$, o alquilo;

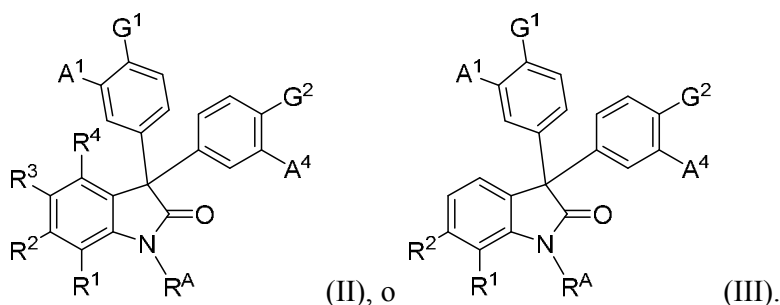
X y Z son cada uno de manera independiente O, S, o $-NR^D$; y

R^A , R^B , R^C y R^D son cada uno de manera independiente H o alquilo, en donde, cuando están presentes, $-OR^B$ y $-OR^C$ no son ambos $-OH$;

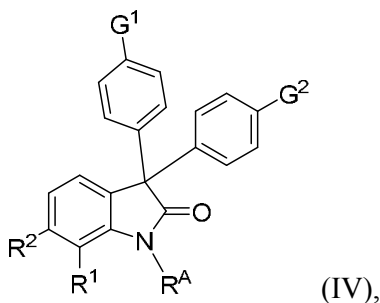
en donde cada alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo, y heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes.

2. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es el enantiómero (*S*).
3. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es el enantiómero (*R*).
4. El compuesto de la reivindicación 1 en donde R^A , R^B , R^C y R^D son cada uno de manera independiente H o $-(C_1-C_6)$ alquilo, y R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son cada uno de manera independiente H, halo, o $-(C_1-C_6)$ alquilo.
5. El compuesto de la reivindicación 1 en donde A^1 , A^2 , A^3 y A^4 son cada uno de manera independiente H o halo, y G^1 es $-OR^B$.
6. El compuesto de la reivindicación 1 en donde X es $-NR^D$ y Z es O.

7. El compuesto de la reivindicación 1 en donde R^1 es CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , o CF_2CF_3 .
8. El compuesto de la reivindicación 1 en donde G^1 es $-OR^B$, y R^B es CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , o CF_2CF_3 .
9. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es un compuesto de Fórmula II o Fórmula III:

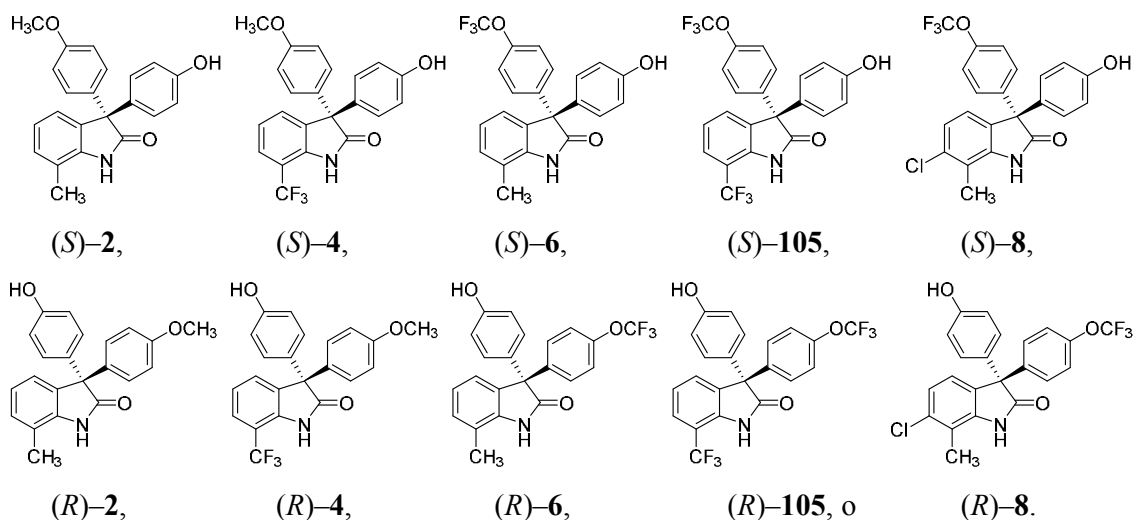


10. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es un compuesto de Fórmula IV:

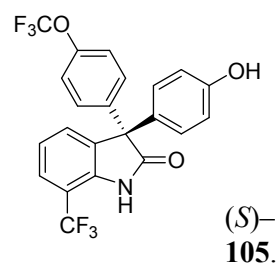
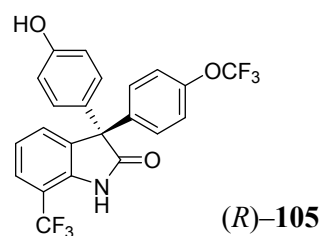


en donde G^1 es $-OR^B$, y R^B y R^1 son cada uno de manera independiente alquilo o cicloalquilo, en donde el alquilo y cicloalquilo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos halo.

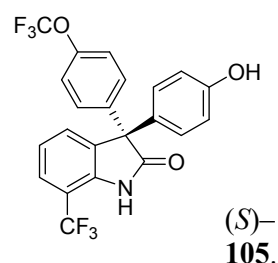
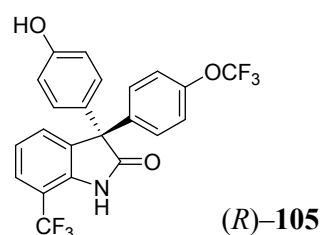
11. El compuesto de la reivindicación 1 en donde uno o más átomos de hidrógeno son deuterio o tritio, uno o más átomos de carbono son un isótopo de carbono, o una de sus combinaciones.
12. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es cualquiera de los compuestos (*S*)- o (*R*)-**2**, **4**, **6**, **8** o **105**:



13. El compuesto de la reivindicación 12 en donde el compuesto es levogiratorio.
14. El compuesto de la reivindicación 12 en donde el compuesto es dextrógiratorio.
15. El compuesto de la reivindicación 12 en donde el compuesto es (*R*)-105 o (*S*)-105.
16. El compuesto de la reivindicación 15 en donde el compuesto es (*R*)-105.
17. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto tiene una afinidad de unión para el receptor de estrógeno alfa (ER α), y el IC₅₀ de la afinidad de unión es inferior a alrededor de 500 nM.
18. Una composición que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y un segundo fármaco.
19. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en combinación con un diluyente, portador, excipiente, o tampón farmacéuticamente aceptable.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19 en donde el compuesto es una mezcla racémica de (*R*)-105 y (*S*)-105:



21. Un método de tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un sujeto con cáncer ER α positivo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–17, de modo de tratar el cáncer en el sujeto.
22. El método de la reivindicación 21, en donde el compuesto destruye o inhibe el crecimiento de cáncer ER α positivo mediante la hiperactivación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático.
23. El método de la reivindicación 21, en donde el compuesto es una mezcla racémica de (R)-105 y (S)-105:



24. El método de la reivindicación 21, en donde el cáncer ER α positivo es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, carcinoma de cuello uterino, o cáncer endometrial.
25. El método de la reivindicación 21, en donde el compuesto es administrado por vía oral o por inyección.
26. Un uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1–17 para el tratamiento de una enfermedad ER α positiva en un sujeto que lo necesita, en donde se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, de modo de tratar el cáncer en el sujeto.
27. El uso de la reivindicación 26, en donde la enfermedad ER α positiva es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, carcinoma de cuello uterino, o cáncer endometrial.

RESUMEN

Conjunto de biomoduladores ER α de moléculas pequeñas que destruyen las células cancerosas de mama, ovario y endometrio ER α positivas resistentes a la terapia. Estas pequeñas moléculas tienen un mayor potencial terapéutico debido a la mayor capacidad para destruir las células de cáncer de mama resistentes a la terapia en comparación con BHPI y otras terapias convencionales (terapias endocrinas, tamoxifeno y fulvestrant/ICI). Los nuevos compuestos no solo inhiben la proliferación de las células cancerosas, sino que también realmente las destruye, lo que evita la reactivación de los tumores años después.