

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 316**

51 Int. Cl.:

C07D 311/30 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2012** **PCT/CN2012/088016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013** **WO13104263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2012** **E 12864757 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** **EP 2803665**

54 Título: **Síntesis del compuesto de polihidroxi benzopirano cetona y efecto antitumoral del mismo**

30 Prioridad:

13.01.2012 CN 201210011031
25.12.2012 CN 201210573072

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2017

73 Titular/es:

BEIJING SHENOGEN PHARMA GROUP LTD.
(100.0%)
Suite A205 No. 5 Shangdi Kaituo Road
Haidian, Beijing 100085, CN

72 Inventor/es:

MENG, KUN;
DING, HONGXIA y
LI, JIN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 627 316 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis del compuesto de polihidroxi benzopirano cetona y efecto antitumoral del mismo

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos de polihidroxi cromenona, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y una composición farmacéutica que comprende los compuestos o similares. La presente invención se refiere también al uso de los compuestos, sus sales farmacéuticamente aceptables, y una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con el tumor.

Estado de la técnica

- 10 Los estrógenos son un grupo de hormonas que están implicadas en muchas funciones fisiológicas críticas en el cuerpo humano. Las funciones de los estrógenos incluyen la promoción del desarrollo de los órganos sexuales femeninos, la preparación completa de la mama y el útero para el embarazo y la lactancia materna después del parto. Los estrógenos también juegan un papel importante en el mantenimiento de las funciones cardiovasculares adecuadas y la densidad ósea. Es bien sabido que los estrógenos pueden estimular la proliferación celular y pueden aumentar el riesgo de las mujeres que sufren de cáncer, especialmente cáncer de mama y cáncer de útero.

- 15 Los estrógenos se unen a receptores de estrógenos en células diana para regular las funciones celulares. Dos tipos de receptores de estrógeno se encuentran en las células humanas (ER), ER- α y ER- β . Tienen una estructura de proteína similar, cada uno tiene tres dominios de función separados pero interactuantes: dominio terminal N (dominio A/B), dominio de unión al ADN central (dominio C) y dominio de unión al ligando terminal C (dominio D/E/F). El dominio terminal N tiene una función de activación independiente del ligando (AF-1), que está implicada en la interacción con coactivadores y la activación transcripcional de genes diana en ausencia de ligandos. El dominio de unión al ADN desempeña un papel importante en la dimerización del receptor y la secuencia de ADN especial de unión. El dominio de unión al ligando terminal C media la unión al ligando y tiene una función de transactivación dependiente del ligando (AF-2), para activar la transcripción génica en presencia de ligandos.

- 25 El ER- α de longitud completa se identifica como una proteína de 66 kDa y se denomina ER- α 66. ER- α 66 contiene los tres dominios de función. Una variante de empalme de ER- α 66 se descubre posteriormente y se denomina como ER- α 46. ER- α 46 tiene un peso molecular de aproximadamente 46KDa y carece del dominio AF-1 terminal N de ER- α 66. Recientemente, se identificó una novedosa variante de ER- α de 36kDa, se identifica ER- α 36. Carece del dominio AF-1 terminal N y del dominio AF-2 terminal C de ER- α 66 (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1023-1027 (2005)).

- 30 Se cree que ER- α 66 media la proliferación celular estimulada por estrógenos a través de la activación transcripcional de sus genes diana. La unión de estrógeno a ER- α 66 activa el dominio de transactivación de ER- α 66 y por lo tanto estimula la expresión de genes diana en dirección 3' y conduce eventualmente a la proliferación celular. ER- α 46 se encuentra para mediar la síntesis de NO rápida iniciada por la membrana y estimulada con estrógenos (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 100: 4807-4812 (2003)). También se muestra que ER- α 46, que carece del dominio AF-1, inhibe la actividad de AF-1 de ER- α 66 (Flouriot, G., EMBO, 19, 4688-4700, (2000)). Dado que ER- α 36 carece de ambos dominios de activación transcripcional AF-1 y AF-2, este funciona como un inhibidor negativo dominante para inhibir ambas funciones de AF-1 y AF-2 de ER- α y ER- β . Además, el ER- α 36 se localiza principalmente en la membrana de plasma y media la señalización mitogénica de estrógenos iniciada por membrana que estimula la proliferación celular. (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1023-1027 (2005); Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 103: 9063-9068 (2006)).

Estudios extensos han mostrado que la señalización de estrógenos está mediada a través de vías clásicas de activación de la transcripción nuclear, así como vías de señalización iniciadas por membrana no clásicas. Parece que tanto ER- α 66 como ER- α 46 funcionan principalmente en el núcleo, mientras ER- α 36 funciona principalmente por fuera del núcleo.

- 45 También se muestra que ER- α 36 carece de la hélice 8-12 del dominio de unión al ligando del ER- α 66 original, que cambia totalmente la especificidad de unión al ligando de ER- α 36. De este modo, ER- α 36 se puede unir a diferentes ligandos de los unidos a ER- α 66 y ER- α .

Como las enfermedades relacionadas con el receptor de estrógeno continúan afectando a muchos individuos, sigue existiendo la necesidad urgente de descubrir nuevos compuestos y métodos útiles para prevenir y/o tratar tales enfermedades.

- 50 El documento CN101104611 describe un compuesto 3-metoxi-flavonoide que se puede usar como un fármaco contra el cáncer.

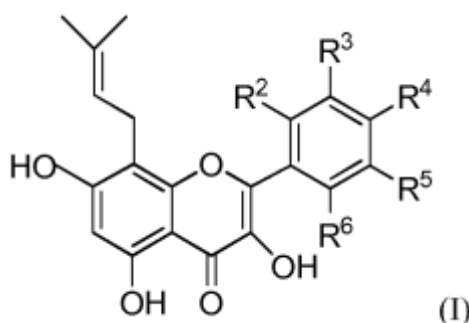
El documento CN102018698 describe composiciones farmacéuticas y métodos para modular las funciones del receptor de estrógeno hER-alfa36, para prevenir y/o tratar enfermedades mediadas por el receptor de estrógeno hER-alfa36, para prevenir y/o tratar la osteoporosis, para inducir la muerte celular y/o inhibir la proliferación celular y para prevenir y/o tratar enfermedades que implican una proliferación celular anormal tal como cánceres.

- 5 El documento WO2011047595 describe el uso de compuestos de hidroxibenzopirona en la preparación de medicamentos útiles para tratar la leucemia.

El documento WO2008100977 describe ésteres de ácidos alquilcarbámicos que son inhibidores de la actividad de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). También se describen procesos para la preparación de ésteres de compuestos de ácido alquilcarbámico, composiciones que los incluyen, y métodos de uso de los mismos.

10 Resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos de cromenona mostrados como fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para modular el nuevo receptor de estrógeno ER- α 36 y una composición farmacéutica que comprende los compuestos o similares.



15 En la que:

R^2 , R^3 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C_{1-4}), alquilo (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno, halógeno, ciano, alcoxi (C_1-C_4) sustituido con uno o más átomos de halógeno; y R^4 es alquilo (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno.

Breve descripción de las figuras

- 20 La figura 1 muestra resultados de Western blot que representan la expresión de ER- α 66, ER- α 46 y ER- α 36 en muestras de cáncer de mama humano. Carril 1: tejido de mama normal; Carril 2: carcinoma ductal infiltrante; Carril 3: carcinoma ductal infiltrante; Carril 4: carcinoma ductal invasivo; Carril 5: carcinoma lobular infiltrante; Carril 6: carcinoma lobular infiltrante; Carril 7: carcinoma ductal no invasivo.

- 25 La figura 2 (figura superior) muestra el resultado de tinción por inmunofluorescencia de células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 son líneas celulares ER-negativas de cáncer de mama que carecen de ER- α 66 y ER- α 46, teñidas con un anticuerpo que se une específicamente a ER- α 36 (se muestra en la figura izquierda marcada con "ER- α 36 Ab": positivo mostrado en verde). El núcleo celular también se tiñe con 4,6-diamidina-2-fenilindol (mostrado en la figura central marcada con "DAPI": tinción positiva mostrada en azul). Las señales de tinción fusionadas se muestran en un carril con la etiqueta "merge". Se observa tinción negativa cuando el anticuerpo se preincuba con péptidos inmunógenos que se unen al anticuerpo (figura inferior).

- 30 La figura 3 muestra resultados de Western blot que representan la expresión de ER- α 36 en diferentes líneas celulares tumorales. Carril 1: 293 líneas celulares epiteliales renales humanas que tienen expresión transitoria de ER- α 36; Carril 2-4: líneas celulares SK-BR-3 de cáncer de mama humano de diferentes laboratorios; Carriles 5-7: líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama humano de diferentes laboratorios; Carril 8-9: líneas celulares HL-60 de leucemia humana de diferentes laboratorios; Carril 10-11: líneas celulares MV-4-11 de leucemia humana de diferentes laboratorios; Carril 12-13: líneas celulares K562 de leucemia mieloide crónica humana de diferentes laboratorios; Carril 14: línea celular A2780 de cáncer de hígado; Carril 15: línea celular HEL-7402 de cáncer de hígado; Carril 16: línea celular HEL-9204 de cáncer de hígado; Carril 17: línea celular primaria Hep-11 de cáncer de hígado de un paciente; Carril 18: línea celular primaria Hep-12 de cáncer de hígado de un paciente.

- 40 La figura 4-8 muestra la inhibición *in vitro* de la línea celular BGC-823 de cáncer gástrico, la línea celular H460 de cáncer de pulmón, la línea celular LS174T de carcinoma de colon, la línea celular PANC-1 de cáncer de páncreas y la línea celular PC-3 de cáncer de próstata con el compuesto 1, ensayado por el método MTT. Los resultados muestran

que el compuesto 1 tiene una inhibición dominante en estas células de cáncer con una buena dosis de dependencia. IC50 está en el intervalo de 1-4μM.

La figura 9 muestra el peso medio del tumor (bar a) de ratones desnudos que portan tumor de cáncer de mama humano BCAP-37 después de 20 días de administración continua respectivamente con control positivo de tamoxifeno (0.7 mg/ratón/día), compuesto 1 (0.7 mg/ratón/día) y el control negativo del vehículo (0.2 mg/ratón/día), y el resultado muestra la inhibición del compuesto sobre los tumores.

La figura 10 muestra la curva de crecimiento tumoral de células Daudi de linfoma B humanas que llevan ratones desnudos administrados continuamente respectivamente con control positivo de rituximab, compuesto 1 (0.7 mg/ratón/día) y control negativo de vehículo (0.2 mL/ratón/día) durante 21 días.

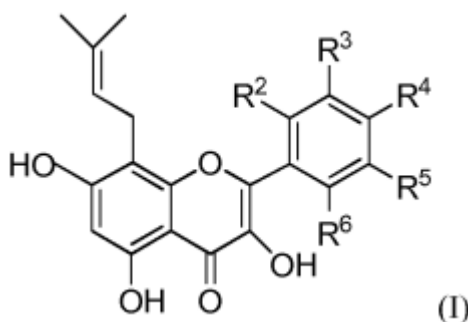
La figura 11 muestra el peso medio del tumor del carcinoma endometrial humano Ishikawa que lleva ratones desnudos después de 20 días de administración continua respectivamente con control positivo de DMPA (acetato de progesterona depomedroxi) (120 mg/kg), compuesto 1 de dosis baja (17.5 mg/kg), dosis media (35 mg/kg), dosis alta (70 mg/kg) y control negativo del vehículo (0.2 mL/ratón/día). El compuesto 1 tiene una inhibición dominante en el crecimiento tumoral de ratones portadores de tumores, y el efecto de inhibición es mayor que el del fármaco de control.

Descripción detallada de la invención

Compuestos y derivados

En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan los compuestos de cromenona, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y la composición farmacéutica que comprende el compuesto o similares. Pueden funcionar para regular el receptor de estrógeno ER-α36, prevenir y/o tratar la enfermedad mediada por el receptor ER-α36, tal como cáncer, etc.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I), las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y la composición farmacéutica que comprende el compuesto o similares, en la que:



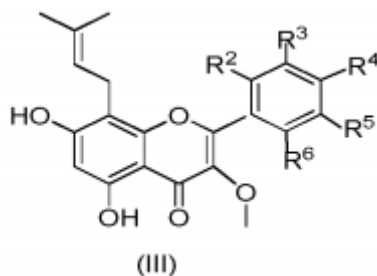
R², R³, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁₋₄), alquilo (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno, halógeno, ciano, y alcoxi (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno; y R⁴ es alquilo (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno.

En una cierta realización, el compuesto de fórmula (I) comprende los compuestos

en los que:

R², R³, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, alquilo (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno, halógeno, ciano, y alcoxi (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno; y R⁴ es alquilo (C₁₋₄) sustituido con uno o más átomos de halógeno.

También se describen en este documento, como referencia, compuestos de fórmula (III) que tienen la siguiente estructura:



En la que,

5 R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C_1 - C_4), alquilo (C_1 - C_4) sustituido con uno o más átomos de halógeno, halógeno, ciano, y alcoxi (C_1 - C_4) sustituido con uno o más átomos de halógeno, y R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 no son simultáneamente hidrógeno,

y cuando R^3 y R^5 son hidrógeno, R^4 no es cloro.

Los compuestos especialmente preferidos de fórmula (I) están comprendidos, pero no limitados a los siguientes compuestos:

2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona.

10 Los siguientes compuestos se describen en este documento como referencia:

2-(4-fluorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(3-fluoro-4-clorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(4-clorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(4-trifluorometoxifenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

15 2-(3,4-diclorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(4-bromofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(3,4-difluorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(4-trifluorometilfenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

20 2-(4-trifluorometoxifenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

2-(4-bromofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona;

25 Los compuestos y los derivados de los mismos en la presente invención se nombran de acuerdo con el sistema de nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) o el Sistema de Nomenclatura CAS (Chemical Abstract Service, Columbus, OH)

Los siguientes son la definición de los términos utilizados en la presente invención. A menos que se indique lo contrario, las definiciones primarias de los grupos o los términos que comprenden un grupo independiente o una parte de otros grupos son aplicables a toda la descripción.

30 El término "sustituido" significa que un átomo de hidrógeno de una molécula ha sido reemplazado por un átomo o molécula diferente. El átomo o molécula que reemplaza al átomo de hidrógeno se designa como un "sustituyente".

El valor mínimo y máximo del número de átomo de carbono del C_nH_n - se indica con el prefijo, tal como, el prefijo de alquilo (C_a - C_b) significa cualquier grupo alquilo que comprende el número de átomos de carbono desde "a" a "b". De este modo, tal como alquilo (C_1 - C_6) significa el alquilo que comprende átomos de carbono desde 1 a 6.

El término "alcoxi" significa el grupo lineal o ramificado de cadena grasa monovalente saturado unido con un átomo de oxígeno en un extremo, incluyendo, pero no limitado a metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, iso-butoxi, tert-butoxi o similares.

El término "alquilo" significa, cadena grasa saturada lineal o ramificada, monovalente, que comprende, pero no se limita al grupo tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, iso-pentilo, hexilo o similares.

5 El término "halógeno" o "átomo de halógeno" significa el átomo de cloro, bromo, flúor y yodo o el grupo correspondiente.

10 El término "heteroarilo" significa un grupo aromático de monociclo o policiclo en el que uno o más átomos de carbono están sustituidos por uno o más heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Ejemplos de anillos heterocicloalquilo incluyen pero no se limitan a benzofuranilo, benzotiofenilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzopiranoilo, furilo, imidazolilo, indazolilo, indolizinoilo, indolilo, isobenzofurilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazol, isoxazol, naftiridinilo, oxadiazolilo, oxazinilo, oxazolilo, ftalazinilo, pteridinilo, guaninilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirido [3,4-b] indolilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, quinolizilo, quinolinilo, quinoxalinilo, tiadiazolilo, tiatrizolilo, tiazolilo, tienilo, triazinilo, triazolilo, xantenilo o similares.

El término "-oxo" significa un grupo carbonilo formado por la combinación de un(os) átomo(s) de carbono y un(os) átomo(s) de oxígeno.

15 También se consideran los solvatos de los compuestos de la presente invención. También se describen profármacos en este documento. El término "profármaco" se refiere a un compuesto que es un precursor de fármaco que, tras la administración a un sujeto, libera el fármaco activo in vivo a través de un proceso químico o el metabolismo (por ejemplo, al ser llevado a pH fisiológico o a través de la actividad enzimática). Se puede encontrar una discusión de la síntesis y uso del profármaco en "Prodrugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 of the ACS Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. El término "profármaco" puede incluir un precursor metabólico de un compuesto de la presente invención. El profármaco puede ser inactivo cuando se administra a un sujeto, pero se puede convertir in vivo en un compuesto de fórmula (I) de la invención. El profármaco puede ser compuesto naturalmente existente o compuestos de síntesis.

25 El compuesto de fórmula (I) en la presente invención puede estar en una forma no solvatada, o solvatada, tal como farmacéuticamente hidratada, etanolada o similares. Y se pretende que la presente invención incluya todos los solvatos y no-solvatos de los compuestos. El solvato preferido del compuesto de fórmula (I) es hidratado.

30 Todos los estereoisómeros de los compuestos, tales como posibles estereoisómeros a partir del átomo de carbono asimétrico del grupo sustituyente R de fórmula (I) incluyendo enantiómero y diastereoisómero están dentro del alcance de la presente invención. La estereoisomería y la mezcla de los compuestos mostrados en la fórmula (I) incluyendo la mezcla racémica son también parte de la presente invención. Además, todos los isómeros geométricos e isómeros de posición tales como, si el compuesto de fórmula (I) tiene un doble enlace, el cis y el trans y la mezcla de los mismos están todos dentro del alcance de la presente invención.

35 Las mezclas diastereoméricas se pueden separar en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias químicas físicas por métodos bien conocidos para los expertos en el arte tales como por cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado, separando luego los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereómeros a los correspondientes enantiómeros puros.

Además, algunos de los compuestos de fórmula (I) pueden ser atropisómeros (por ejemplo, biarilos sustituidos), que también se consideran como parte de la invención.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que el portador, vehículo, diluyentes, excipiente(s), y/o sal es/son generalmente compatibles química y/o físicamente con los otros ingredientes que comprenden la formulación y fisiológicamente compatibles con el receptor de los mismos.

45 El término "sales" y "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sal de ácido y/o sal de base formada por compuestos de fórmula (I) o estereoisómero de los mismos y base y ácido inorgánico y/u orgánico. Las sales y sales farmacéuticamente aceptables también comprenden sal anfótera (sal intramolecular) y sal de amonio cuaternario tal como sal de alquilamonio. Las sales se pueden obtener directamente después del aislamiento y purificación. Además, las sales se pueden obtener a partir de los compuestos de fórmula (I) o el estereoisómero, profármaco de los mismos, mezclado con ácido o base apropiados (por ejemplo, equivalente). Las sales se pueden recoger filtrando el precipitado de la solución o por evaporación del solvente, o por liofilización después de la reacción en el medio acuoso.

50 Las sales de adición de ácido incluyen bromhidrato, yodhidrato, clorhidrato, sulfato, hidrosulfato, nitrato, acetato (incluyendo las sales formadas con ácido acético o tricloroacético, por ejemplo, trifluoroacético), oxalato, alginato, ascorbato, aspartato, butirato, alcanfor, alcanfor sulfonato, propionato de ciclopentilo, digluconato, etilen sulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, 2-naftaleno sulfonato, nicotinato, persulfato, 3-fenil propionato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, benceno sulfonato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato,

fumarato, succinato, tartrato, tiocianato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, dodecilsulfonato, adipato o similares.

Las sales básicas (por ejemplo: la sal formada con carboxi o fenoxi del sustituyente R) incluyen amonio, la sal de metal alcalino (tal como sodio, litio y potasio), metal alcalinotérreo (tal como calcio y magnesio), la sal formada con una base orgánica (tal como amina orgánica) (incluyendo, pero sin limitarse a, dibenciletilenamina, dicitclohexilamina, hidrabamina, N-metil-D-glucosamina, tetrabutilamina) y las sales formadas con aminoácidos tales como arginina, lisina o similares. Además, las sales básicas incluyen amonio cuaternario formado con un agente alcalino que comprende nitrógeno, y no se limita a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina o similares. Para ejemplos adicionales véase, Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

También es posible que los compuestos de fórmula (I) puedan existir como isómeros tautómeros en equilibrio, y todas estas formas se incluyen dentro del alcance de la invención.

En una realización, los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I), que son idénticos a los citados en este documento, pero por el hecho de que uno o más átomos es/están reemplazados por otro átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la que comúnmente existe en la naturaleza se proporcionan en la presente invención. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en compuestos de fórmula (I) incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl . Los compuestos de fórmula (I) que comprenden los isótopos anteriores y/o los de otros átomos, sus estereoisómeros y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos o estereoisómeros están destinados a estar dentro del alcance de la presente invención.

Algunos compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I), por ejemplo, los compuestos marcados con ^3H y ^{14}C o similares se pueden usar en ensayos de distribución de tejidos de compuesto y/o sustrato. Debido a que los isótopos de tritio (esto es, ^3H) e isótopos de carbono 14 (esto es, ^{14}C) son particularmente preferidos por su relativa facilidad de preparación y fácil detección. Además, algunos isótopos tales como deuterio (esto es, ^2H) pueden proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, (por ejemplo, semivida aumentada in vivo, o requisitos de dosificación reducidos) y, por tanto, pueden ser preferidos en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (I) se pueden preparar generalmente por métodos conocidos para un experto en el arte, tales como sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente por reactivo no marcado isotópicamente.

Uso de la invención

El compuesto de la presente invención es un nuevo modulador para el receptor de estrógeno ER- α 36, y puede modular la función de ER- α 36 en células in vivo e *in vitro*. Por lo tanto, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se puede usar para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades a través de ER- α 36, especialmente relacionadas con el tumor.

También se describe en este documento un método para modular la función de ER- α 36 en las células. El método comprende administrar el compuesto de fórmula (I) a células que expresan de forma endógena o exógena ER- α 36 por ingeniería genética, también, a células con o sin otro receptor de estrógenos (tales como ER- α 66, ER- α 46 y ER- β). En un método descrito, las células expresan de forma endógena ER- α 36. En otro método descrito, la célula es una célula cancerosa que expresa de forma endógena ER- α 36. Las células que expresan ER- α 36 comprenden, pero no se limitan a, las células de cáncer de mama, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, cáncer de pulmón, mieloma, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de colon y cáncer gástrico. En un método adicional descrito en el presente documento, las células que expresan ER- α 36 son cáncer de mama, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, cáncer endometrial y células de cáncer de ovario que expresan de forma endógena ER- α 36. Las células de cáncer de mama que expresan ER- α 36 comprenden, pero no se limitan a las células de MCF7, MDA-MB-231 y SKBR-3. Las células de leucemia comprenden, pero no se limitan a, las células de K562, MV-4-11, SUM159, HL-60 y Molt-4. Las células de cáncer endometrial que expresan ER- α 36 comprenden, pero no se limitan a las células Hec1A. Las células de cáncer de hígado que expresan ER- α 36 comprenden, pero no se limitan a A2780, BEL7402, BEL7404, HEL-9204, Hep2G, Hep3B y células madre de cáncer hepático primario Hep-12 originadas de pacientes. Las células de linfoma que expresan ER- α 36 comprenden, pero no se limitan a Daudi. La expresión de ER- α 36 endógeno se puede aumentar o disminuir mediante el tratamiento de un reactivo que comprende suero, E2 β (17 β -estradiol), tamoxifeno y fulvestrant. (ICI 182.780)

También se describe un método para preparar las células que expresan ER- α 36 exógeno. Las células se pueden preparar por ingeniería genética conocida para el experto en el arte (véase Sambrook, etc., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)). En resumen, se prepara un gen ER- α 36 exógeno y se inserta en un vector de expresión, después se transfecta a células huésped, y luego se cultivan las células huésped en el medio de cultivo aplicable a expresar ER- α 36 exógeno. La secuencia génica de ER- α 36 humano se describe en Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1023-1027 (2005) Wang et al. (No. de registro GenBank BX640939). Las células que expresan ER- α 36 exógeno pueden expresar ER- α 36 endógeno o no. El nivel de expresión endógeno o exógeno de

ER- α 36 en las células se puede aumentar o disminuir mediante el tratamiento de un reactivo que comprende suero, E2 β (17 β -estradiol), tamoxifeno y fulvestrant. (ICI 182,780)

5 Por consiguiente, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención se pueden usar para preparar un medicamento para la prevención y/o tratamiento del cáncer relacionado con ER- α 36 que comprende, pero no se limita a, cáncer anal, 5
cáncer de conducto biliar, cáncer de la vejiga, cáncer de hueso, cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer de recto),
cáncer de cerebro, cáncer de mama, el carcinoide, cáncer cervical, cáncer relacionado con el endocrino, cáncer de
10 endometrio, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sarcoma de Kaposi,
carcinoma de riñón, carcinoma de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma,
mesotelioma, mieloma, cáncer neuroendocrino, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de
15 pene, cáncer de próstata, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de médula espinal, cáncer gástrico, cáncer
de testículos, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva o cáncer de útero. En la realización preferida, el
cáncer relacionado con ER- α 36 incluye cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de
endometrio, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, cáncer de pulmón, mieloma, cáncer de ovario, cáncer de próstata,
cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma renal, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de sarcomas de tejidos
20 blandos o cáncer de útero. En una realización más preferida, el cáncer relacionado con ER- α 36 incluye cáncer de
mama, cáncer de hígado, linfoma, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de
páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de ovario y leucemia.

20 El sujeto puede ser un mamífero, tal como un perro, gato, vaca, oveja, caballo o humano, preferiblemente un ser humano. La cantidad eficaz de los compuestos varía de acuerdo con la diferencia de la enfermedad y es fácilmente determinable por un experto en el arte que tiene beneficio de la presente divulgación.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden usar en combinación con uno o más otros agentes contra el cáncer. Los agentes contra el cáncer apropiados incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes, mostazas de nitrógeno, antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, venenos de huso, inhibidores de topoisomerasa, agentes inductores de apoptosis, inhibidores de angiogénesis, podofilotoxinas, nitrosoureas, 25
antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de quinasa, antiestrogénicos, cisplatino, carboplatino,
interferón, asparginasa, leuprolida, flutamida, megestrol, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, adriamicina, irinotecán y
taxol. En una realización, los agentes contra el cáncer son antiestrógenos tales como tamoxifeno y fulvestrant (ICI182,
750).

30 En ciertas realizaciones de la presente invención, se puede administrar un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero, o una sal farmacéuticamente aceptable del estereoisómero, en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se pueden preparar para la medicación para la 30
prevención y/o tratamiento de un sujeto que sufre de enfermedades relacionadas con ER- α 36.

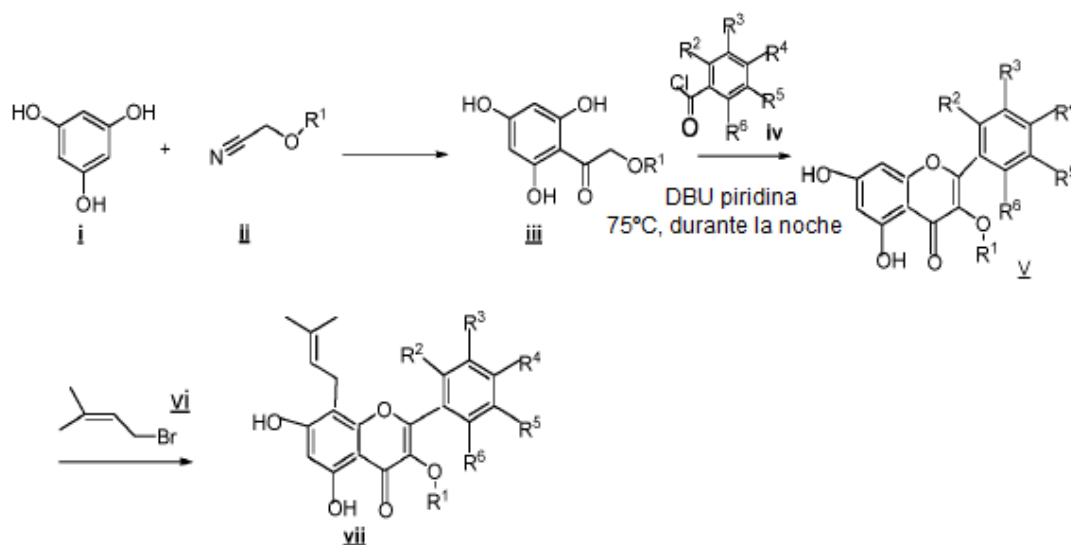
35 En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención se puede usar para el tratamiento de enfermedades animales. El veterinario común se puede administrar en una forma de preparación farmacéuticamente aceptable de los presentes compuestos, o una sal aceptable para veterinaria, o un solvente aceptable para veterinaria o el profármaco de los mismos. El veterinario puede determinar la dosis y el método de administración a un animal apropiado. 35

Si se usa una combinación de compuestos activos, se pueden administrar simultáneamente, por separado o de forma secuencial.

Métodos de preparación de los compuestos

40 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por diferentes métodos de síntesis. Por lo general, los métodos de preparación se demuestran de la siguiente manera. R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ se definen como se ha mencionado anteriormente, a menos que se indique lo contrario. 40

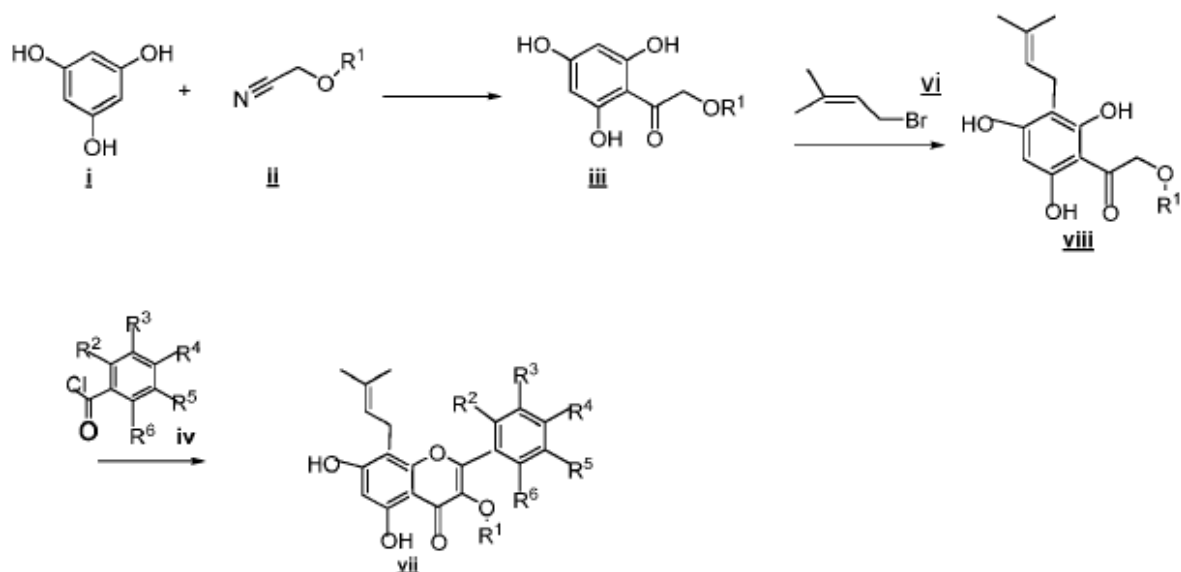
45 Es obvio para la persona en la técnica, que los métodos de detalle para preparar los compuestos varían ligeramente de la diferencia de las estructuras de los compuestos. Además, es necesario proteger grupos inestables o activos mediante el grupo protector convencional (mostrado como P) en la mayoría de los métodos de preparación de la siguiente manera. La propiedad de los grupos protectores y los métodos para inducir o disponer los grupos son conocidos en la técnica. (los ejemplos se refieren a Greene T. W. "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, NewYork, 1991). Los siguientes esquemas de 1 a 3 y la descripción relacionada son como ejemplos de preparación de 45
los compuestos de fórmula (I), y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Esquema 1

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar a través de varias etapas. El compuesto iii se puede preparar mediante reacción de Houben-Hoesch (acilación de Friedel-Crafts) a partir del compuesto i y ii bajo catálisis del ácido de Lewis. El ácido de Lewis aplicable para la reacción comprende cloruro de zinc anhidro, cloruro de aluminio anhidro, cloruro férrico, tetracloruro de titanio, cloruro de estaño, complejos de trifluoruro de boro, éter dietílico y etc. Esta reacción durará de 1-20 horas entre 0°C y 120°C.

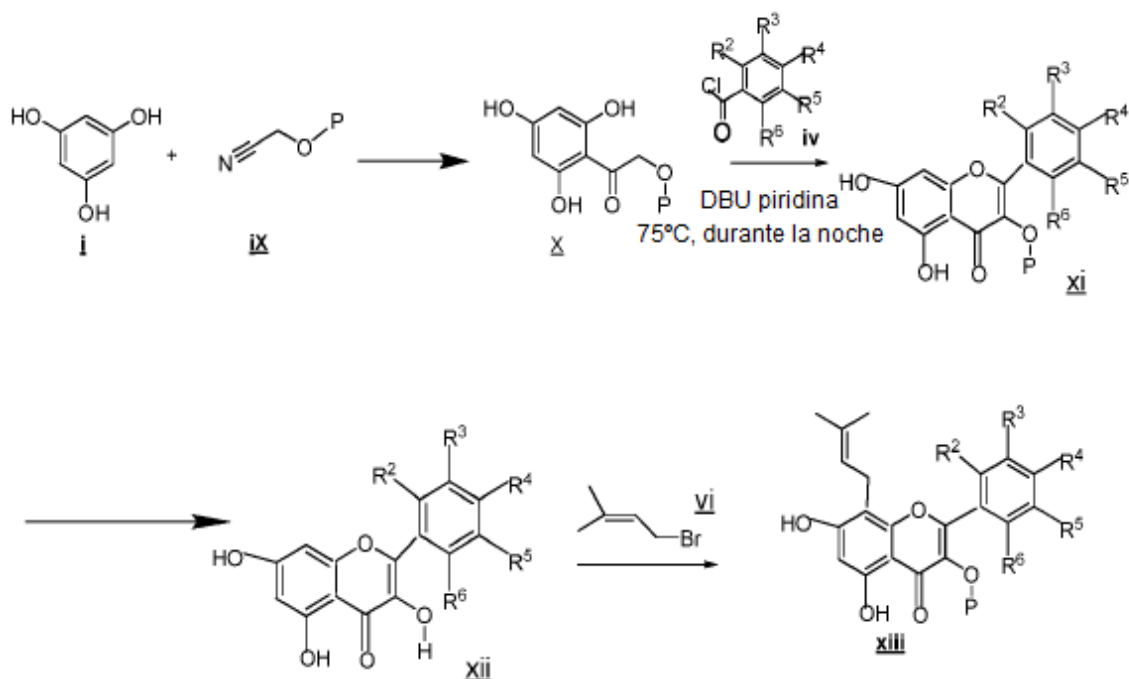
El compuesto v se puede preparar a partir del compuesto iii y el compuesto sustituido iv en solvente inerte a través de la reacción de condensación. El solvente inerte aplicable a la reacción comprende, tal como DME, 1,2-dietoxietano, THF, 1,4-dioxano, DMF, N,N-dimetilacetamida, piridina, N-metil-2-pirrolidona. El álcali aplicable a la reacción comprende, por ejemplo, hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, hidruro de sodio, metóxido de sodio, tert-butoxido de potasio, DBU (1,8-diazabicyclo-diciclo (5,4,0)-7-hendeceno) butil litio, LDA (diisopropil litio), LHMDs (hexametildisilazida de litio) y etc. Durante la reacción se añadirá catalizador de transferencia de fase (tal como 18-corona-6, TBAB (bromuro de tetrabutilamonio), TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio, etc.) de cantidad estequiométrica o catalítica. Y la temperatura de reacción es de aproximadamente 0-100°C, el tiempo de reacción es 1-20 horas. El compuesto vii se puede preparar a partir de bromuro de prenilo y el compuesto v en condiciones alcalinas. El solvente aplicable a la reacción comprende como tal metanol, DMF (N,N-dimetilacetamina), THF (tetrahidrofurano), agua, tolueno, DME (1,2-dimetoxietano) y mezcla de solventes, tal como metanol-agua, DMF-agua, THF-Agua y etc. El solvente preferido en la reacción es agua. El alcalino aplicable a la reacción comprende como tal hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, metóxido de sodio, hidróxido de sodio, tert-butoxido de potasio, DBU (1,8-diazabicyclo-diciclo (5,4,0)-7-hendeceno), butil litio, LDA (diisopropil litio), LHMDs (hexametildisilazida de litio) y etc. La temperatura de reacción es convencionalmente de aproximadamente 0-100°C, preferiblemente, el tiempo de reacción es 1-20 horas.

En los métodos de síntesis química, las dos etapas importantes son respectivamente inducción de isopentenilo y anillo original de cierre de cromenona. La secuencia de las dos etapas puede ser modulada de acuerdo con la propiedad de diferentes grupos sustituyentes. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención se puede preparar mediante el esquema 2.



Esquema 2

- En el esquema 2, la condición de reacción de cada tipo de reacción es similar a la del esquema 1. El compuesto viii se puede preparar a partir del compuesto iii y bromuro de prenilo en condiciones alcalinas. El solvente aplicable a la reacción comprende como tal metanol, DMF (N,N-dimetilacetamina), THF (tetrahydrofurano), agua, tolueno, DME (1,2-dimetoxietano) y una mezcla de solventes tal como metanol-agua, DMF-agua, THF-agua, etc. El solvente preferido en la reacción es agua. El alcalino aplicable a la reacción comprende como tal hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, metóxido de sodio, hidróxido de sodio, tert-butoxido de potasio, DBU (1,8-diazabicyclo-diciclo (5,4,0)-7-hendeceno), butil litio, LDA (diisopropil litio), LHMDs (hexametildisilazida de litio) y etc. La temperatura de reacción es convencionalmente de aproximadamente 0-100°C, preferiblemente, el tiempo de reacción es 1-20 horas.
- El compuesto vii se puede preparar a partir del compuesto viii y cloruro de acilo sustituido iv en solvente inerte a través de la reacción de condensación. El solvente inerte aplicable a la reacción comprende éter, tal como DME, 1,2-dietoxietano, THF, 1,4-dioxano, DMF, N,N-metilacetamida, piridina, N-metil-2-pirrolidona. La reacción es aplicable a una condición alcalina, que comprende tal como hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, hidróxido de sodio, metóxido de sodio, tert-butoxido de potasio, DBU (1,8-diazabicyclo-diciclo (5,4,0) hendeceno), butil-litio, LDA (diisopropil-litio), LHMDs (hexametildisilazida de litio) y etc. Se puede adicionar una cantidad estequiométrica o catalítica de catalizador de transferencia de fase en la reacción tal como 18-corona-6, TBAB (bromuro de tetrabutilamonio) TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio) y etc. La temperatura de reacción es convencionalmente de aproximadamente 0-140°C, preferiblemente, el tiempo de reacción es 1-20 horas bajo reflujo de solvente. Cuando R¹ es hidrógeno, el compuesto de fórmula (I) se puede preparar de acuerdo con el siguiente esquema 3.



Esquema 3

P es un grupo protector para el grupo hidroxilo en el esquema 3. El compuesto xii se puede preparar mediante la eliminación del grupo protector del compuesto xi. Los métodos de eliminación varían de acuerdo con diferentes grupos protectores, y los métodos se refieren principalmente a "grupos protectores en síntesis orgánica" (Greene T.W et. John Wiley & Sons, NewYork, 1991). El grupo protector preferido se selecciona del grupo que consiste en bencilo, benzoilo, carbobenzoilo, TBDMS (terbutildimetilsililo), THP (tetrahidropirano), metilo, MOM (metoximetilo), PMB (para-metoxibencilo) y etc.

El compuesto xiii se puede preparar por reacción de bromuro de prenilo con el compuesto xii en condiciones alcalinas. El solvente aplicable a la reacción comprende como tal metanol, DMF (N,N-dimetilacetamina), THF (tetrahidrofurano), agua, tolueno, DME (1,2-dimetoxietano) y mezcla de solventes tal como metanol-agua, DMF-agua, tetrahidrofurano-agua y etc. El solvente preferido es agua en la reacción. El alcalino aplicable a la reacción comprende, por ejemplo, hidróxido de potasio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, metóxido de sodio, hidruro de sodio, tertbutoxido de potasio, DBU (1,8 diazabicyclo- dicio (5,4,0)-7-hendeceno), butil litio, LDA (diisopropil litio), LHMDs (hexametildisilazida de litio) y etc. Y la temperatura de reacción es de aproximadamente 0-100°C, el tiempo de reacción es 1-20 horas.

Ejemplos

La invención se ilustra mediante el compuesto 1 del Ejemplo 1. Los compuestos 2-13 de los ejemplos 2-13 se proporcionan como referencia. A menos que se indique lo contrario, la temperatura ambiente o la temperatura ambiente se refieren al rango de 18-25°C. La evaporación del solvente se llevó a cabo usando un evaporador rotatorio a presión reducida; las reacciones fueron monitorizadas por cromatografía en capa fina (TLC) y los tiempos de reacción se dieron sólo para ilustración. La estructura y la pureza de todos los compuestos aislados se aseguraron por al menos una de las siguientes técnicas: TLC, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los rendimientos se dan solamente con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona (compuesto 1)

Etapa 1: preparación de 2-metoxi-1-(2,4,6-trihidroxifenil) etanona

Se disolvió floroglucinol (35.1 g, 279 mmol) en solución de éter etílico (500 mL), seguido de cloruro de zinc (8 g, 59 mmol) y se adicionó 2-metoxi acetonitrilo (18 g, 253 mmol) en la solución bajo condición de baño de agua de hielo. Se burbujó gas HCl seco en la mezcla de reacción, agitando vigorosamente durante 5 horas, y se formó el precipitado. El precipitado se filtró y se recogió, después se disolvió en agua y se calentó a reflujo durante 3 horas. Después de enfriar,

se recogió el precipitado rosado, y se puede obtener el compuesto blanco deseado después de la recrystalización con agua. (45 g, rendimiento 81%) ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ =12.14 (s, 2H), 10.41 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.32 (s, 3H).

Etapas 2: preparación de 2-(4-trifluorometilfenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-4H-cromen-4-ona

- 5 Se disolvieron 2-metoxi-1-(2,4,6-trihidroxifenil)etanona (30 g, 151 mmol) y cloruro de 4-trifluorometilbenzoilo (37.5 g, 180 mmol) en 250 mL de piridina seca. Se dejó caer en DUB (53.2 g 350 mmol) en la solución a temperatura ambiente. Después de terminar la adición, la temperatura de la solución se elevó a 75°C, y se mantuvo en agitación durante la noche. El segundo día, la solución se enfrió a temperatura ambiente, y la mayor parte del solvente se eliminó a presión reducida.
- 10 El residuo de la solución se vertió en una solución ligera de clorhidrato. La solución mixta se extrajo durante 3 veces con 500 mL de acetato de etilo. El extracto se combinó, se lavó con 300 mL de solución acuosa de carbonato de sodio 2N, se secó con sulfato de sodio anhidro y se condensó. Se obtuvo el compuesto deseado (21 g, rendimiento 40%) después de cristalizar el producto en bruto con una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (10:1)

Etapas 3: preparación de 2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona

- 15 Se disolvió 2-(4-trifluorometilfenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-4H-cromen-4-ona (10 g, 28.3 mmol) en 150 mL de diclorometano en un matraz de tres bocas de 250 mL. Se adicionó gota a gota tribromuro de boro (21.2 g, 84.9 mmol) en la solución a 0°C. Después de esto, la solución se calentó a temperatura ambiente y se hizo reaccionar durante 4 horas, y se inactivó con 80 mL de agua helada para terminar la reacción química. La solución se extrajo con 500 mL de acetato de etilo durante 3 veces. Los extractos se combinaron, se lavaron una vez con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el producto en bruto se mezcló con 20 mL de acetato de etilo/petróleo (1:10) y se agitó, y se obtuvo el compuesto diana de color amarillo después de filtrar y secar. (7 g, rendimiento 70%).
- 20

Etapas 4: preparación de 2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona (compuesto 1)

- 25 Se disolvieron el compuesto 2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona (3.38 g, 10 mmol) y carbonato de cesio (33 g, 100 mmol) en 100 mL de agua y bromuro de prenilo (1.9 g, 10 mmol) se adicionó en la solución bajo condiciones de baño de agua helada. Después de esto, la solución se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente, y el pH se ajustó aproximadamente a 6 con clorhidrato 2N. La solución se extrajo con acetato de etilo durante 2 veces. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el producto en bruto se eluyó con acetato de etilo/petróleo (1:25) a través de una columna de sílica gel. Se obtuvo el compuesto diana de color amarillo (508 mg, rendimiento 12.5%).
- 30

^1H RMN(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.20 (s, 1H), 10.87 (brs, 1H), 10.07 (brs, 1H), 8.35 (d, 2H, J =8.1Hz), 7.94 (d, 2H, J =7.7Hz), 6.33 (s, 1H), 5.19 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.45 (d, 2H, J =6.0Hz), 1.75 (s, 3H), 1.64 (s, 3H); LC-MS (ESI, m/z): 407.0[M+H] $^+$.

- 35 Haciendo referencia al método del ejemplo 1, los compuestos de referencia 2 al compuesto 8 se prepararon haciendo reaccionar el intermedio 2-metoxi-1-(2,4,6-trihidroxifenil) etanona como material de partida con muchos cloruros de alquilo sustituidos diferentes, cloruro de arilo o cloruro de heteroarilo, los detalles de los compuestos se muestran como se indica en la tabla 1.

Tabla 1 (compuestos de referencia 2 a 8)

		^1H -RMN	LC-MS, m/z (ESI)
2	2-(4-fluorofenil)-3,5, 7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.30 (s, 1H), 10.81 (brs, 1H), 9.74 (brs, 1H), 8.21 (dd, 2H, J_1 =8.7Hz, J_2 =5.7Hz), 7.44 (dd, 2H, J_1 =8.7Hz, J_2 =5.7Hz), 6.33 (s, 1H), 5.19 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.45 (d, 2H, J =6.6 Hz), 1.76 (s, 3H), 1.65 (s, 3H).	357.0 [M+H] $^+$.
3	2-(3-fluoro-4-clorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)- 4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.16 (s, 1H), 8.06-8.00 (m, 2H), 7.82 (d, 1H, J =8.4Hz), 6.30 (s, 1H), 5.15 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.42 (d, 2H, J =5.7 Hz), 1.75 (s, 3H), 1.63 (s, 3H).	391.0 [M+H] $^+$;
4	2-(4-clorofenil)-3,5, 7-trihidroxi- 8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.25 (s, 1H), 10.83 (brs, 1H), 9.87 (brs, 1H), 8.16 (d, 2H, J =8.7Hz), 7.64 (d, 2H, J =8.4Hz), 6.31 (s, 1H), 5.17 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.42 (d, 2H, J =6.6 Hz), 1.74 (s, 3H),	373.1 [M+H] $^+$

		1.63 (s, 3H).	
5	2-(4-trifluorometoxifenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.25 (s, 1H), 10.83 (brs, 1H), 9.93 (brs, 1H), 8.26 (d, 2H, J =8.7Hz), 7.58 (d, 2H, J =8.4Hz), 6.31 (s, 1H), 5.17 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.42 (d, 2H, J =6.6 Hz), 1.74 (s, 3H), 1.63 (s, 3H).	423.1 [M+H] ⁺
6	2-(3,4-diclorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.18 (s, 1H), 10.90 (brs, 1H), 10.15 (brs, 1H), 8.29-8.11 (m, 2H), 7.85 (d, 1H, J =8.4Hz), 6.32 (s, 1H), 5.15 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.42 (d, 2H, J =5.7 Hz), 1.76 (s, 3H), 1.64 (s, 3H).	407.0 [M+H] ⁺
7	2-(3-trifluorometil-4-clorofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.16 (s, 1H), 10.76 (brs, 1H), 10.37 (brs, 1H), 8.56-8.36 (m, 2H), 7.95 (d, 1H, J =8.4Hz), 6.32 (s, 1H), 5.17 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.41 (d, 2H, J =5.7Hz), 1.72 (s, 3H), 1.62 (s, 3H).	441.0 [M+H] ⁺
8	2-(4-bromofenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.25 (s, 1H), 10.83 (brs, 1H), 9.87 (brs, 1H), 8.20 (d, 2H, J =8.7Hz), 7.75 (d, 2H, J =8.4Hz), 6.31 (s, 1H), 5.17 (t, 1H, J =5.4Hz), 3.42 (d, 2H, J =6.6Hz), 1.74 (s, 3H), 1.63 (s, 3H).	417.2 [M+H] ⁺

Ejemplo 9

2-(4-trifluorometilfenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona (compuesto 9)

5 Se disolvieron el intermedio 2-(4-trifluorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-4H-crom-4-ona (500 mg, 1.42 mmol) del compuesto 1 y carbonato de cesio (4.95 g, 15 mmol) en 25 mL de agua, y bromuro de prenilo (220 mg, 1.5 mmol) se adicionó en la solución bajo condiciones de baño de agua helada. Después de esto, la solución se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente, y el pH se ajustó aproximadamente a 6 con clorhidrato 2N. La solución se extrajo con acetato de etilo durante 2 veces. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el producto en bruto se eluyó con acetato de etilo/petróleo a través de una columna de sílica gel. Se obtuvo el compuesto diana de color amarillo (95 mg, rendimiento 16.5%).

¹H RMN(300 MHz, DMSO- d_6): δ =12.41 (1H, s), 10.92 (1H, brs), 8.20 (2H, d, J =8.1 Hz), 7.96 (2H, d, J =7.7 Hz), 6.34 (1H, s), 5.15 (1H, t, J =5.4Hz), 3.84 (3H, s), 3.41 (2H, d, J =6.0Hz), 1.68 (3H, s), 1.62 (3H, s); LC-MS (ESI, m/z): 421.1 [M+H]⁺.

Compuesto de referencia 10

15 2-(3,4-difluorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4 H-cromen-4-ona (compuesto 10)

Etapa 1: preparación de 2-metoxi-1-[2,4,6-trihidroxi-3-(3-metilbut-2-eno) fenil] etanona

20 Se disolvió el compuesto 2-metoxi-1-(2,4,6-trihidroxiifenil) etanona (2.0 g, 10.09 mmol) en solución de hidróxido de potasio al 5% (1.132 g, 20.18 mmol), seguido de adición gota a gota de bromuro de prenilo (1.504 g, 10.09 mmol) en la solución bajo condiciones de baño de agua con hielo. La mezcla se hizo reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente y se vertió en agua helada. El pH de la solución se ajustó a aproximadamente 2 y se extrajo con acetato de etilo durante 3 veces. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el producto en bruto se purificó (se eluyó con diclorometano/metanol (100:1)) a través de una columna de sílica gel. Se obtuvo el compuesto diana (0.5 g, rendimiento 18.6%).

25 ¹HRMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ =13.70 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 10.33 (9s, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.56 (s, 2H), 3.30 (s, 3H), 3.02 (m, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.57 (s, 3H).

Etapa 2: preparación 2-(3,4-difluorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona (compuesto 10)

30 2-metoxi-1-[2,4,6-trihidroxi-3,5-di(3-metil-2-buten-1-il)fenil]etanona (250 mg, 0.94 mmol, carbonato de potasio anhidro en polvo (779 mg, 5.63 mmol), TBAB (bromuro de tetrabutilamonio, 454 mg, 1.41 mmol) y 3,4-difluorometilbenzoilcloruro (331 mg, 1.88 mmol) en 30 mL de tolueno, calentando a reflujo para la reacción durante 6 horas. Después de enfriar, se eliminó el tolueno y se adicionaron 20 mL de agua a la solución. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con solución acuosa saturada de NaCl y se secaron con solución de sulfato

- de sodio anhidro, después se obtuvo un residuo de color marrón después de eliminar el solvente. El residuo se disolvió en 20 mL de mezcla metanol-agua (relación 4: 1), y se adicionó hidróxido de potasio (1 g). La solución de la mezcla se calentó y se calentó a reflujo durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se acidificó a pH=4 con clorhidrato 1N y se extrajo con diclorometano durante tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro para eliminar el solvente. Se obtuvo el compuesto deseado (13.1 mg, rendimiento 3.59%) después de que el producto en bruto se purificó a través de una columna de sílica gel (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo = 1:50)
- ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ=12.45 (s, 1H), 7.98-7.89 (m, 2H), 7.35-7.30 (m, 1H), 6.34 (s, 2H), 5.25 (br, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.55 (d, 2H, J=6.8Hz, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.77 (s, 3H); LC-MS: 390.1 [M+H]⁺; pureza: 98.6% (254nm).
- Haciendo referencia al método del ejemplo 9, el compuesto 11 al compuesto 13 se preparó haciendo reaccionar intermedios correspondientes respectivos como materiales de partida con bromuro de prenilo a través de un mecanismo de sustitución único. Los detalles de los compuestos se muestran como en la siguiente tabla 2.

Tabla 2 (compuestos de referencia 11 a 13)

		¹ H-RMN	LC-MS, m/z (ESI)
11	2-(4-fluorofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4Hcromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ=12.45 (s, 1H), 10.90 (brs, 1H), 8.13 (d, 2H, J=8.7Hz), 7.60 (d, 2H, J=8.4Hz), 6.33 (s, 1H), 5.19 (t, 1H, J=5.4Hz), 3.83 (s, 3H), 3.36 (d, 2H, J=6.6Hz), 1.61 (s, 3H).	437.1 [M+H] ⁺ .
12	2-(3-fluorometil-4-cloro fenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ=12.16 (s, 1H), 10.76 (brs, 1H), 8.56-8.36 (m, 2H), 7.95 (d, 1H, J=8.4Hz), 6.32 (s, 1H), 5.17 (t, 1H, J=5.4Hz), 3.85 (s, 3H), 3.41 (d, 2H, J=5.7 Hz), 1.72 (s, 3H), 1.62 (s, 3H).	455.2 [M+H] ⁺ ;
13	2-(4-bromofenil)-3-metoxi-5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4Hcromen-4-ona	(300 MHz, (CD ₃) ₂ CO): δ=12.56 (s, 1H), 9.71 (brs, 1H), 8.16 (d, 2H, J=8.7Hz), 7.64 (d, 2H, J=8.4Hz), 6.37 (s, 1H), 5.25 (t, 1H, J=5.4Hz), 3.94 (s, 3H), 3.52 (d, 2H, J=6.6Hz), 1.77 (s, 3H), 1.66 (s, 3H).	431.5 [M+H] ⁺

Ensayo de prueba para la actividad biológica

- Las actividades del compuesto de fórmula (I) se pueden ensayar mediante los siguientes ensayos.

Ejemplo 14. Expresión de variantes de ER-α en membrana de muestras A de cáncer de mama humano previamente recubierta con tejidos de cáncer de mama humano se compró de ProSci Incorporated (Poway, CA). La membrana se probó con un anticuerpo anti-ER-α36 que reconoce específicamente ER-α36 y un anticuerpo secundario conjugado con HRP, y se visualiza con reactivos de detección de quimioluminiscencia (ECL) mejorados (Amersham Pharmacia Biotech). Los marcadores en la misma membrana se eluyeron y se detectaron con un anticuerpo receptor-α anti-estrógeno H222 (Novocastra Laboratories Ltd, Reino Unido) que reconoce los tres subtipos de ER-α: ER-α66, ER-α46 y ER-α36. La figura 1 muestra que ER-α66, ER-α46 y ER-α36 no se expresan en tejido de mama normal (Carril 1) sino que se expresan en una muestra de carcinoma ductal infiltrante (Carril 2), una muestra de carcinoma lobular infiltrante (Carril 5) y carcinoma ductal no invasivo (Carril 7). Además, ER-α36 se expresó en el carcinoma ductal invasivo (Carril 4) y otra muestra de carcinoma lobular infiltrante (Carril 6). Los carriles 2 y 3 presentaban carcinoma ductal infiltrante respectivamente de dos pacientes diferentes. Los carriles 5 y 6 tenían carcinoma lobular infiltrante de dos pacientes diferentes, respectivamente. Este resultado indica que ER-α36 no se expresa en el tejido de mama normal, sino que se expresa en muestras de cáncer de mama ER-negativas que no expresan ER-α66 y ER-α46.

Ejemplo 15: ER-α36 expresado en la línea celular de cáncer de mama de ER-negativa, MDA-MB-231

- La línea celular MDA-MB-231 es bien conocida por carecer ER-α66 y ER-α46 (Relevancia de las líneas celulares de cáncer de mama como modelos para tumores de mama: una actualización Marc Lacroix, Guy Leclercq, Breast Cancer Research and Treatment 83: 249-289 (2004)). Las células MDA-MB-231 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células MDA-MB-231 se hicieron crecer en portaobjetos de cámara BIOCOAT de 8 pozos (BD Science Discovery Labware) en una atmósfera de CO₂ al 8% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y suero fetal bovino al 10% a 37°C, durante 12 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces con solución salina estandarizada con fosfato estéril (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, las células se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% (v/v) durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo con PBS y se bloquearon con suero al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo específico ER-α36 o el mismo

anticuerpo preincubado con péptidos inmunógenos que se unen específicamente al anticuerpo ER- α 36 durante 30 minutos a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100 al 0.5% (PBST), después se incubó con un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Finalmente, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBST, una vez con PBS, luego se recubrieron con marcador inmunofluorescente (Molecular Probes, Eugene, OR) y se analizaron bajo un microscopio Nikon E600 y las imágenes se capturaron mediante el sistema de imágenes confocal MRC-1024 (Bio- Rad). La figura 2 (panel superior) muestra que las células MDA-MB-231 se tiñeron positivamente mediante un anticuerpo anti-ER- α 36. Con el fin de demostrar la fiabilidad de este resultado, la imagen con el mismo anticuerpo anti-ER- α 36 preincubado con péptidos de inmunógeno no mostró ninguna mancha (Figura 2, panel inferior), lo que indica la especificidad del anticuerpo.

10 Ejemplo 16: Expresión de ER- α 36 en diferentes líneas celulares tumorales por Western Blot

Las células de la muestra se cultivaron a 37°C, CO₂ al 5% (MDA-MB-231, y el medio de cultivo es FBS-DMEM al 10%). Las células se recogieron hasta que las células de cada pozo alcanzaron una confluencia del 60-90% y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C, 4300 rpm. Se eliminó el sobrenadante de la solución y se adicionaron el lisado apropiado, solución reguladora de lisis que comprendía NP-40 al 1% y EDTA 0.7 mM, e inhibidor de proteasa, se mantuvo la lisis de las células en la solución durante 30 minutos a 1 hora en baño de hielo. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se recogió para ser cuantificado con proteína. El procedimiento general de Western blot se mostró de la siguiente manera: transmembrana en goma mezcladas o gomas prefabricadas, electroforesis, bloqueo del anticuerpo anti-ER- α 36, elución, bloqueo de anticuerpos secundarios, elución, expresión de la exposición en el laboratorio fotográfico y mostrar los resultados. La figura 3 muestra el resultado de Western blot de la expresión de ER- α en diferentes células tumorales.

Carril 1: 293 líneas celulares epiteliales renales humanas de expresión transitoria de ER- α 36; Carril 2-4: líneas celulares SK-BR-3 de cáncer de mama humano de diferentes laboratorios; Carril 5-7: líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama humano de diferentes laboratorios; Carril 8-9: líneas celulares HL-60 de leucemia humana de diferentes laboratorios; Carril 10-11: líneas celulares MV-4-11 de leucemia humana de diferentes laboratorios; Carril 12-13: líneas celulares K562 de leucemia mieloide crónica humana de diferentes laboratorios; Carril 14: línea celular A2780 de cáncer de hígado; Carril 15: línea celular HEL-7402 de cáncer de hígado; Carril 16: cáncer de célula HEL-9204 de cáncer de hígado; Carril 17: línea celular primaria Hep-11 de cáncer de hígado de un paciente; Carril 18: línea celular primaria Hep-12 de cáncer de hígado de un paciente.

Ejemplo 17: el compuesto que inhibe el crecimiento *in vitro* de diferentes células de cáncer de mama

30 A: Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® sobre MDA-MB-231 de cáncer de mama ER negativas *in vitro*:

Las células MDA-MB-231 se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5% en DMEM y suero fetal bovino al 10%. Las células se colocaron a una densidad de 6x10³ células por pozo en una placa de 96 pozos. Se trataron células MDA-MB-231 con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 0.3µM, 0.5µM, 1µM, 2µM, 3µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 50µM y 100µM, durante 72 horas. Las células tratadas se analizaron con el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega), y las luminiscencias se registraron con Envision.

B: Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® sobre células MCF-7 de cáncer de mama ER positivas *in vitro*:

La línea celular MCF7 es una línea celular de cáncer de mama que expresa fuertemente ER-66, ER-46 y ER-36 (relevancia de las líneas celulares de cáncer de mama como modelos para tumores de mama: una actualización. Marc Lacroix, Guy Leclercq, Breast Cancer Research and Treatment (2004) 83, 249-289; Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.103: 9063-9068 (2006)). Las células MCF7 de ATCC se mantuvieron en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), y suero fetal bovino al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se colocaron a una densidad de 6x10³ células por pozo en una placa de 96 pozos. Se trataron células MCF7 con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 0.3µM, 0.5µM, 1µM, 2µM, 3µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 50µM y 100µM, durante 72 horas. Las células tratadas se analizaron a través kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega), y las luminiscencias se registraron con Envision.

La tabla 3 muestra la viabilidad de diferentes células de cáncer de mama influenciadas por algunos compuestos de la presente invención.

Tabla 3

Ejemplo/Compuesto de referencia Inhibición de la viabilidad de células de cáncer de mama IC₅₀ (μM)

	células MDA-MB-231	células MCF7
Tamoxifeno ^{a)}	20.90±1.51 ^{b)}	22.55±4.15
1	1.066	2.012
2	NA ^{c)}	3.167
3	2.867	8.603
4	4.325	16.011
5	4.476	6.854
6	1.875	6.854
7	9.303	7.542
9	NA	NA
10	NA	31.46

a) tamoxifeno como compuesto de control positivo.

b) cuando el compuesto se ensayó más de 3 veces, IC₅₀ se ilustró con un valor medio ± desviación estándar.

c) NA significa que no hay actividad, e IC₅₀ es superior a 100 μM

d): ND significa que no se detecta

Ejemplo 18: Inhibición del crecimiento de células de leucemia crónica *in vitro* por los compuestos

A: detección de la viabilidad de las células de leucemia crónica K562 por ensayo luminiscente CellTiter-Glo® *in vitro*

- 5 Las células de leucemia crónica K562 de ATCC se mantuvieron en IMDM y suero fetal bovino al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos en una concentración de 6x10³ células/pozo. Las células K562 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 0.3μM, 0.5μM, 1μM, 2μM, 3μM, 5μM, 10μM, 20μM, 30μM, 50μM y 100μM, durante 72 horas. Las células tratadas se analizaron mediante kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega), y las luminiscencias se registraron con Envision.

Ejemplo 19: Inhibición del crecimiento de células Daudi de linfoma B humano *in vitro* por los compuestos

A: Inhibición de células Daudi de linfoma B humano por ensayo luminiscente CellTiter-Glo® *in vitro*

- 15 Las células Daudi del linfoma B humano de ATCC se mantuvieron en IMDM y suero fetal bovino al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 6x10³ células/pozo. Se trataron células Daudi de linfoma humano B con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 0.3μM, 0.5μM, 1μM, 2μM, 3μM, 5μM, 10μM, 20μM, 30μM, 50μM y 100μM, durante 72 horas. Las células tratadas se analizaron mediante kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega), y las luminiscencias se registraron con Envision.

- 20 La tabla 4 muestra la viabilidad de células de leucemia crónica K562 y células de linfoma Daudi humanas B influenciadas por algunos compuestos de la presente invención.

Tabla 4

Ejemplo/Compuesto de referencia Inhibición de la viabilidad de células de cáncer de mama IC₅₀ (μM)

	Células K562	Células Daudi
Gleevec ^{a)}	0.751	ND ^{b)}
citarabinen	ND	10.033
1	1.035	0.824
2	6.139	9.234
3	1.849	2.909
4	0.974	2.638
5	1.475	1.486
6	0.935	1.983
7	6.140	4.068
10	NA	21.75
11	NA	NA

a): gleevec y citarabinen, respectivamente, fueron el compuesto de control positivo para el modelo de células K562 y el modelo de células Daudi

b): Nd significa que no hay detección

c) NA significa que no hay actividad, y IC₅₀ es superior a 100 μM

Ejemplo 20: Inhibición del crecimiento de células de leucemia aguda *in vitro* por los compuestos

5 A: Inhibición del crecimiento de células HL-60 de leucemia mieloblástica aguda por los compuestos detectados por el método MTT

10 Las células HL-60 de leucemia mieloblástica aguda de ATCC se midieron en IMDM y suero fetal bovino al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se subsembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 6x10³ células/pozo. Las células HL-60 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó la proporción de inhibición.

15 B: Inhibición del crecimiento de células Molt-4 de leucemia linfoblástica aguda por los compuestos detectados por el método MTT

Las células Molt-4 de leucemia linfoblástica aguda de ATCC se determinaron en RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se subsembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 6x10³ células/pozo y se mantuvieron en RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10% a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. Las células Molt-4 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó la proporción de inhibición.

20 La viabilidad de diferentes células de leucemia influenciadas por algunos compuestos de la invención se enumeró en la siguiente tabla 5

Tabla 5

Ejemplo/Compuesto de referencia No. El porcentaje de inhibición de la proliferación celular por los compuestos con una concentración de 10^{-6} M (%)

	Células HL-60	Células Molt-4
Doxorrubicina ^{a)}	79.0	90.1
1	60.7	43.7
2	Na ^{b)}	NA
3	28.5	14.4
4	0.974	14.7
5	59.8	69.4
6	61.9	67.4
7	NA	57.0
9	NA	NA
11	NA	NA

a): Doxorrubicina como compuesto de control positivo

b): NA significa que no hay actividad, y el porcentaje de inhibición en el compuesto con una concentración de 10^{-6} M fue inferior al 10%.

Ejemplo 21 La inhibición de células de cáncer de hígado *in vitro* por los compuestos

A: inhibición de la célula de cáncer de hígado BEL-7402 *in vitro* por los compuestos detectados por SRB

5 Las células HL-60 de cáncer de hígado de ATCC se midieron en DMDM, NCS al 10% y KANA a 50 μ g/mL a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, y se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 6×10^3 células/pozo. Las células BEL-7402 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método SRB, y se calculó el porcentaje de inhibición.

10 La inhibición de las células de cáncer de hígado por algunos compuestos de la invención se enumeró en la siguiente Tabla 6

Tabla 6

Ejemplo/Compuesto de referencia No. El porcentaje de inhibición de la proliferación celular por los compuestos con una concentración de 10^{-6} M (%)

	Células BEL-7402
Doxorrubicina ^{a)}	55.2
1	23.7
2	21.8
3	28.6
4	46.4
5	15.6
6	14.9

7	19.8
9	11.7
10	17.4

a): Doxorrubicina como compuesto de control positivo

Ejemplo 22: La inhibición de células de cáncer gástrico *in vitro* por los compuestos

A: inhibición de la célula de cáncer gástrico BGC-823 *in vitro* por los compuestos mediante el método MTT

5 Las células BGC-823 de cáncer gástrico se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 3×10^3 células/pozo y se mantuvieron en medio DMEM libre de rojo de fenol que contenía CS-FBS al 2.5% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células BGC-823 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 10 y 20 µM, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición. El resultado se muestra en la figura 4.

Ejemplo 23: La inhibición de células de cáncer de pulmón *in vitro* por los compuestos

A: inhibición de células de cáncer de pulmón H460 *in vitro* por los compuestos mediante el método MTT

10 Las células H460 de cáncer de pulmón se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 4.0×10^3 células/pozo y se mantuvieron en medio libre de rojo de fenol que contenía CS-FBS al 2.5% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células H460 se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 10 y 20 µM, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición. El resultado se muestra en la figura 5

15 Ejemplo 24: La inhibición de células de cáncer de pulmón *in vitro* por los compuestos

A: inhibición de células de cáncer de colon LS174T *in vitro* por los compuestos mediante el método MTT

20 Las células LS174T de cáncer de colon se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 4.5×10^3 células/pozo y se mantuvieron en medio 1640 libre de rojo de fenol que contenía CS-FBS al 2.5% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células LS174T se trataron con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 10 y 20 µM, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición. El resultado se muestra en la figura 6.

Ejemplo 25: La inhibición de células de cáncer de páncreas *in vitro* por los compuestos

A: inhibición de las células de cáncer de páncreas PANC-1 *in vitro* por los compuestos mediante el método MTT

25 Las células PANC-1 de cáncer de páncreas se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 3×10^3 células/pozo y se mantuvieron en medio 1640 libre de rojo de fenol que contenía CS-FBS al 2.5% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se trataron las células PANC-1 con un compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 10 y 20 µM durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición. El resultado se muestra en la figura 7.

Ejemplo 26: La inhibición de células de cáncer de próstata *in vitro* por los compuestos

30 A: inhibición de las células de cáncer de próstata PC-3 *in vitro* por los compuestos mediante el método MTT

35 Las células PC-3 de cáncer de páncreas se subsebraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 3×10^3 células/pozo y se mantuvieron en medio que contenía suero fetal bovino F12K al 10%. Las células PC-3 se trataron con el compuesto de ensayo disuelto en DMSO a la concentración de 0, 1, 2, 4, 8, 10 y 20 µM, durante 72 horas. El valor de OD se probó mediante el método MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición. El resultado se muestra en la figura 8.

Ensayo *in vivo*:

Ejemplo 27: Inhibición del crecimiento de tumores de xenoinjerto de células BCAP-37 de cáncer de mama humano en ratones desnudos por los compuestos

40 Se trataron ratones desnudos con xenoinjertos de cáncer de mama con los compuestos de ensayo para probar su efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Se tomaron tejidos tumorales de ratones desnudos que llevaban

cáncer de mama BCAP-37 y se cortaron en piezas pequeñas. Varias piezas de los tejidos tumorales se implantaron en la axila bajo el miembro delantero derecho de los ratones desnudos femeninos. Después de la implantación, los ratones se alimentan con solución E2 β una vez al día a la dosis de 7 μ g por ratón durante 6 días para estimular el crecimiento del tumor en los ratones del experimento. A partir del séptimo día, los ratones se administraron intragástricamente con la solución de ensayo que contenía los compuestos y aceite de maíz a la dosis de 35 mg/kg. El tamoxifeno se utilizó como un control positivo. Se utilizó aceite de maíz como control negativo. La solución de ensayo se preparó dispersando el compuesto de ensayo en solución de aceite de maíz. (20 mg/mL). A los ratones se les dio la solución de ensayo y tamoxifeno a la dosis de 35 mg/kg o aceite de maíz una vez al día durante 15 días. Luego los ratones fueron sacrificados y los tejidos tumorales se diseccionaron y pesaron. La tasa de inhibición del crecimiento tumoral fue un porcentaje calculado usando la fórmula: tasa de inhibición del crecimiento tumoral = (peso promedio del tumor en el control negativo-peso promedio del tumor tratado con el compuesto de ensayo)/peso promedio del tumor en el control negativo. El resultado se dibuja como gráfico de barras y se muestra en la figura 9.

Ejemplo 28: Inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de Daudi de linfomas de células B humanas en ratones desnudos por los compuestos

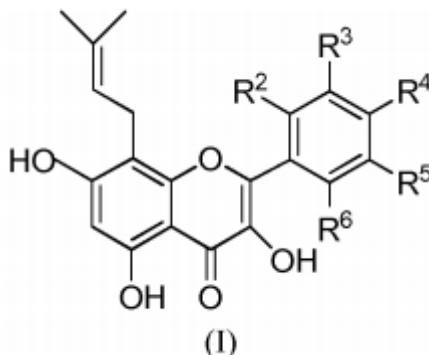
Se trataron ratones desnudos con tumor de xenoinjerto daudi de linfomas de células B humanas con los compuestos de ensayo para probar su efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Los linfomas de células B humanas fueron de ATCC. 1×10^7 células con 0.2 mL de Matrigel después de 5 pases se implantaron en la axila bajo el miembro delantero derecho de ratones desnudos hembra. Cuando el tumor de los ratones desnudos alcanzó 150-200 mm³, los ratones desnudos portadores de tumores se agruparon aleatoriamente. Cada 10 ratones desnudos pertenecen a un grupo. La administración intragástrica con el aceite mixto fue como control negativo y la administración intravenosa con rituximab fue como control positivo. El compuesto de ensayo se disolvió en el aceite mixto. El período de administración fue de 21 días continuamente, y la suspensión mixta de aceite (35 mg/kg) con el compuesto de ensayo se administró en los ratones desnudos del grupo positivo una vez al día. Se inyectó el rituximab (20 mg/kg) al control positivo dos veces por semana. El grupo negativo con el aceite mixto se administró intragástricamente todos los días. Durante el período de administración, se midió el volumen del tumor y el peso de los ratones desnudos dos veces por semana. El dibujo del crecimiento tumoral se basó en el volumen tumoral y en el tiempo de administración (figura 10), por lo que se pudo estimar el efecto del compuesto sobre el crecimiento del tumor.

Ejemplo 29: Inhibición del crecimiento de los xenoinjertos de células de Ishikawa de cáncer endometrial humano por los compuestos

Se trataron ratones desnudos con tumor de xenoinjerto de células de Ishikawa cáncer de endometrio humano con los compuestos de ensayo para probar su efecto sobre la inhibición del crecimiento de tumores. El tumor fue tomado de ratones desnudos con células de Ishikawa y cortado en piezas pequeñas. Piezas pequeñas de tumor se implantaron en la axila bajo el miembro delantero derecho de los ratones desnudos femeninos. Después de la implantación, los ratones se inyectaron con solución E2 β una vez al día a la dosis de 7 μ g por ratón durante 6 días para estimular el crecimiento en los ratones del experimento. A partir del séptimo día, los ratones se administraron intragástricamente con una solución que contenía los compuestos de ensayo y aceite de maíz a la dosis de 35 mg/kg. Se utilizó acetato de medroxiprogesterona como control positivo. Se usó aceite mixto como control negativo. El compuesto de ensayo se dispersó en aceite mixto (20 mg/mL). A los ratones se les administró respectivamente el compuesto de ensayo, acetato de medroxiprogesterona y aceite mixto a la dosis de 35 mg/kg durante 15-21 días. Luego los ratones fueron sacrificados y los tejidos tumorales se diseccionaron y pesaron. La tasa de inhibición del crecimiento tumoral fue un porcentaje calculado usando la fórmula: tasa de inhibición del crecimiento tumoral = (peso promedio del tumor en el control negativo-peso promedio del tumor tratado con el compuesto de ensayo)/peso promedio del tumor en el control negativo. El resultado se dibuja como gráfico de barras, con referencia a la figura 11.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,

5 en la que:

R^2 , R^3 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C_{1-4}), alquilo (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno, halógeno, ciano y alcoxi (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno, y R^4 es alquilo (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno.

10 2. El compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R^2 , R^3 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, halógeno, ciano, alquilo (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno, y alcoxi (C_{1-4}) sustituido con uno o más átomos de halógeno.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es:

2-(4-trifluorometilfenil)-3,5,7-trihidroxi-8-(3-metil-2-buten-1-il)-4H-cromen-4-ona.

15 4. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de las reivindicaciones 1-3, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 5. Uso del compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer relacionado con ER- α 36.

25 6. El uso según la reivindicación 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer colorrectal (cáncer de colon, cáncer colorrectal), cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, laringocarcinoma, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, celiotelioma, mieloma, cáncer neuroendocrino, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer cutáneo, cáncer de sarcoma de tejidos blandos, cáncer de médula espinal, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer tiroideo y cáncer uterino.

30 7. El uso según la reivindicación 6, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, cáncer de pulmón, mieloma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de sarcoma de tejido blando y cáncer uterino.

8. El uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de ovario y leucemia.

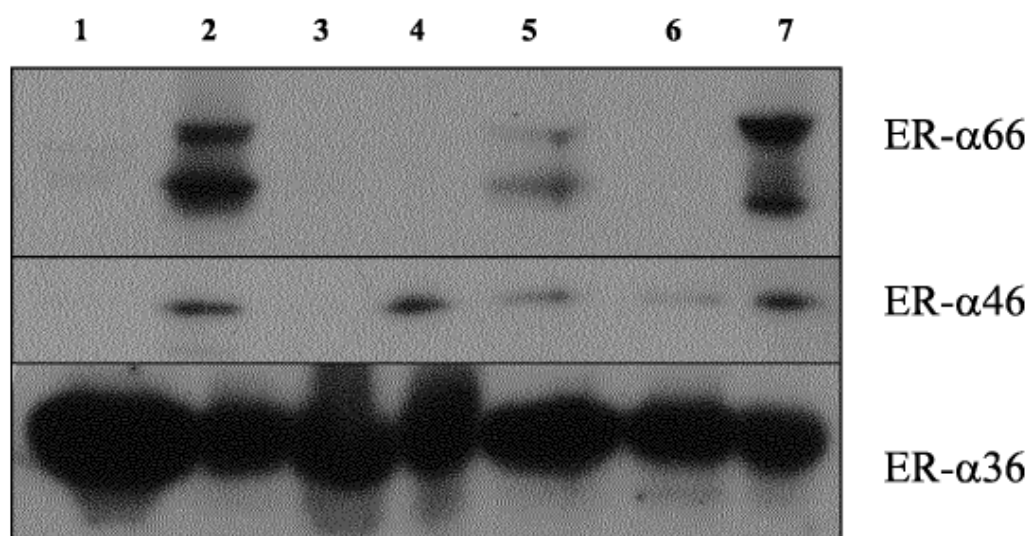


Figura 1

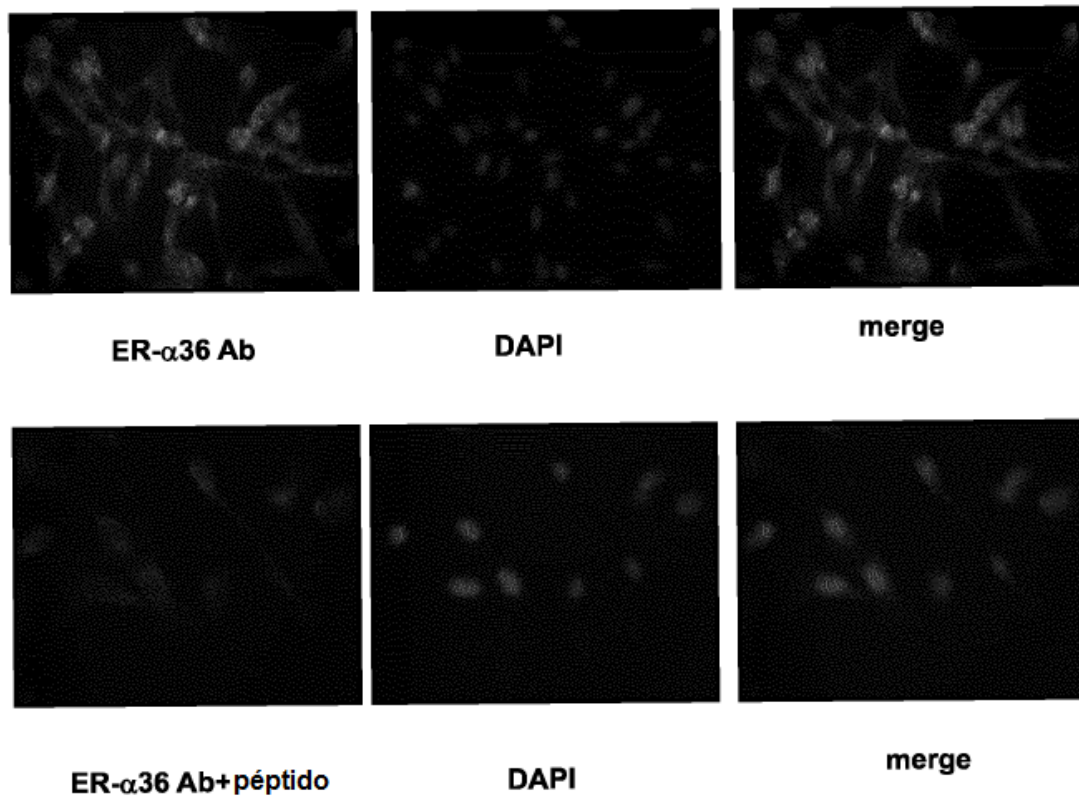


Figura 2

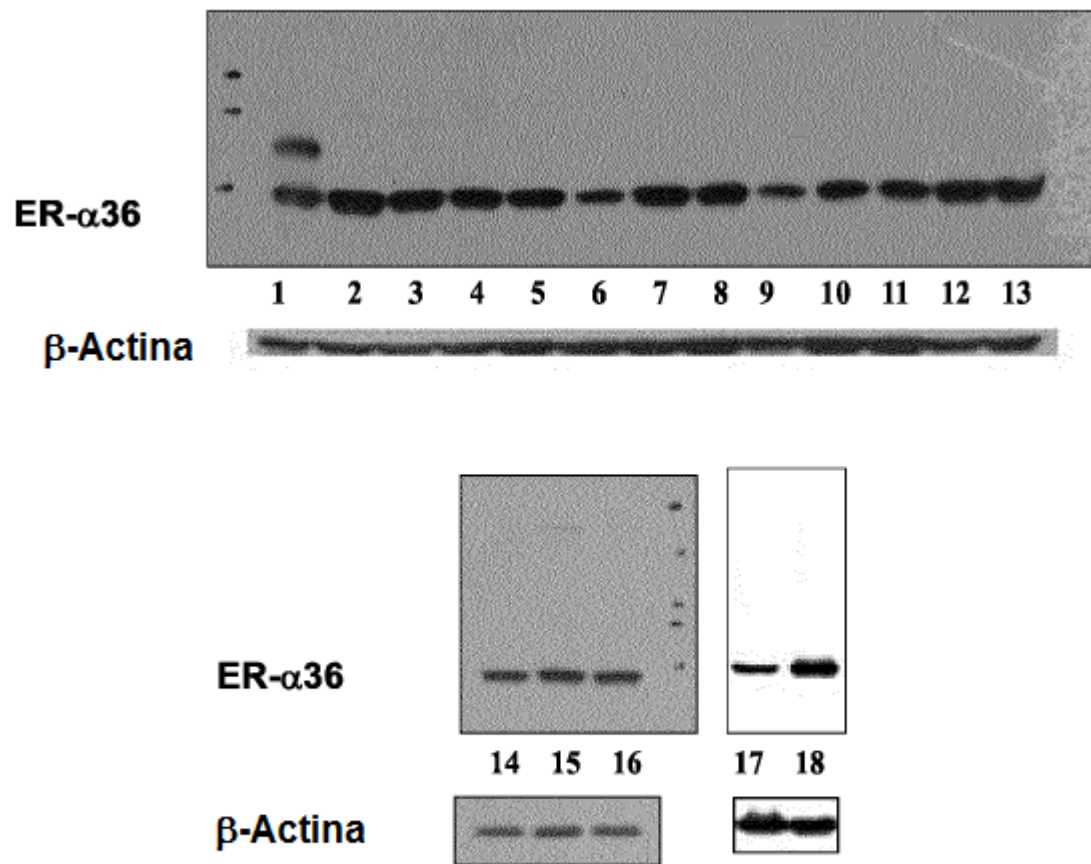


Figura 3

Inhibición de los compuestos en BGC-823 de cáncer de estómago

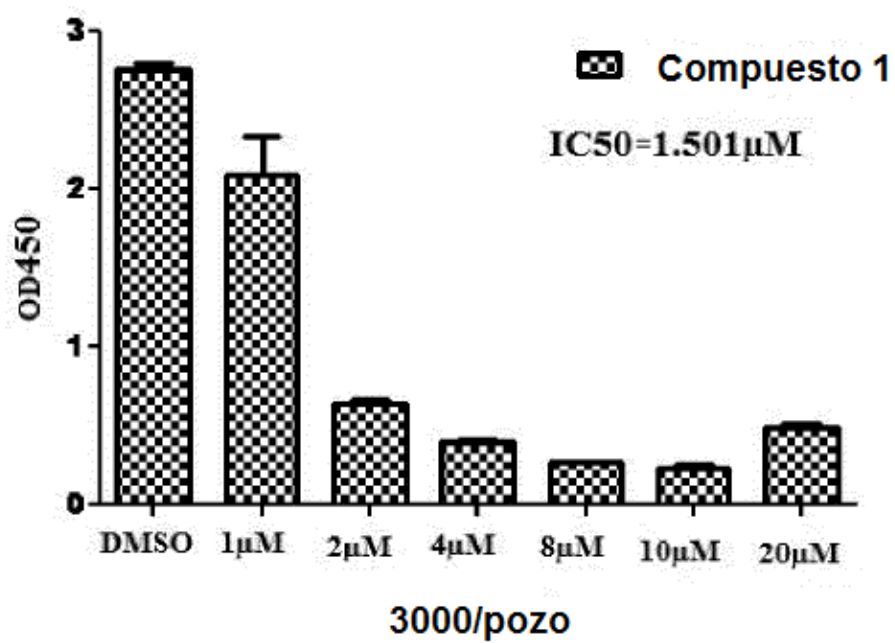


Figura 4

**Inhibición en células H460 de cáncer de pulmón
in vitro por los compuestos**

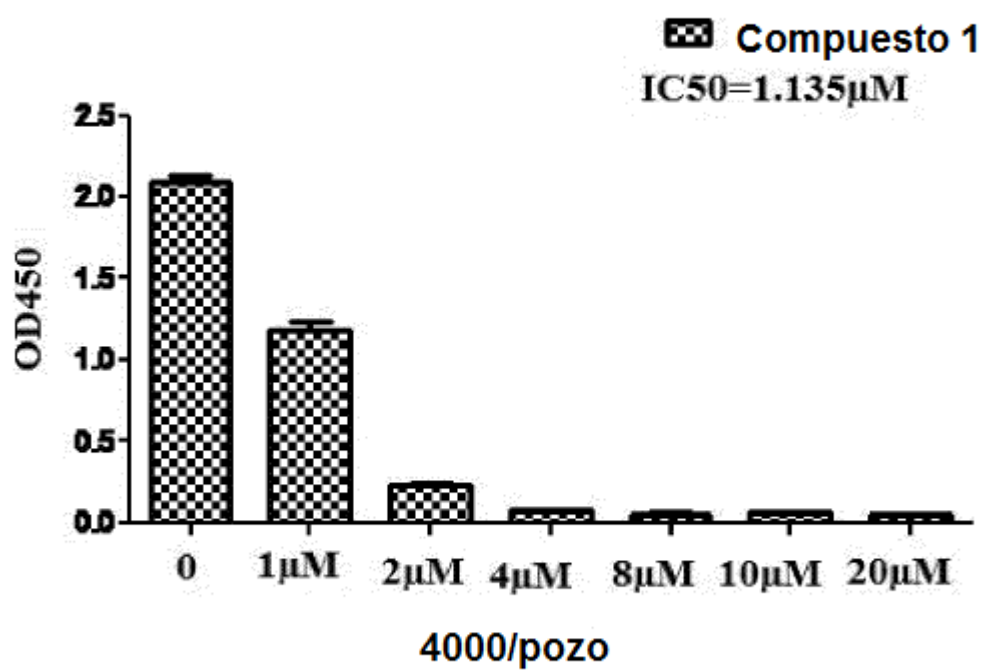


Figura 5

Inhibición en células LS174T de cáncer de colon in vitro por los compuestos

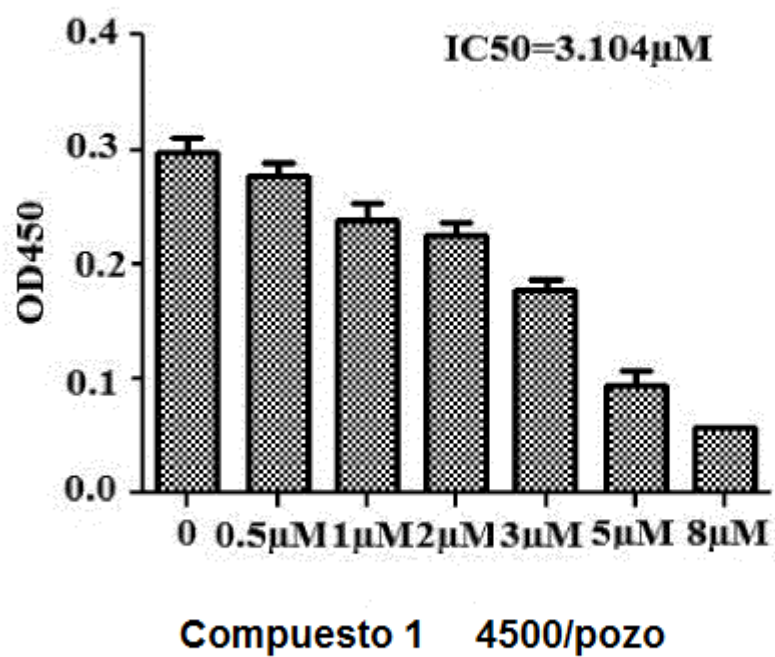


Figura 6

Inhibición en células PANC-1 de cáncer de páncreas in vitro por los compuestos

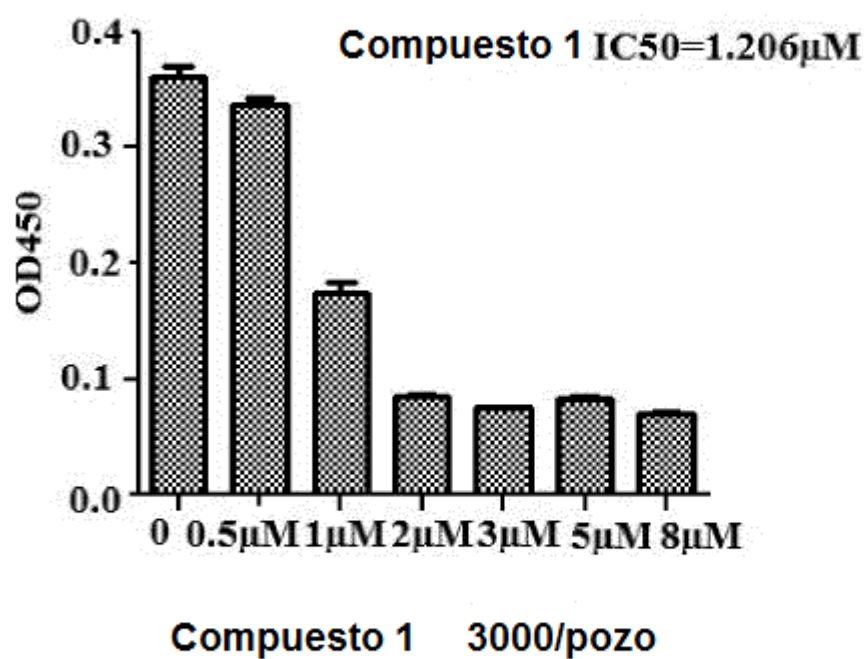


Figura 7

**Inhibición en células PC-3 de cáncer de próstata
in vitro por los compuestos**

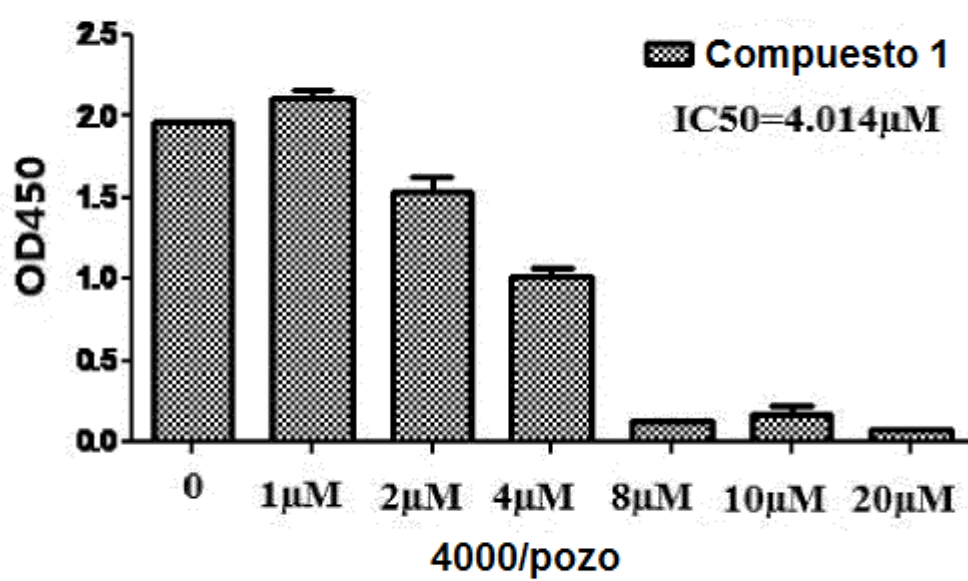


Figura 8

Inhibición en crecimiento del tumor de ratones desnudos portadores de Bcap-37 de cáncer de mama por los compuestos

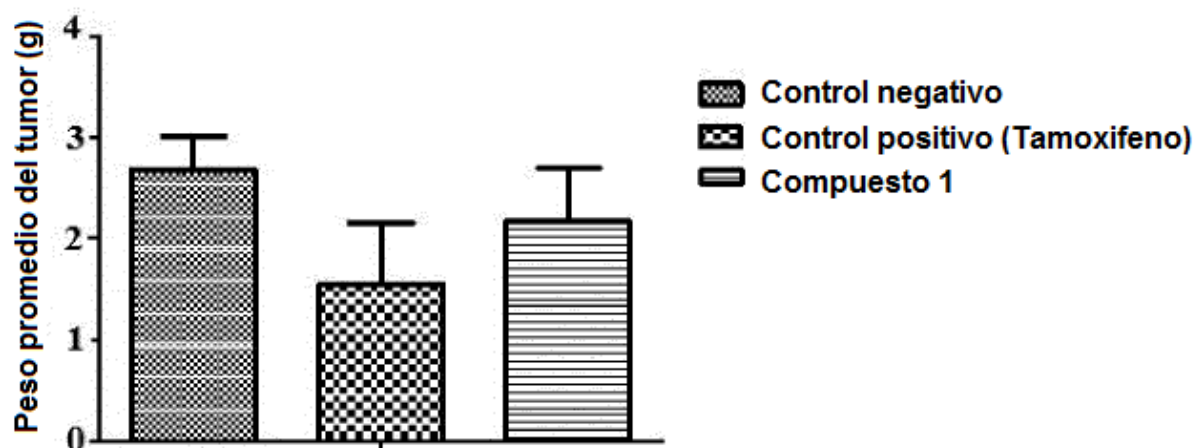


Figura 9

Curva de crecimiento de ratones desnudos portadores de tumor Daudi de linfoma B por los compuestos

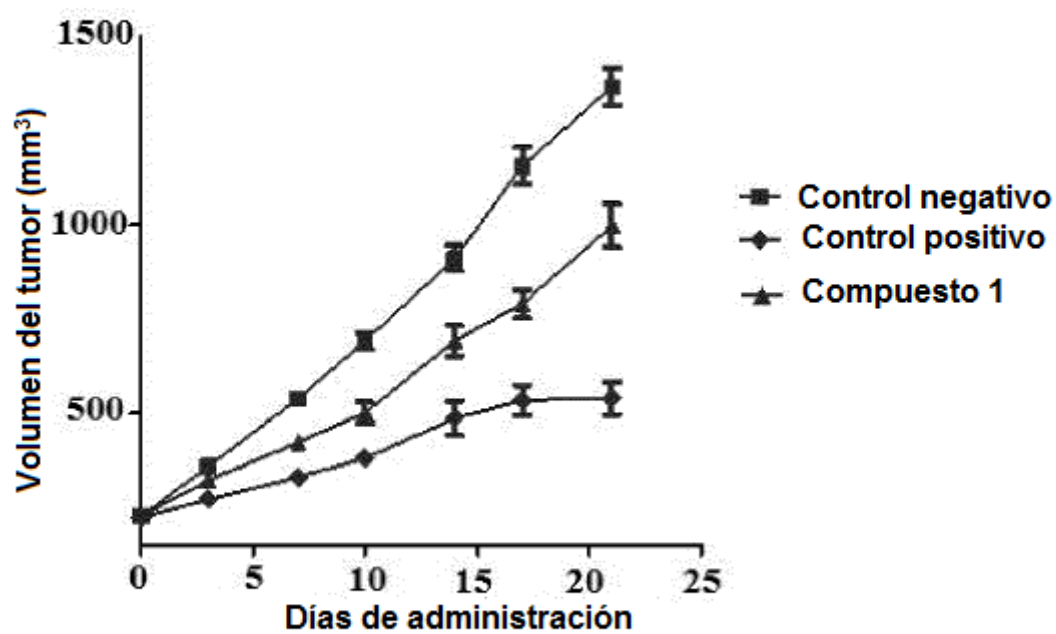


Figura 10

**Inhibición en ratones desnudos portadores de Ishikawa de
cáncer de endometrio humano por los compuestos**

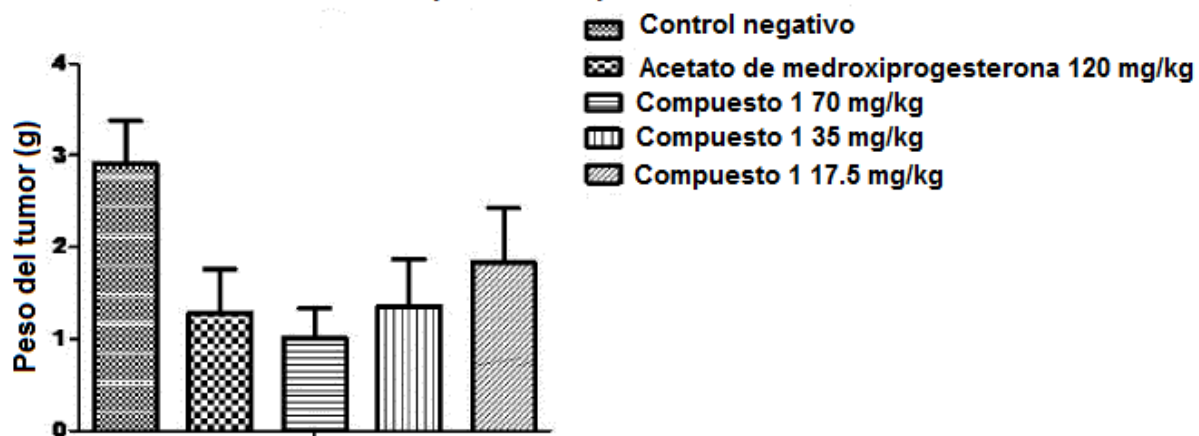


Figura 11