

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 003**

51 Int. Cl.:

C07C 43/23 (2006.01)

C07C 229/12 (2006.01)

A61K 31/09 (2006.01)

A61K 31/225 (2006.01)

A61P 5/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2009 PCT/CA2009/000902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10000066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2009 E 09771876 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2307342**

54 Título: **Productos terapéuticos derivados de éter diglicidílico y métodos para su uso**

30 Prioridad:

02.07.2008 US 129537

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

31.10.2017

73 Titular/es:

BRITISH COLUMBIA CANCER AGENCY BRANCH (50.0%)

600 West 10th Avenue

Vancouver, BC V6T 1Z3, CA y

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)

72 Inventor/es:

SADAR, MARIANNE, D.;

MAWJI, NASRIN, R.;

WANG, JUN;

ANDERSEN, RAYMOND, J.;

WILLIAMS, DAVID, E. y

LEBLANC, MIKE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 003 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

Productos terapéuticos derivados de éter diglicidílico y métodos para su uso

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a productos terapéuticos, a sus usos y a métodos para el tratamiento de diversas indicaciones, incluyendo varios cánceres. En particular, la invención se refiere a terapias y a métodos de tratamiento para cánceres, tales como cáncer de próstata, incluyendo todos los estadios y dependiente de andrógeno, sensible a andrógenos e independiente de andrógenos (también denominado refractario hormonal, resistente a la castración, resistente a la privación de andrógenos, resistente a la ablación de andrógenos, independiente del empobrecimiento de andrógenos, recurrente a la castración, recurrente a anti-andrógenos).

15 **Antecedentes**

Los andrógenos median sus efectos a través del receptor de andrógenos (RA). Los andrógenos desempeñan un papel en una amplia serie de respuestas fisiológicas y de desarrollo y están involucrados en la diferenciación sexual masculina, en el mantenimiento de la espermatogénesis y en la regulación de gonadotropina masculina (R. K. Ross, G. A. Coetzee, C. L. Pearce, J. K. Reichardt, P. Bretsky, L. N. Kolonel, B. E. Henderson, E. Lander, D. Altschuler y G. Daley, *Eur Urol* 35, 355-361 (1999); A. A. Thomson, *Reproduction* 121, 187-195 (2001); N. Tanji, K. Aoki y M. Yokoyama, *Arch Androl* 47, 1-7 (2001)). Varias líneas de evidencia demuestran que los andrógenos se asocian con el desarrollo de la carcinogénesis de próstata. En primer lugar, los andrógenos inducen la carcinogénesis de próstata en modelos de roedores (R. L. Noble, *Cancer Res* 37, 1929-1933 (1977); R. L. Noble, *Oncology* 34, 138-141 (1977)) y hombres que reciben andrógenos en forma de esteroides anabólicos tienen una mayor incidencia de cáncer de próstata (J. T. Roberts y D. M. Essenhig, *Lancet* 2, 742 (1986); J. A. Jackson, J. Waxman y A. M. Spiekerman, *Arch Intern Med* 149, 2365-2366 (1989); P. D. Guinan, W. Sadoughi, H. Alsheik, R. J. Ablin, D. Alrenga e I. M. Bush, *Am J Surg* 131, 599-600 (1976)). En segundo lugar, el cáncer de próstata no se desarrolla si los seres humanos o perros son castrados antes de la pubertad (J. D. Wilson y C. Roehrborn, *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4324-4331 (1999); G. Wilding, *Cancer Surv* 14, 113-130 (1992)). La castración de los adultos de sexo masculino provoca la involución de la próstata y la apoptosis del epitelio prostático mientras no se produce efecto alguno en los genitales externos de otros de sexo masculino (E. M. Bruckheimer y N. Kyprianou, *Cell Tissue Res* 301, 153-162 (2000); J. T. Isaacs, *Prostate* 5, 545-557 (1984)). Esta dependencia de andrógenos proporciona el fundamento subyacente para tratar el cáncer de próstata con castración química o quirúrgica (ablación androgénica).

Los andrógenos también desempeñan un papel en los cánceres femeninos. Un ejemplo es el cáncer de ovarios cuando los niveles elevados de andrógenos se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovarios (K. J. Helzlsouer, A. J. Alberg, G. B. Gordon, C. Longcope, T. L. Bush, S. C. Hoffman y G. W. Comstock, *JAMA* 274, 1926-1930 (1995); R. J. Edmondson, J. M. Monaghan y B. R. Davies, *Br J Cancer* 86, 879-885 (2002)). El RA se ha detectado en la mayoría de los cánceres de ovario (H. A. Risch, *J Natl Cancer Inst* 90, 1774-1786 (1998); B. R. Rao y B. J. Slotman, *Endocr Rev* 12, 14-26 (1991); G. M. Clinton y W. Hua, *Crit Rev Oncol Hematol* 25, 1-9 (1997)), mientras que los receptores de estrógenos alfa (REa) y el receptor de progesterona se detectan en menos del 50 % de los tumores ováricos.

El único tratamiento eficaz disponible para el cáncer de próstata avanzado, es la retirada de andrógenos que son esenciales para la supervivencia de las células epiteliales de la próstata. La terapia de ablación androgénica produce una reducción temporal en la carga tumoral concomitante con una disminución de antígeno específico de la próstata (AEP) en suero. Desafortunadamente, el cáncer de próstata, eventualmente, puede reproducirse de nuevo en ausencia de andrógenos (enfermedad independiente de andrógenos) (Huber *et al* 1987 *Scand J Urol Nephrol.* 104, 33-39). La enfermedad independiente de andrógenos se caracteriza bioquímicamente antes de la aparición de los síntomas por un título creciente de AEP en suero (Miller *et al* 1992 *J. Urol.* 147, 956-961). Una vez que la enfermedad se convierte en independiente de andrógenos, la mayoría de los pacientes sucumben a la enfermedad en un periodo de dos años.

El RA tiene dominios funcionales distintos, que incluyen el dominio de unión a ligando (DUL) del extremo carboxi-terminal, un dominio de unión a ADN (DUA) que comprende dos motivos dedo de cinc y un dominio N-terminal (DNT) que contiene uno o más dominios de activación transcripcional. La unión de andrógenos (ligando) a DUL del RA resulta en su activación, de manera que el receptor puede unirse eficazmente a su sitio de consenso de ADN específico, denominado el elemento de respuesta a andrógenos (ERA), en las regiones promotoras y potenciadoras de genes regulados "normalmente" por andrógenos, tales como AEP, para iniciar la transcripción. El RA se puede activar en ausencia de andrógenos por estimulación de la vía de la proteína quinasa (PKA) dependiente de AMPc, con interleucina-6 (IL-6) y por diversos factores de crecimiento (Culig *et al* 1994 *Cancer Res.* 54, 5474-5478; Nazareth *et al* 1996 *J. Biol. Chem.* 271, 19900-19907; Sadar 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783; Ueda *et al* 2002 *A J. Biol. Chem.* 277, 7076-7085; y Ueda *et al* 2002 *B J. Biol. Chem.* 277, 38087-38094). Se ha demostrado que el mecanismo de transformación independiente del ligando del RA implica: 1) aumento de la proteína RA nuclear que sugiere translocación nuclear; 2) aumento de la formación de complejos RA/ERA y 3) DNT de RA (Sadar 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783; Ueda *et al* 2002 *A J. Biol. Chem.* 277, 7076-7085; y Ueda *et al* 2002 *B J. Biol. Chem.*

277, 38087-38094). El RA puede activarse en ausencia de andrógenos testiculares por vías de transducción de señales alternativas en la enfermedad independiente de andrógenos, que es consistente con el hallazgo de que la proteína RA nuclear está presente en los tumores secundarios de cáncer de próstata (Kim *et al* 2002 *Am. J. Pathol.* 160, 219-226; y van der Kwast *et al* 1991 *Inter. J. Cancer* 48, 189-193).

5 Los inhibidores disponibles de RA incluyen anti-andrógenos no esteroideos, tales como bicalutamida (Casodex™), nilutamida, flutamida y el anti-andrógeno esteroideo, acetato de ciproterona. Estos anti-andrógenos se dirigen a DUL del RA y fallan principalmente debido supuestamente a la afinidad deficiente y mutaciones que conducen a la activación del RA por estos mismos anti-andrógenos (Taplin, M.E., Bubley, G.J., Kom Y.J., Small E.J., Uptonm M., Rajeshkumarm B., Balkm S.P., *Cancer Res.*, 59, 2511-2515 (1999)). Estos anti-andrógenos tampoco tendrían efecto alguno sobre las variantes de corte y empalme de RA recientemente descubiertas que carecen del dominio de unión a ligando (DUL) para dar lugar a un receptor constitutivamente activo que promueve la progresión del cáncer de próstata independiente de andrógenos (Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ., *Cancer Res* 68, 5469-77, 2008; Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG, Kung HJ, Brodie AM, Edwards J, Qiu Y., *Cancer Res.* 69, 2305-13, 2009).

La terapia convencional se ha concentrado en la activación dependiente de andrógenos del RA a través de su dominio C-terminal. Estudios recientes que desarrollan antagonistas con respecto a RA se han concentrado en el C-terminal y específicamente: 1) el bolsillo alostérico y la actividad AF-2 (Estébanez-Perpiñá *et al* 2007, *PNAS* 104, 16074-16079); 2) procedimiento *in silico* de "reposicionamiento de fármacos" para la identificación de antagonistas no esteroideos (Bisson *et al* 2007, *PNAS* 104, 11927-11932); e interacciones con co-activador o co-represor (Chang *et al* 2005, *Mol Endocrinology* 19, 2478-2490; Hur *et al* 2004, *PLoS Biol* 2, E274; Estebanez-Perpiñá *et al* 2005, *JBC* 280, 8060-8068; He *et al* 2004, *Mol Cell* 16, 425-438).

25 El DNT de RA es también una diana para el desarrollo de fármacos (p. ej., documento WO 2000/001813), ya que el DNT desempeña un papel en la activación del RA en ausencia de andrógenos (Sadar, M.D. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783; Sadar MD *et al* 1999 *Endocr Relat Cancer.* 6, 487-502; Ueda *et al* 2002 *J. Biol. Chem.* 277, 7076-7085; Ueda 2002 *J. Biol. Chem.* 277, 38087-38094; Blaszczyk *et al* 2004 *Clin Cancer Res.* 10, 1860-9; Dehm *et al* 2006 *J Biol Chem.* 28, 27882-93; Gregory *et al* 2004 *J Biol Chem.* 279, 7119-30). El DNT de RA es importante en la progresión hormonal del cáncer de próstata como se muestra mediante la aplicación de moléculas señuelo (Quayle *et al* 2007, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 104,1331-1336).

35 Si bien la estructura cristalina se ha resuelto para el DUL del C-terminal del RA, esto no ha sido el caso para DNT debido a su alta flexibilidad y trastorno intrínseco en solución (Reid *et al* 2002 *J. Biol. Chem.* 277, 20079-20086), obstaculizando así los enfoques para el descubrimiento de fármacos de acoplamiento molecular virtual.

Satoh *et al* (2004 *Food and Chemical Toxicology* 42, 983-993) desvelan en un estudio en el contexto de seguridad alimentaria que el éter diglicidílico del bisfenol A (EDGBA) y éter diglicidílico del bisfenol F (EDGBF) pueden tener efectos anti-androgénicos.

40 Fehlberg *et al* (2002 *Biochem. J.* 362, 573-578) desvelan la actividad apoptótica de EDGBA en células tumorales.

Sumario

45 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento fortuito de que compuestos descritos en la presente memoria modulan la actividad del receptor de andrógenos (RA). Específicamente, los compuestos identificados en la presente memoria, muestran la inhibición de la transactivación del dominio N-terminal (DNT) de RA, que puede ser útil para bloquear *in vivo* el crecimiento tumoral en presencia y ausencia de andrógenos. El descubrimiento fue particularmente fortuito ya que la identificación sistemática inicial de extractos de invertebrados marinos estaba sometiéndose a ensayo para la inhibición de la transactivación de DNT de RA en al menos 50 % y se determinó que algunos de los compuestos identificados en esa identificación sistemática inicial tenían un parecido estructural con EDGBA (éter diglicidílico del bisfenol A). El parecido con EDGBA sugiere que estos compuestos tienen probablemente un origen industrial y se bioacumulan por la esponja del agua de mar contaminada. Por consiguiente, debido a las actividades conocidas para los compuestos de Edgba, es muy poco probable que los presentes derivados de EDGBA se hayan identificado sistemáticamente en el ensayo en cualquier otra circunstancia.

60 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse para usos de investigación *in vivo* o *in vitro* (es decir, no clínicos) para investigar los mecanismos de receptores huérfanos y nucleares (incluyendo los receptores esteroideos, tales como el receptor de andrógenos). Además, estos compuestos se pueden usar individualmente o como parte de un kit para la investigación *in vivo* o *in vitro* para investigar las vías de transducción de señales y/o la activación de receptores huérfanos y nucleares que usan proteínas recombinantes, células mantenidas en cultivo y/o modelos animales.

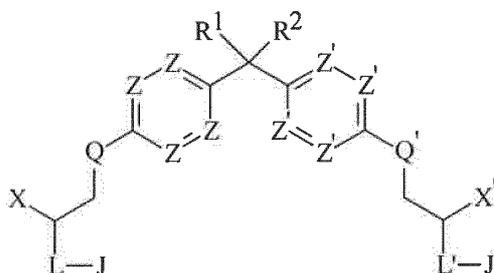
65 La presente invención también se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que los compuestos descritos

en la presente memoria también puede usarse para modular la actividad del receptor de andrógenos ya sea *in vivo* o *in vitro* para tanto investigación como para usos terapéuticos. Los compuestos se pueden usar en una cantidad eficaz para que la actividad del receptor de andrógenos pueda modularse. El receptor de andrógenos puede ser de mamífero. Alternativamente, el receptor de andrógenos puede ser de un ser humano. En particular, los compuestos

5 pueden usarse para inhibir la transactivación del dominio N-terminal (DNT) de RA. Los compuestos con actividad moduladora se pueden usar ya sea en un modelo *in vivo* o *in vitro* para el estudio de al menos una de las siguientes indicaciones: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer endometrial, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz y degeneración macular relacionada con la edad. Además, los compuestos con actividad moduladora se pueden usar para el tratamiento de

10 al menos una de las siguientes indicaciones: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer endometrial, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz (testotoxicosis) y degeneración macular relacionada con la edad. La indicación de tratamiento puede ser cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata independiente de andrógenos. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata dependiente de andrógenos.

De acuerdo con una realización, se proporciona un uso de un compuesto que tiene la siguiente estructura:



20 en la que:

X es CH₂F, CH₂ Br, CH₂I, CH₂OG o CH₂OGOG';

X' es H, CH₃, CH₂F, CH₂Cl, CH₂ Br, CH₂I, CH₂OJ''', CH₂OG o CH₂OGOG';

J, J' y J''' son cada uno independientemente H;

25 L y L' son cada uno independientemente O;

Q y Q' son cada uno independientemente O;

Z y Z' son cada uno independientemente CH;

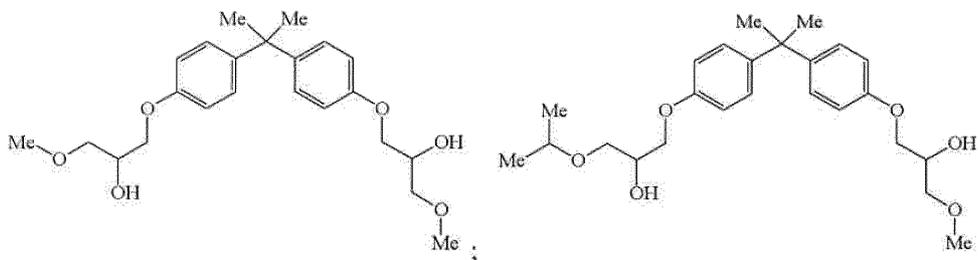
R¹ y R² son cada uno independientemente H, o un alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido;

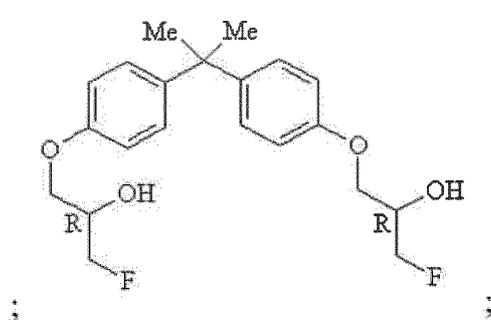
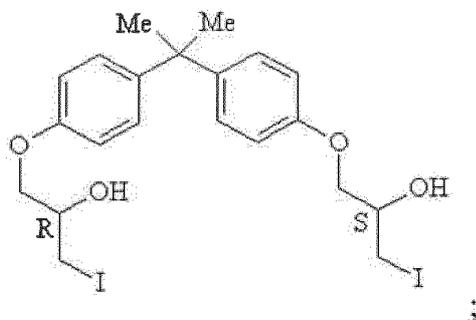
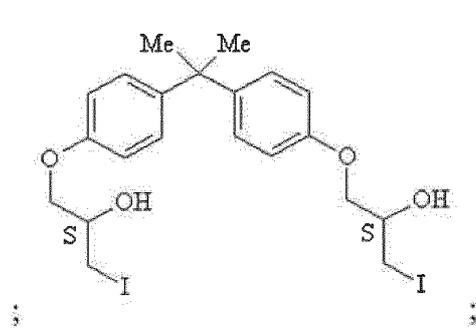
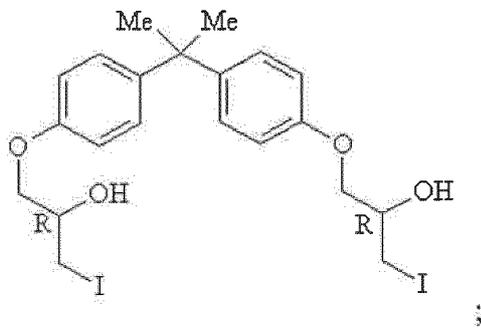
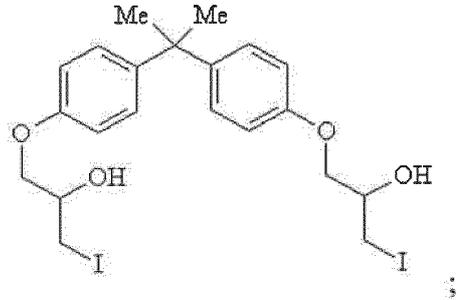
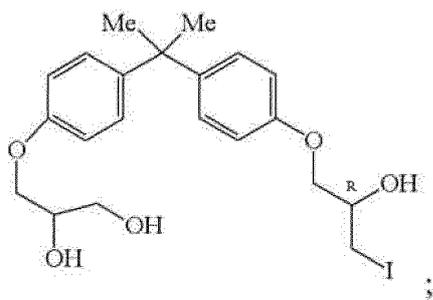
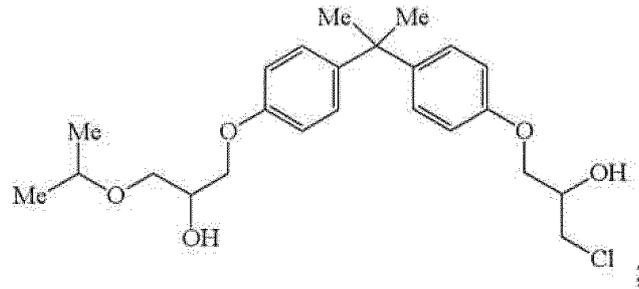
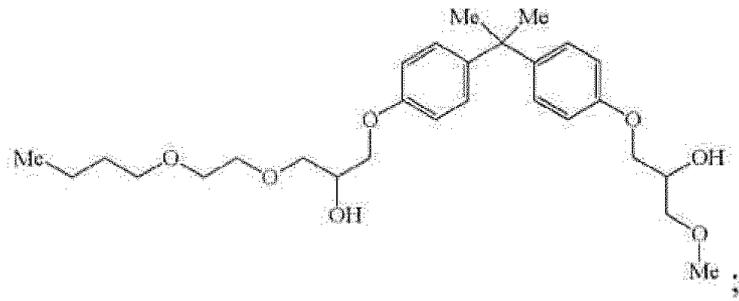
30 cada G y G' es independientemente un alquilo C₁-C₁₀ ramificado, no ramificado o cíclico aromático o cíclico no aromático, sustituido o no sustituido, saturado o no saturado; y

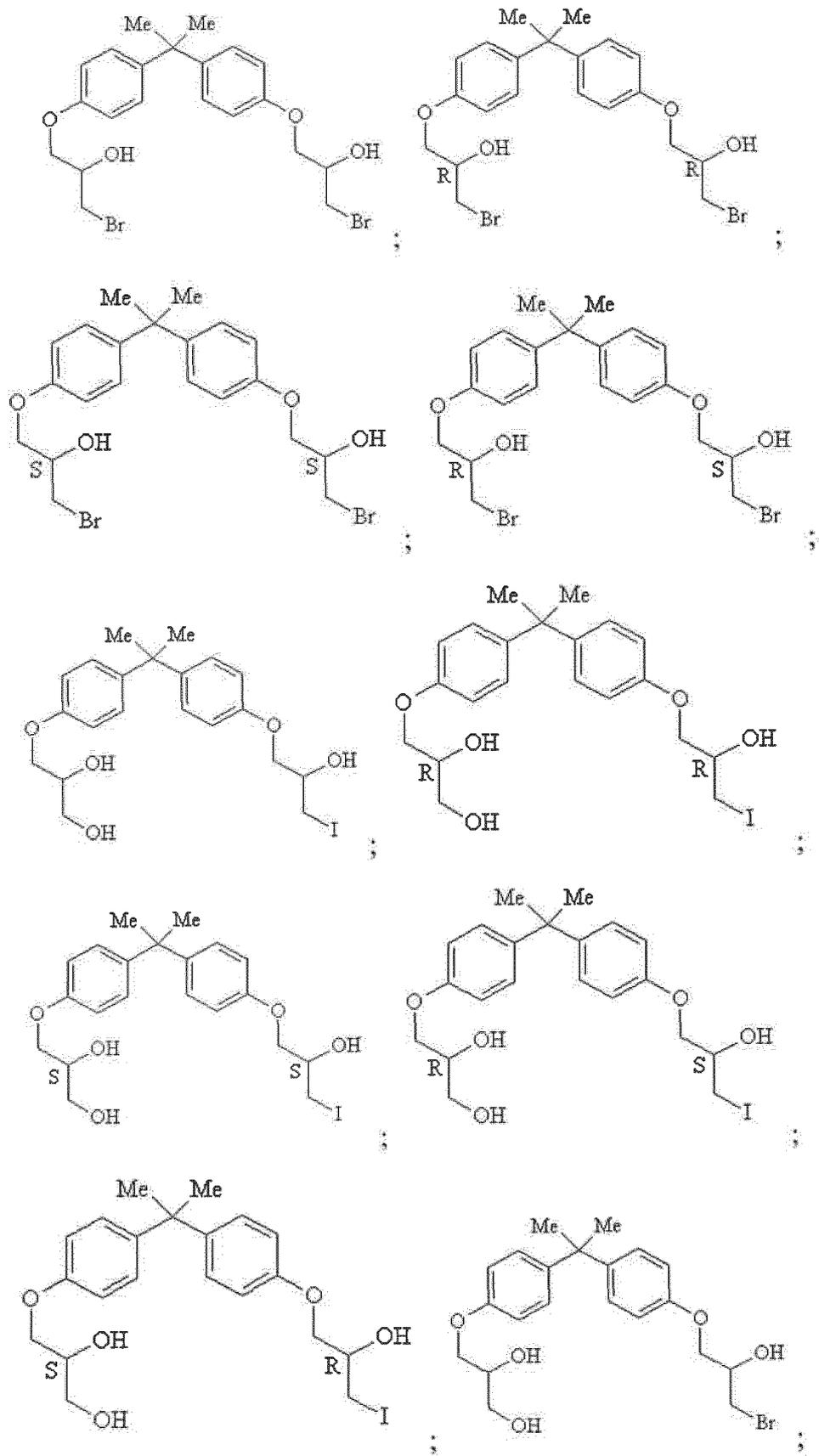
en el que el sustituyente opcional se selecciona entre el grupo que consiste en: oxo, OJ''', COOH, R, OH, OR, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR, NR₂, CN, SH, SR, SO₃H, SO₃R, SO₂R, OSO₃R y NO₂, en el que R es un alquilo C₁-C₁₀ no sustituido;

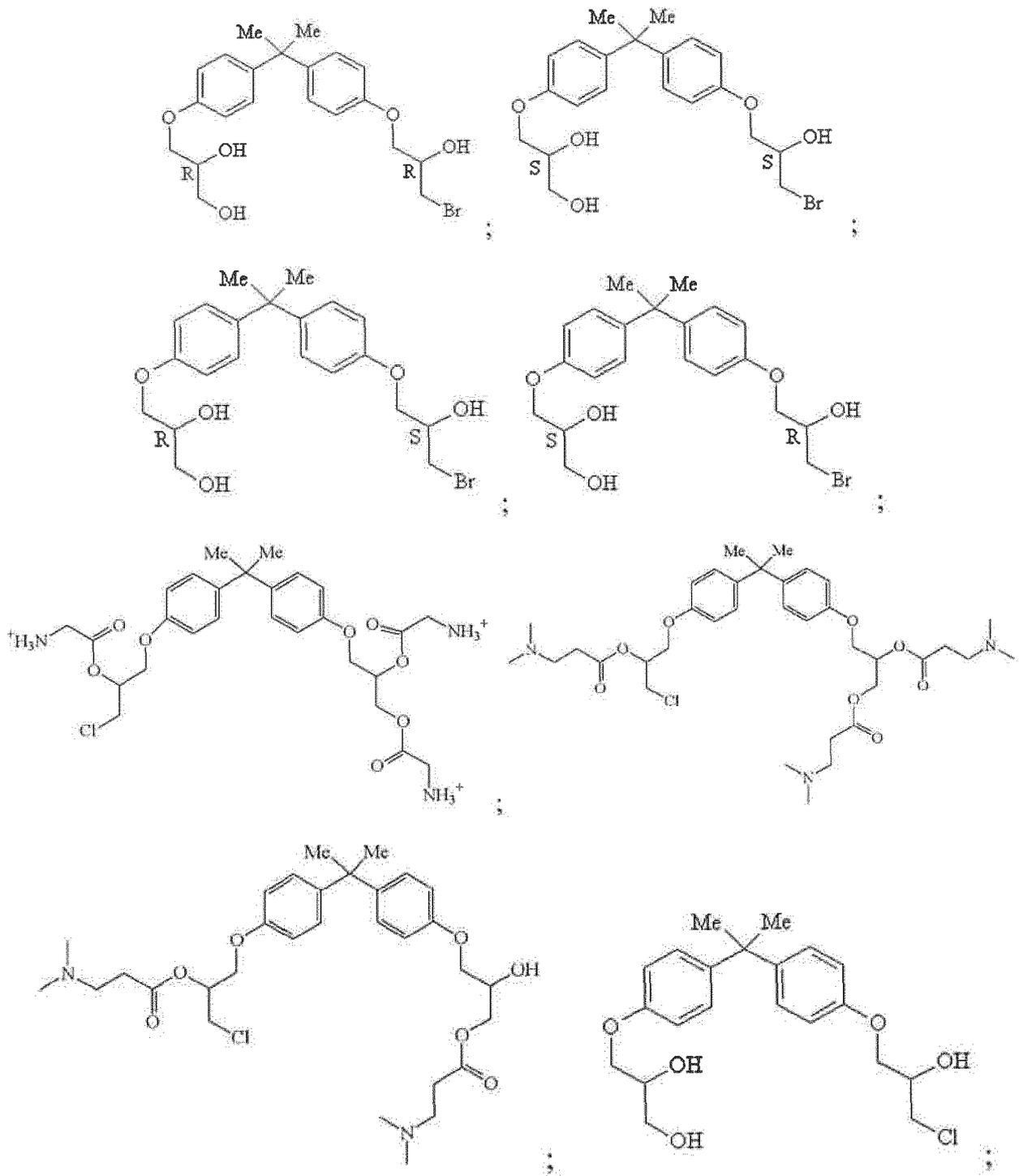
35 para su uso como medicamento.

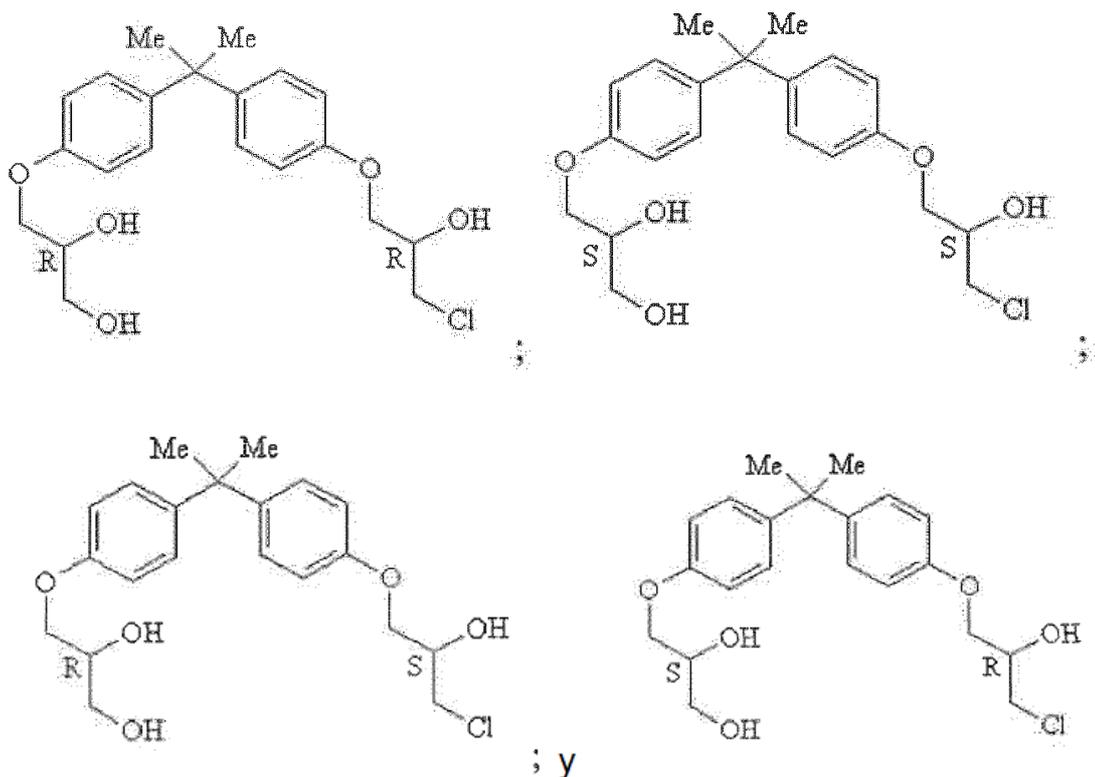
De acuerdo con otras realizaciones, se proporciona un uso de un compuesto seleccionado entre









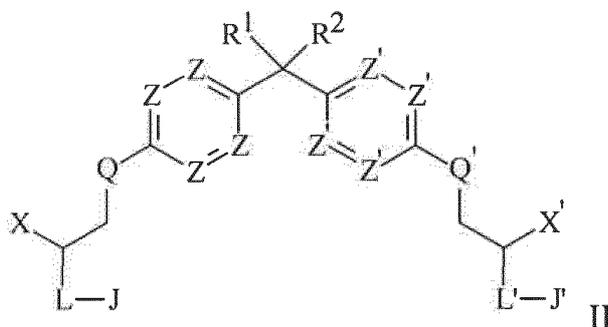


para su uso como medicamento.

5 Los compuestos descritos en la presente memoria pretenden incluir todas las mezclas racémicas y todos los enantiómeros individuales o combinaciones de los mismos, estén o no representados en la presente memoria.

10 La célula de mamífero puede ser una célula humana. La actividad moduladora de RA puede destinarse para inhibir la actividad del dominio N-terminal de RA. La actividad moduladora de RA puede destinarse para inhibir la actividad del dominio N-terminal (DNT) de RA. La modulación puede ser *in vivo*. La actividad moduladora de RA puede destinarse para el tratamiento de al menos una indicación seleccionada entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de endometrio, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz y degeneración macular relacionada con la edad. La indicación puede ser cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata independiente de andrógenos. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata dependiente de andrógenos.

De acuerdo con otra realización, se proporcionan compuestos que tienen estructuras representadas por la Fórmula II



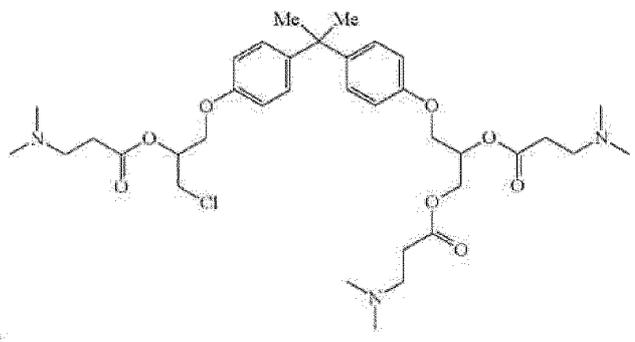
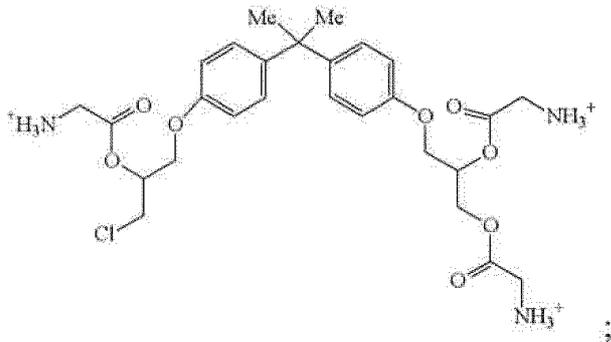
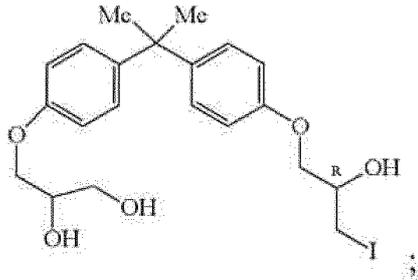
en la que

25 X es CH₂I, CH₂Br, CH₂F, CH₂OCH₃, CH₂O (isopropilo) o CH₂OC₂H₄OC₄H₉;
 X' es CH₂F, CH₂Cl o CH₂O (isopropilo);
 cada J, J' y J'' es independientemente H;
 cada L y L' es independientemente O;
 cada Q y Q' es independientemente O;
 cada Z y Z' es independientemente CH;

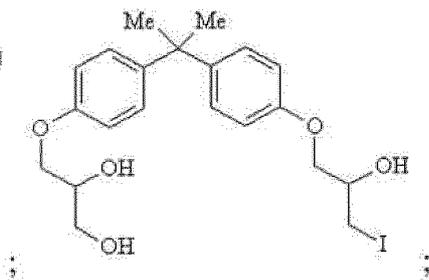
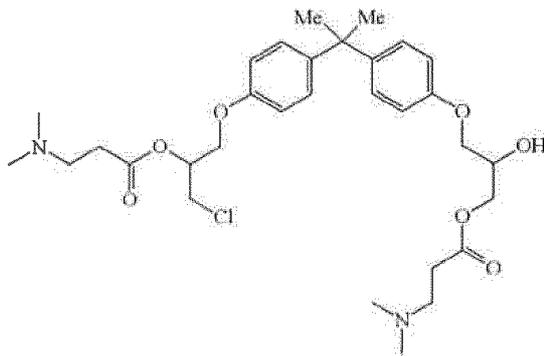
R¹ y R² son cada uno independientemente H; o alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; y
 cada G y G' es independientemente un alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, cíclico no aromático, sustituido o no sustituido, saturado; y
 5 en el que el sustituyente opcional se selecciona entre el grupo que consiste en: oxo, OJ''', COOH, R, OH, OR, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR, NR₂, CN, SH, SR, SO₃H, SO₃R, SO₂R, OSO₃R y NO₂, en el que R es un alquilo C₁-C₁₀ no sustituido.

De acuerdo con otras realizaciones, se proporcionan los siguientes compuestos:

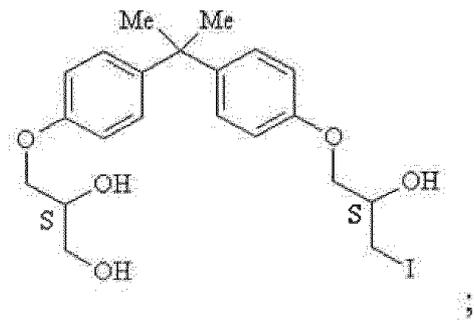
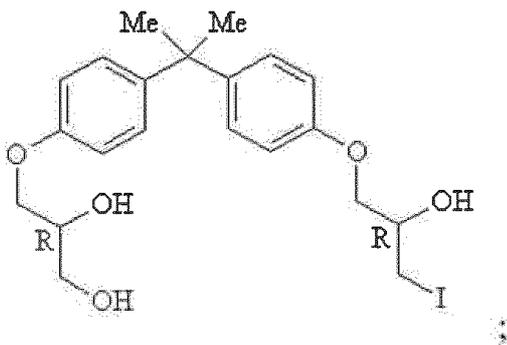
10

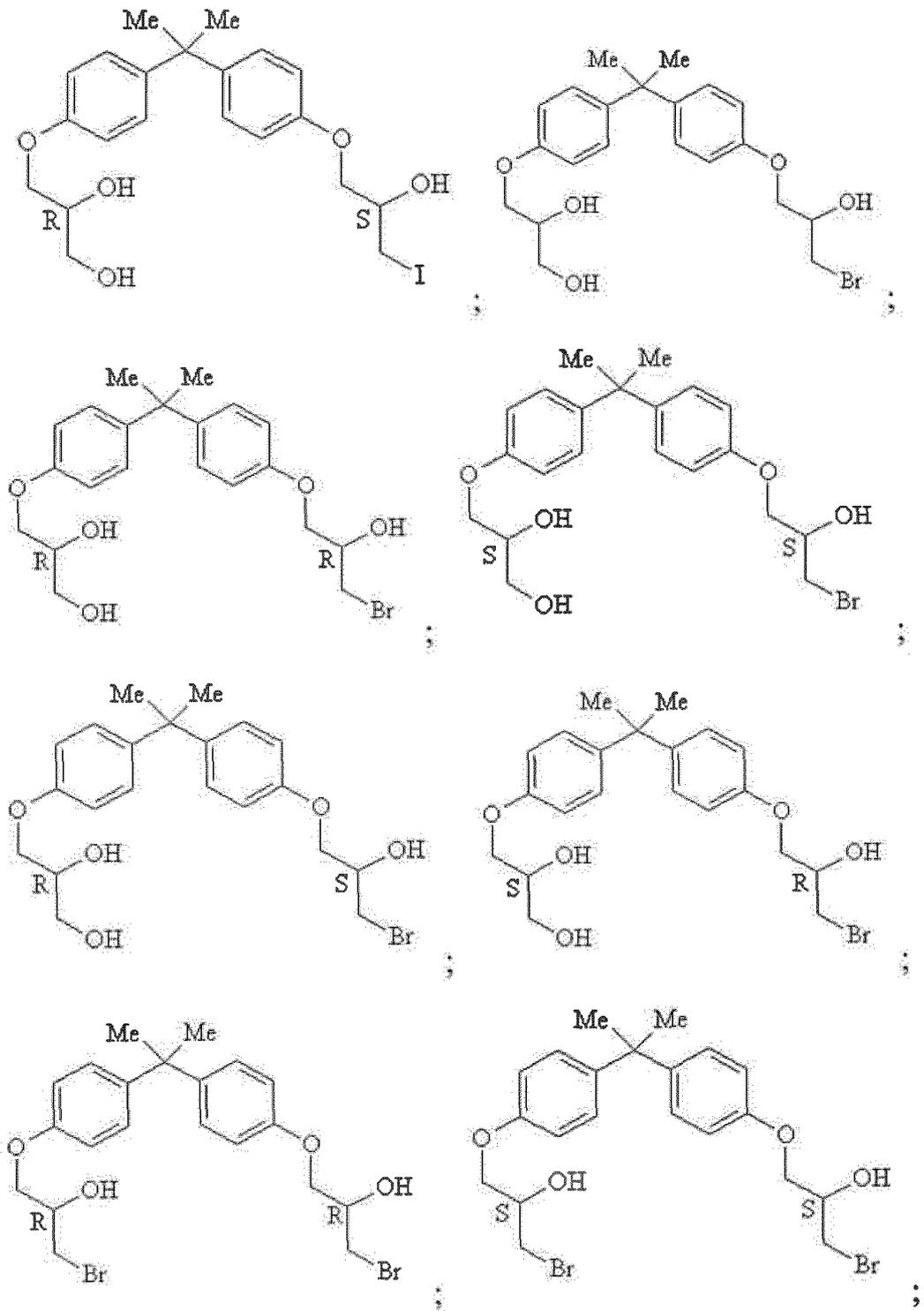


;

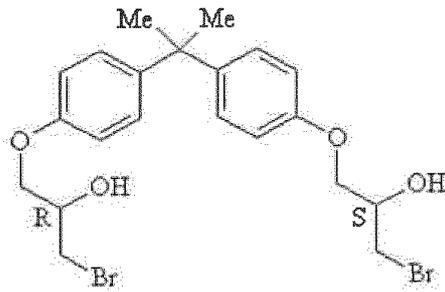


15

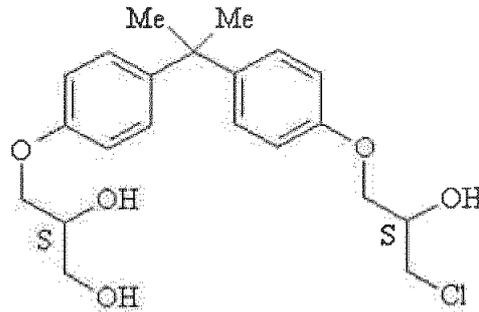




y

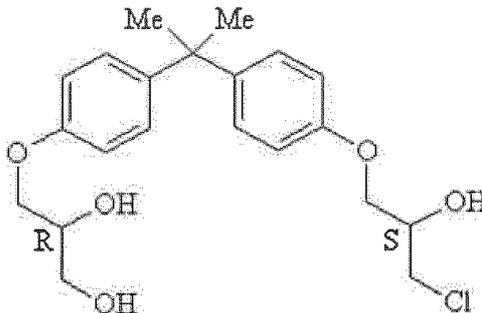


De acuerdo con una realización adicional, se proporciona el compuesto



5

De acuerdo con otra realización adicional, se proporciona el compuesto



10

Los compuestos descritos en la presente memoria pretenden incluir todas las mezclas racémicas y todos los enantiómeros individuales o combinaciones de los mismos, estén o no representados en la presente memoria.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los compuestos anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15

Breve descripción de los dibujos

- 20 **Figura 1** muestra que el extracto PNG01-185 bloqueó la inducción de la actividad de AEP-luciferasa (AEP-luc) por forskolina (FSK, 50 μM) y R1881 (1 nM).
- Figura 2** es un diagrama de flujos que muestra el fraccionamiento de compuestos de PNG 01-185 para identificar PNG 01-185-17-9.
- Figura 3** muestra los efectos de las fracciones de PNG01-185-17 en la actividad de ARR3-luciferasa (ARR3-luc). Las fracciones 17-3 y 17-8 causaron una inhibición del 50 % de la actividad de ARR3-luc.
- 25 **Figura 4** muestra que la fracción PNG01-185-17-8 inhibió la actividad de DNT RA-Gal4-luc.
- Figura 5** el derivado estructural, PNG01-185-17-9-2 (185-9-2) de PNG01-185-17-8 bloqueó FSK (50 μM) (izquierda) y la interleucina-6 (IL-6, 50 ng/ml) (derecha) indujo la transactivación de DNT de RA mientras que la bicalutamida, anti-andrógeno (BIC 10 μM) no tuvo ningún efecto.
- 30 **Figura 6** 185-9-2 (5 μg/ml) inhibió la actividad transcripcional de RA en respuesta al ligando como se mide usando la construcción del gen indicador de AEP(6,1kb)-luciferasa que contiene numerosos elementos de respuesta a andrógenos (ERAs) funcionales y bien caracterizados. La bicalutamida (BIC, 10 μM) se incluyó como control positivo. 185-9-2 NO inhibe la actividad del elemento de respuesta a progesterona (ERP)-indicador de luciferasa o elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG)-indicador de luciferasa en células LNCaP que fueron transfectadas con vectores de expresión para el receptor de progesterona (RP) y el receptor de glucocorticoides (RG)
- 35

y sus construcciones de genes indicadores relevantes (ERP-luc o ERG-luc) y se expusieron a su respectivo esteroide (10 nM, barras negras). Las barras blancas representan ausencia de esteroides (control de etanol).

Figura 7

5 PNG01-185-17-9-2 (185-9-2, 5 µg/ml) inhibió la expresión del gen de AEP endógeno (ARNm de AEP) inducida por R1881 (1 nM) como se mide por QRT-PCR. Los niveles de ARNm de AEP se normalizaron a niveles de ARNm de GAPDH. EMN es la expresión media normalizada.

Figura 8

10 **A.** El análisis ChIP mide el reclutamiento de RA con respecto a AEP-ERA en la región potenciadora en células LNCaP tratadas durante 0, 3 h, 16 h con DHT con o sin 185-9-2 (B2, 10 µg/ml). **B.** Los niveles de proteína RA no se redujeron en los extractos de células enteras de células tratadas durante 3 o 16 horas con 185-9-2 (B2). Análisis de membrana Western de los niveles de RA usando un anticuerpo contra el receptor de andrógenos. Los niveles de proteína b-actina se incluyen como control de carga.

Figura 9

15 **Figura 10**

RA en lisados de células enteras a partir de células LNCaP mantenidas *in vitro* durante 48 horas con 185-9-2 (B2) en presencia o ausencia de DHT. Los resultados son de 3 experimentos distintos.

A. Análisis de membrana Western de los niveles de proteína RA en el citosol o en el núcleo en células LNCaP pretratadas durante 1 hora con 185-9-2 (B2) o DMSO (control) antes de 15, 30, 60, o 120 minutos de tratamiento con 10 nM de DHT. **B.** Microscopía de fluorescencia de las células LNCaP transfectadas con RA-PVF pre-tratadas durante 1 hora con 185-9-2 (B2) o DMSO (control) antes de la adición de 10 nM de DHT y se incubaron durante un periodo adicional de 2 horas.

20 **Figura 11**

Interacción N/C. Las células CV1 se transfectaron con VP16-ARTAD, Gal4-ARLBD y el indicador Gal4-luciferasa y se trataron con R1881 más o menos 185-9-2 (10 µg/ml) o bicalutamida (BIC, 10 µM) durante 24 h.

Figura 12

25 PNG01-185-17-9-2 (185-9-2) bloqueó la proliferación dependiente de andrógenos de células LNCaP. Las células LNCaP se trataron con bicalutamida (BIC, 10 µM) o 185-9-2 (5 µg/ml) durante 1 h antes de la adición de R1881 (0,1 nM). Se recolectaron las células y se midieron para la incorporación de BrdU después de 4 días de tratamiento con andrógenos. $p = 0,0001$ entre 185-9-2 más R1881 y tratadas solamente con R1881.

Figura 13

30 PNG01-185-17-9-2 (185-9-2) NO bloquea la proliferación de células PC3 ($p < 0,05$, ensayo de t). Las células se trataron con un vehículo (DMSO) o 185-9-2 (5 µg/ml) durante 3 días antes de la recolección y la medición de la incorporación de BrdU. Las barras representan la media \pm EEM ($n = 3$ experimentos distintos con 5 replicados por experimento).

Figura 14

35 **A.** Fotografías de xenoinjertos de LNCaP recolectados representativos del día 25 tras la 1ª inyección intratumoral (I.T.) de DMSO (vehículo) o 185-9-2 en animales castrados. La barra negra representa 10 mm. **B.** Curso temporal que muestra el volumen de xenoinjertos de LNCaP a lo largo de la duración del experimento. 185-9-2 redujo el tamaño de los tumores ($n = 10$) mientras que los tumores tratados con DMSO continuaron creciendo ($n = 9$). El volumen tumoral en la primera inyección se fijó a 100 %. La línea continua representa animales tratados con DMSO y la línea discontinua representa tratados con 185-9-2 **C.** 185-9-2 no redujo el peso corporal. El peso corporal se midió en el día 0 y al final del experimento en el día 25 en ratones portadores de xenoinjertos de LNCaP que reciben un vehículo o una molécula pequeña.

Figura 15

40 **A.** Curso temporal que compara la inyección intravenosa (I.V.) de 185-9-2 (B2) frente a la inyección intratumoral (I.T.) de 185-9-2 y EDGBA.2HCl (B3, inyección I.T. de 20 mg/kg de peso corporal cada 5 días, $n = 3$ para cada grupo) en el volumen de xenoinjertos de LNCaP a lo largo de la duración de los experimentos. 185-9-2 (B2) y EDGBA.2HCl (B3) redujeron el tamaño de los tumores mientras que los tumores tratados con DMSO continuaron creciendo. El volumen tumoral en la primera inyección se fijó a 100 %. **B.** Fotografías de xenoinjertos de LNCaP recolectados representativos de los animales inyectados por vía intravenosa con control (vehículo DMSO) o 185-9-2 (50 mg/kg de peso corporal cada dos días) en animales castrados 2 días después de la última inyección. La barra negra representa 10 mm. Tinción de secciones del tumor mostrado con TUNEL como una indicación de apoptosis o Ki67 como un marcador de proliferación. **C.** La inyección intravenosa (I.V.) de 185-9-2 no redujo el peso corporal.

Figura 16

50 Histología de los órganos principales recolectados de animales inyectados I.V. (véase la Figura 15) con 185-9-2 (50 mg/kg de peso corporal) cada dos días para un total de 5 inyecciones. Los xenoinjertos se recolectaron 2 días después de la última inyección I.V. y se tiñeron con H y E.

Figura 17

55 **A.** DMSO es el vehículo de control que también se administró por I.V. *In vivo*, 185-9-2 no reduce los niveles de la proteína RA. **A.** Los xenoinjertos se recolectaron de los animales inyectados I.V. 185-9-2 o DMSO (véase la Figura 15) y las secciones se tiñeron para RA usando un anticuerpo monoclonal contra DNT. **B.** Análisis de membrana de Western de los niveles de la proteína RA en lisados de células enteras preparadas a partir de xenoinjertos recolectados en el día 25 de animales inyectados I.T. con 185-9-2 (véase la Figura 14). El carril 1 y 2 son xenoinjertos de 2 animales diferentes tratados con DMSO (control 1 y 2). El carril 3 y 4 son xenoinjertos de 2 animales diferentes tratados con 185-9-2 (B2-1 y B2-2). Las membranas también se tiñeron para citoqueratina 18, un marcador de células epiteliales.

Figura 18

60 ilustra que 185-9-2 disminuyó los niveles de la proteína del factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) en xenoinjertos de LNCaP recolectadas en el día 25 a partir de huéspedes castrados. El FCVE es un importante factor de crecimiento implicado en la angiogénesis. La

65

Figura 19

columna de la izquierda muestra la tinción de un xenoinjerto tratado con un vehículo de control.

A. Fotografías de xenoinjertos de PC3 recolectados representativos del día 25 después de la 1ª inyección intratumoral (I.T.) de DMSO (vehículo) o 185-9-2 (20 mg/kg de peso corporal) en los animales no castrados. La barra negra representa 10 mm. **B.** PNG01-185-017-9-2 tuvo un pequeño efecto sobre el crecimiento del tumor de PC3, pero no redujo la carga tumoral. El curso temporal muestra el volumen de xenoinjertos de PC3 a lo largo de la duración del experimento. El volumen tumoral en la primera inyección se fijó a 100 %. La línea continua representa animales tratados con DMSO y la línea discontinua representa animales tratados con 185-9-2. **C.** 185-9-2 no redujo el peso corporal. El peso corporal se midió en el día 0 y al final del experimento en el día 25 en ratones portadores de xenoinjertos de PC3 que reciben un vehículo o una molécula pequeña.

Figura 20

El éster de glicina de EDGBA.HCL.H2O (**A**) se sometió a ensayo en células LNCaP transfectadas con un vector de expresión para la proteína quimera Gal4DUA-AR¹⁻⁵⁵⁸ con un gen indicador que contiene el sitio de unión a Gal4 como elementos que actúan en cis (p5xGal4UAS-TATA-luciferasa) (**B**). El éster de glicina, Gly-B2-HCl de 185-9-2 (25 µM) bloqueó la transactivación inducida por IL-6 (50 ng/ml) del DNT de RA.

Descripción detallada

Como se usa en la presente memoria, la expresión "alquilo C_x-C_y" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que tiene un esqueleto de carbono o cadena principal de carbono que comprende un número de x a y (con todos los números enteros individuales dentro del intervalo incluido, incluyendo números enteros x e y) de átomos de carbono. Por ejemplo, un "alquilo C₁-C₁₀" es una entidad química que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono en su esqueleto de carbono o cadena principal.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "alquilo C_x-C_y cíclico" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a un compuesto o a una entidad química en el que al menos una porción del esqueleto de carbono o cadena principal de la entidad química se une de manera tal a fin de formar un "bucle", un círculo o un anillo de átomos que se unen entre sí. Los átomos no tienen que unirse todos directamente entre sí, sino más bien pueden unirse directamente a tan solo otros dos átomos en el "bucle". Los ejemplos no limitantes de alquilos cíclicos incluyen benceno, tolueno, ciclopentano, bisfenol y 1-cloro-3-etilciclohexano.

Como se usa en la presente memoria, el término "ramificado" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que comprende un esqueleto o cadena principal que se separa en más de una cadena contigua. Las porciones del esqueleto o cadena principal que se separan en más de una dirección pueden ser lineales, cíclicas o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos no limitantes de un alquilo ramificado son terc-butilo e isopropilo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "no ramificado" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que comprende un esqueleto o cadena principal que no se separa en más de una cadena contigua. Los ejemplos no limitantes de alquilos no ramificados son metilo, etilo, n-propilo, y n-butilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "sustituido" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que tiene un grupo químico reemplazado con un grupo químico diferente que contiene uno o más heteroátomos. A menos que se especifique lo contrario, un alquilo sustituido es un alquilo en el que uno o más átomos de hidrógenos está/están sustituidos con uno o más átomos que no es/no son hidrógenos. Por ejemplo, clorometilo es un ejemplo no limitante de un alquilo sustituido, más particularmente un ejemplo de un metilo sustituido. Aminoetil es otro ejemplo no limitante de un alquilo sustituido, más particularmente, es un etilo sustituido.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "no sustituido" se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que es un hidrocarburo y/o no contiene un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de alquilos no sustituidos incluyen metilo, etilo, terc-butilo y pentilo.

Como se usa en la presente memoria, el término "saturado", cuando se refiere a una entidad química, se usa como entiende normalmente un experto en la materia y a menudo se refiere a una entidad química que comprende solo enlaces simples. Ejemplos no limitantes de entidades químicas saturadas incluyen etano, terc-butilo, y N⁺H₃.

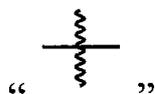
Como se usa en la presente memoria, alquilo C₁-C₁₀ puede incluir, por ejemplo, y sin limitación, alquilo C₁-C₁₀ saturado, alqueno C₂-C₁₀ y alquino C₂-C₁₀. Los ejemplos no limitantes de alquilo C₁-C₁₀ saturado pueden incluir metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, sec-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, i-pentilo, sec-pentilo, t-pentilo, n-hexilo, i-hexilo, 1,2-dimetilpropilo, 2-etilpropilo, 1-metil-2-etilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trietilpropilo, 1,1-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2-etilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, sec-hexilo, t-hexilo, n-heptilo, i-heptilo, sec-heptilo, t-heptilo, n-octilo, i-octilo, sec-octilo, t-octilo, n-nonilo, i-nonilo, sec-nonilo, t-nonilo, n-decilo, i-decilo, sec-decilo y t-decilo. Los ejemplos no limitantes de alqueno C₂-C₁₀ pueden incluir vinilo, alilo, isopropenilo, 1-propeno-2-ilo, 1-buten-1-ilo, 1-buten-2-ilo, 1-buten-3-ilo, 2-buten-1-ilo,

2-buten-2-ilo, octenilo y decenilo. Los ejemplos no limitantes de alquino C_2-C_{10} pueden incluir etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo, octinilo, noninilo y decinilo. Alquilo C_1-C_{10} saturado, alqueno C_2-C_{10} o alquino C_2-C_{10} puede ser, por ejemplo, y sin limitación, interrumpido por uno o más heteroátomos que son independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno.

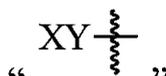
5 Como se usa en la presente memoria, alquilo C_3-C_{10} cíclico puede incluir, por ejemplo, y sin limitación, cicloalquilo C_3-C_{10} saturado, cicloalqueno C_3-C_{10} , cicloalquino C_3-C_{10} , arilo C_6-10 , arilo C_{6-9} -alquilo C_{1-4} , arilo C_{6-8} -alqueno C_{2-4} , arilo C_{6-8} -alquino C_{2-4} , un grupo heterocíclico no aromático de 4 a 10 miembros que contiene uno o más heteroátomos que son independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno, y un grupo heterocíclico aromático de 5 a 10 miembros que contiene uno o más heteroátomos que son independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno. Los ejemplos no limitantes del grupo cicloalquilo C_3-C_{10} saturado pueden incluir ciclopropanilo, ciclobutanilo, ciclopentanilo, ciclohexanilo, cicloheptanilo, ciclooctanilo, ciclónonanilo y ciclodecanilo. Los ejemplos no limitantes del grupo cicloalqueno C_3-C_{10} pueden incluir ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno, cicloocteno, ciclónoneno y ciclodeceno. Los ejemplos no limitantes del grupo arilo C_6-C_{10} pueden incluir fenilo (Ph), pentalenilo, indenilo, naftilo y azuleno. El grupo arilo C_{6-9} -alquilo C_{1-4} puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un grupo alquilo C_{1-4} como se define en cualquier parte de arriba que tiene un grupo arilo C_{6-9} como se define en cualquier parte de arriba como un sustituyente. El grupo arilo C_{6-8} -alqueno C_{2-4} puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un alqueno C_{2-4} como se define en cualquier parte de arriba que tiene un grupo arilo C_{6-8} como se define en cualquier parte de arriba como un sustituyente. El grupo arilo C_{6-8} -alquino C_{2-4} puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un grupo alquino C_{2-4} como se define en cualquier parte de arriba que tiene un grupo arilo C_{6-8} como se define en cualquier parte de arriba como un sustituyente. Los ejemplos no limitantes del grupo heterocíclico no aromático de 4 a 10 miembros que contiene uno o más heteroátomos que son independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno pueden incluir pirrolidinilo, pirrolinilo, piperidinilo, piperazinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, tetrahidropiranilo, azetidino, oxetanilo, oxatolanilo, ftalimida y succinimida. Los ejemplos no limitantes del grupo heterocíclico aromático de 5 a 10 miembros que contiene uno o más heteroátomos que son independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno pueden incluir pirrolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, imidazolilo, tiazolilo y oxazolilo.

30 Cada uno de alquilo C_1-C_{10} y alquilo C_3-C_{10} cíclico puede estar no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: oxo (=O), OJ", COOH, R, OH, O, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR, NR₂, CN, SH, SR, SO₃H, SO₃R, SO₂R, OSO₃R y NO₂, en el que R es un alquilo C_1-C_{10} no sustituido. Además, uno o más sustituyentes pueden seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: oxo (=O), OJ", COOH, OH, F, Cl, Br, I, NH₂, SH, SO₃H y NO₂. Además, uno o más sustituyentes pueden seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: oxo (=O), OJ", COOH, OH, F, Cl, Br e I. Además, uno o más sustituyentes pueden seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: oxo (=O), OH, F, Cl, Br e I. Además, uno o más sustituyentes pueden seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: oxo (=O) y OH. Además, R puede ser un alquilo C_1-C_5 no sustituido. Cada uno de alquilo C_1-C_{10} y alquilo C_3-C_{10} cíclico puede estar sustituido con, por ejemplo, y sin limitación, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sustituyentes.

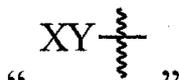
40 Como se usa en la presente memoria, el símbolo



45 (en lo sucesivo puede referirse como "un punto de enlace de fijación") significa un enlace que es un punto de fijación entre dos entidades químicas, una de las cuales se representa por estar unida al punto de enlace de fijación y la otra de las cuales no se representa por estar unida al punto de enlace de fijación. Por ejemplo,



50 indica que la entidad química "XY" se une a otra entidad química por medio del punto de enlace de fijación. Además, el punto específico de fijación a la entidad química no representada puede especificarse por inferencia. Por ejemplo, el compuesto $\text{CH}_3\text{-R}^3$, en el que R^3 es H o

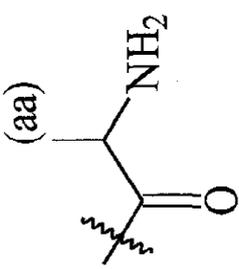
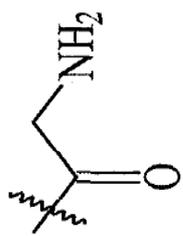
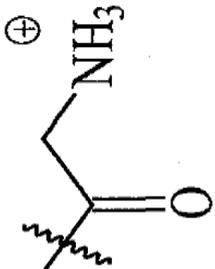
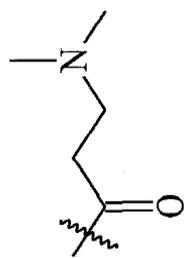
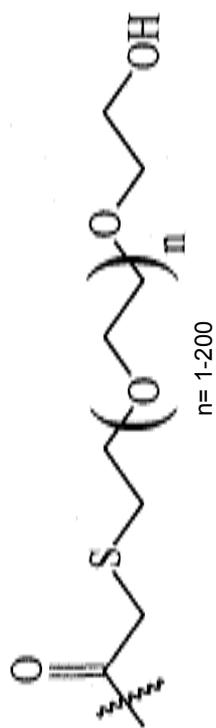
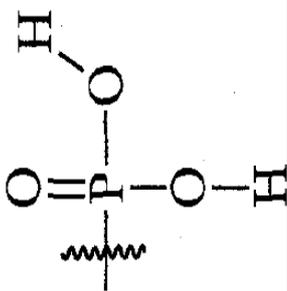
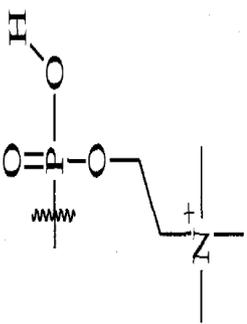


55

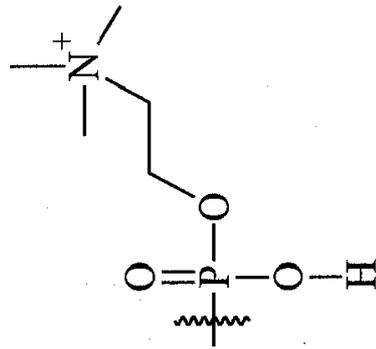
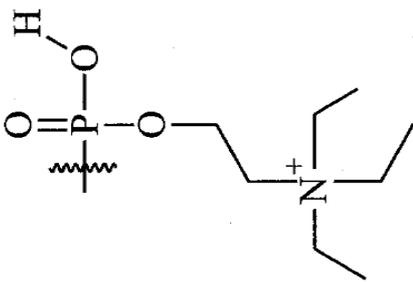
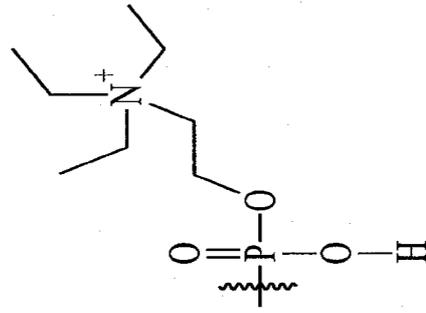
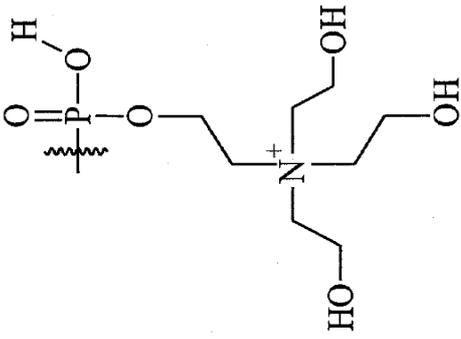
infiere que cuando R^3 es "XY", el punto de enlace de fijación es el mismo enlace que el enlace mediante el cual R^3 se representa como que está unido a CH_3 .

5 Como se usa en la presente memoria, el término "resto" se refiere a un resto que se presenta en la siguiente Tabla 1.

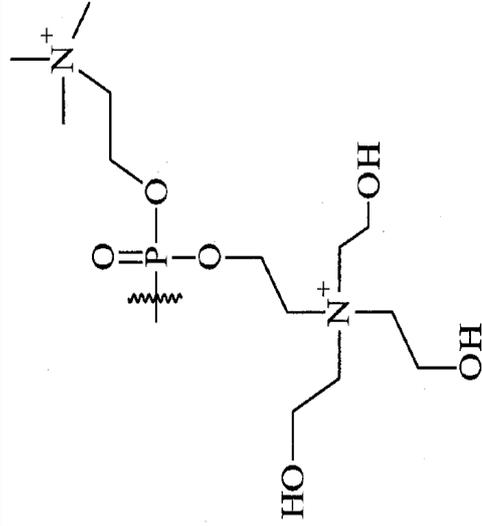
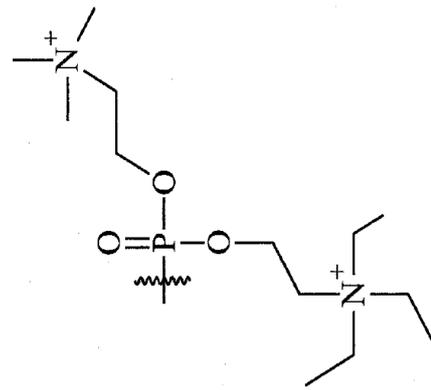
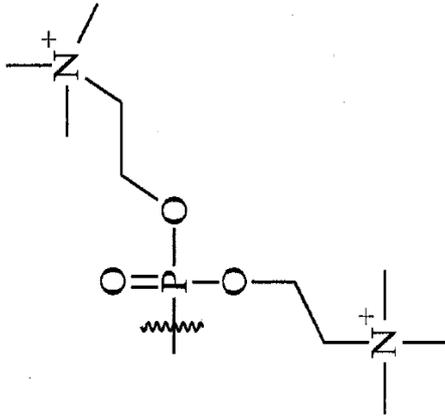
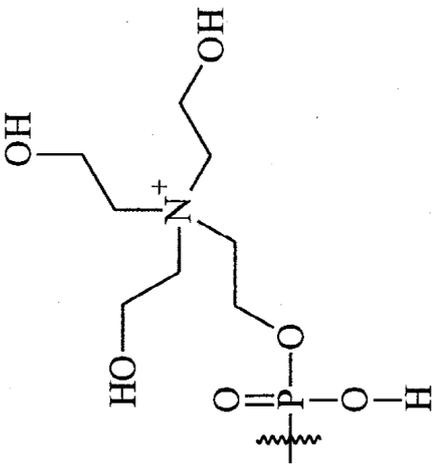
TABLA 1

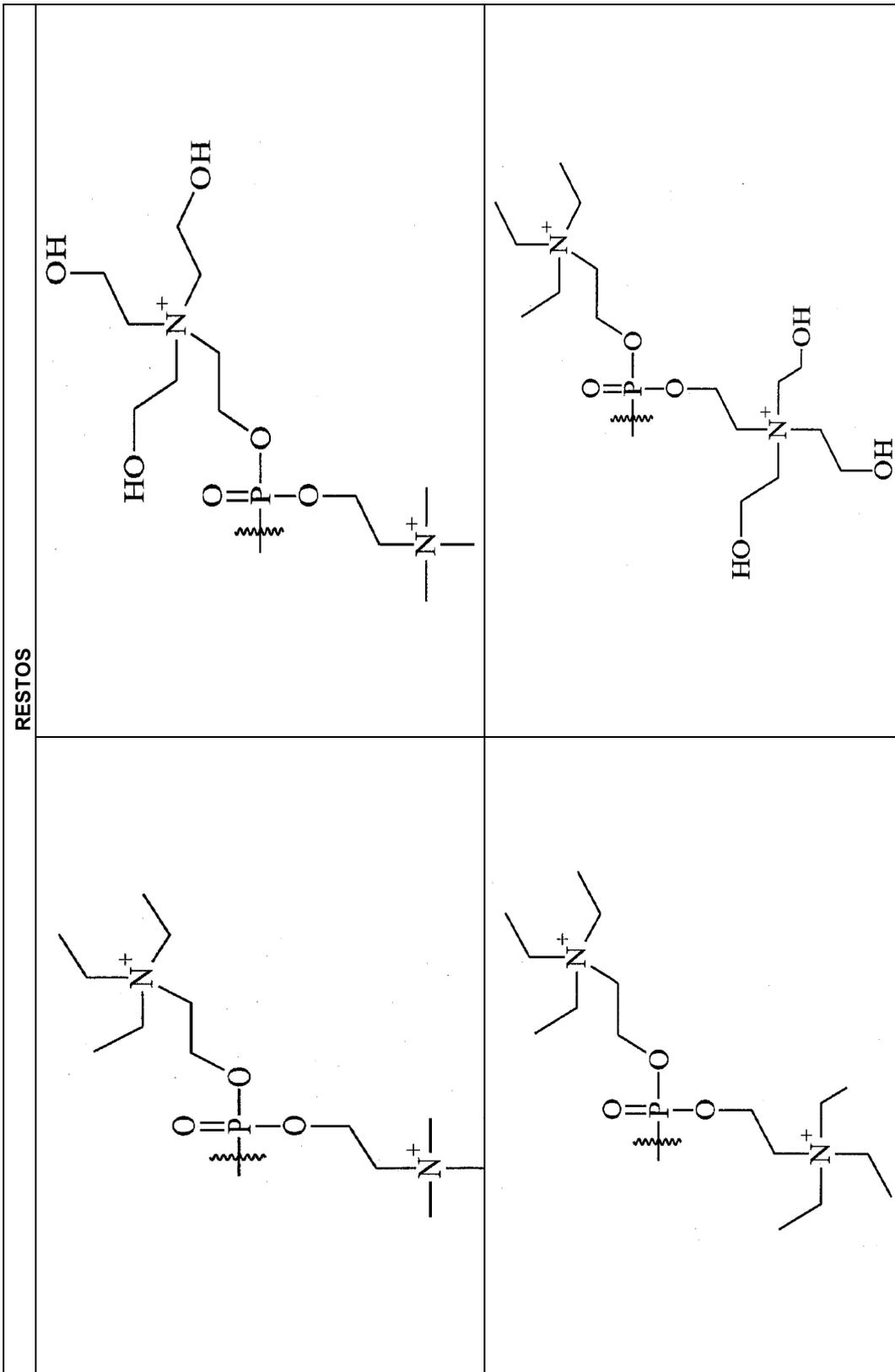
RESTOS	
Restos basados en aminoácidos	
<p>(aa)</p>  <p>(aa) = cualquier cadena lateral de aminoácidos de origen natural</p>	
	
Restos basados en polietilenglicol	
 <p>n= 1-200</p>	 <p>n= 1-200</p>
Restos basados en fosfato	
	

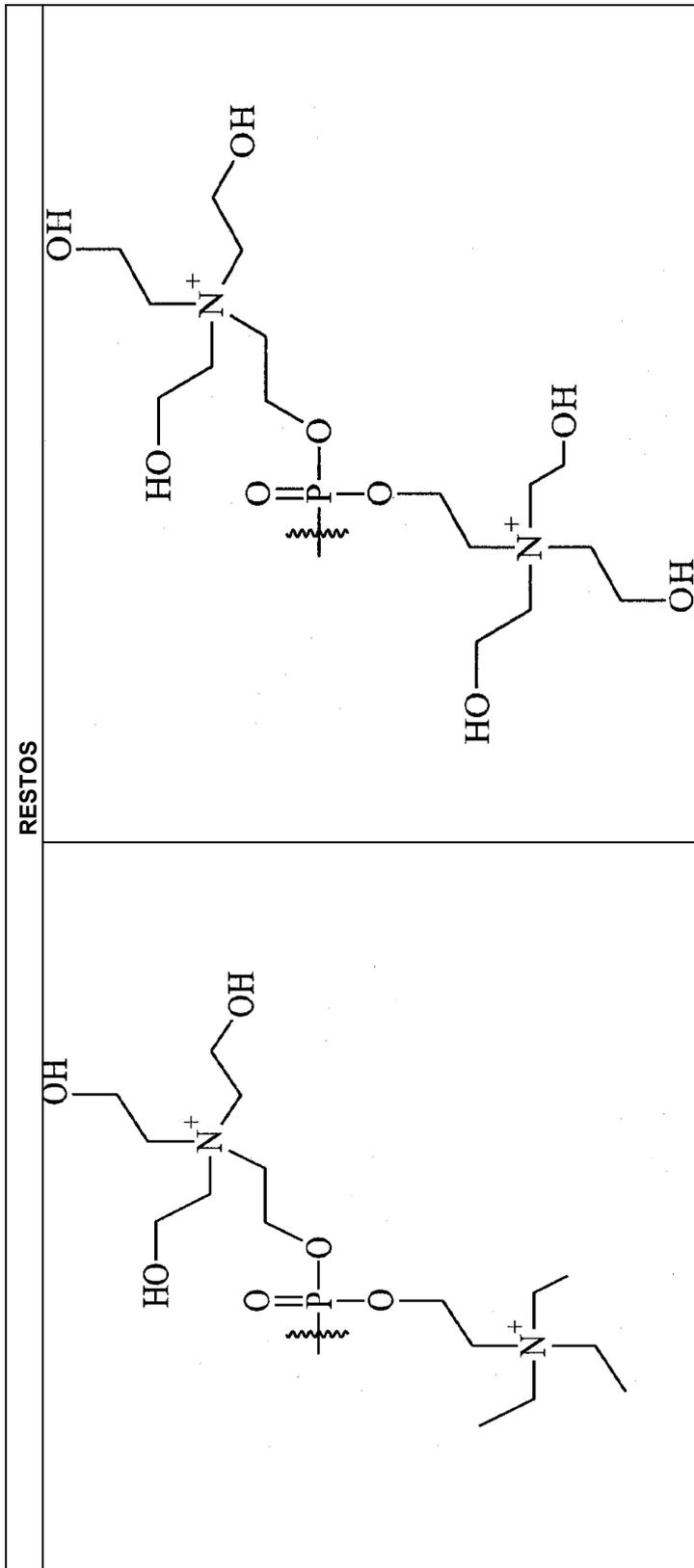
RESTOS



RESTOS







Los restos pueden ser, por ejemplo, y sin limitación, subdivididos en tres grupos: 1) restos basados en aminoácidos; 2) restos basados en polietilenglicol; y 3) restos basados en fosfato. En Restos de la Tabla 1 anterior, los cuatro primeros restos son restos basados en aminoácidos, el quinto y sexto son restos basados en polietilenglicol y los restos restantes son restos basados en fosfato.

5

Las cadenas laterales de aminoácidos de origen natural (como a menudo se indican en la presente

memoria usando "(aa)") son bien conocidas por un experto en la materia y se pueden encontrar en varios libros de texto, tales como "*Molecular Cell Biology*" de James Darnell *et al.* Tercera Edición, publicado por Scientific American Books en 1995. A menudo, los aminoácidos de origen natural se representan por la fórmula $(\text{NH}_2)\text{C}(\text{COOH})(\text{H})(\text{R})$, en la que los grupos químicos entre paréntesis están cada uno unidos al carbono que no está entre paréntesis. R representa las cadenas laterales de esta fórmula particular.

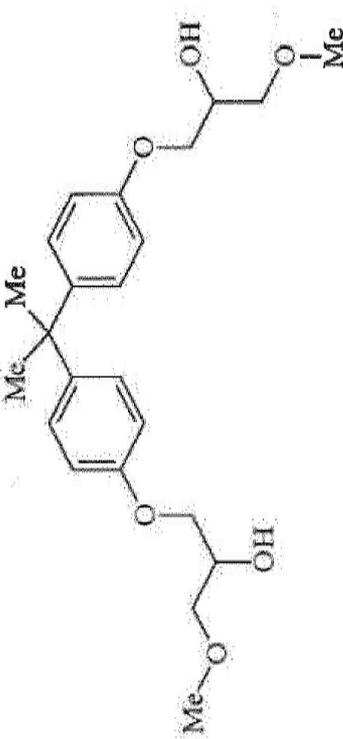
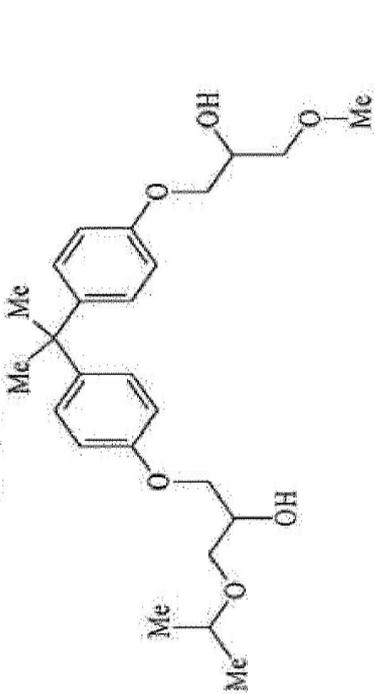
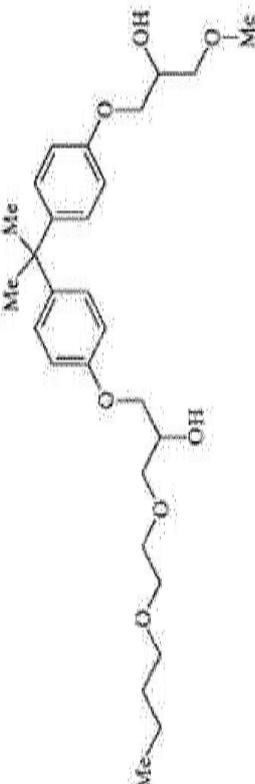
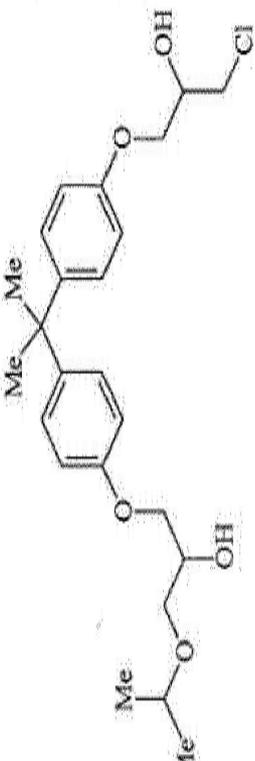
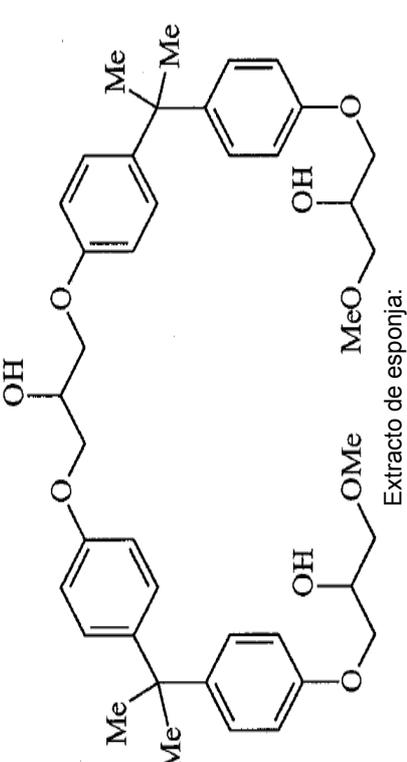
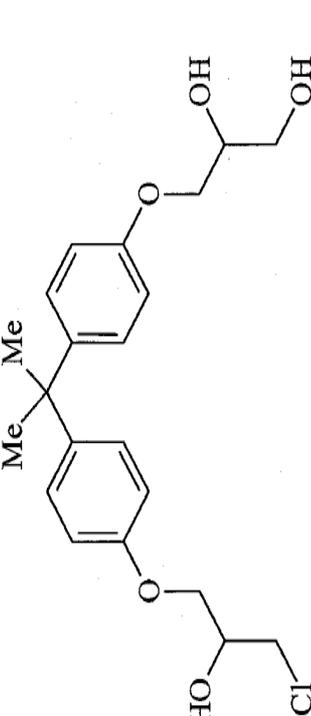
Los expertos en la materia apreciarán que el punto de fijación covalente del resto a los compuestos como se describe en la presente memoria pueda, por ejemplo, y sin limitación, escindirse en condiciones especificadas. Las condiciones especificadas pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, medios enzimáticos o no enzimáticos *in vivo*.

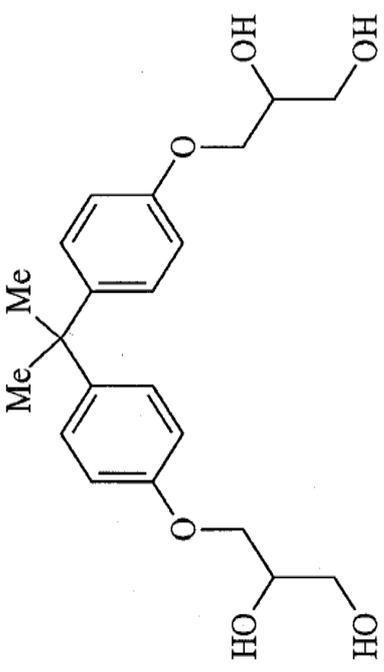
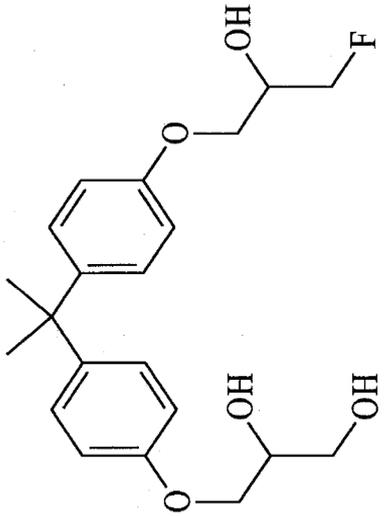
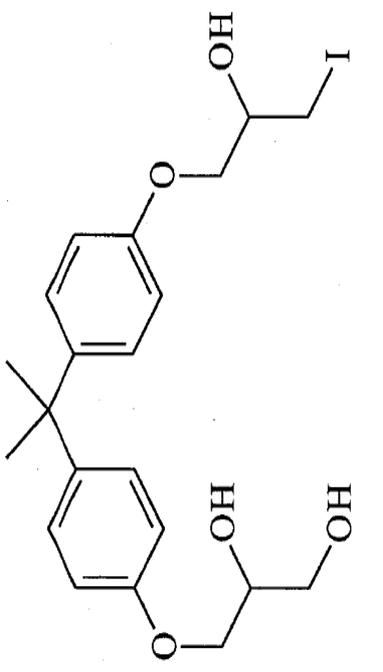
10 Puede producirse una escisión del resto, por ejemplo, y sin limitación, de manera espontánea, o puede ser catalizada, inducida por otro agente, o un cambio en un parámetro físico o parámetro ambiental, por ejemplo, una enzima, luz, ácido, temperatura o pH. El resto puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un grupo protector que actúa para enmascarar un grupo funcional, un grupo que actúa como un sustrato para uno o más mecanismos de transporte activo o pasivo, o un grupo que actúa para impartir o potenciar una propiedad del compuesto, por

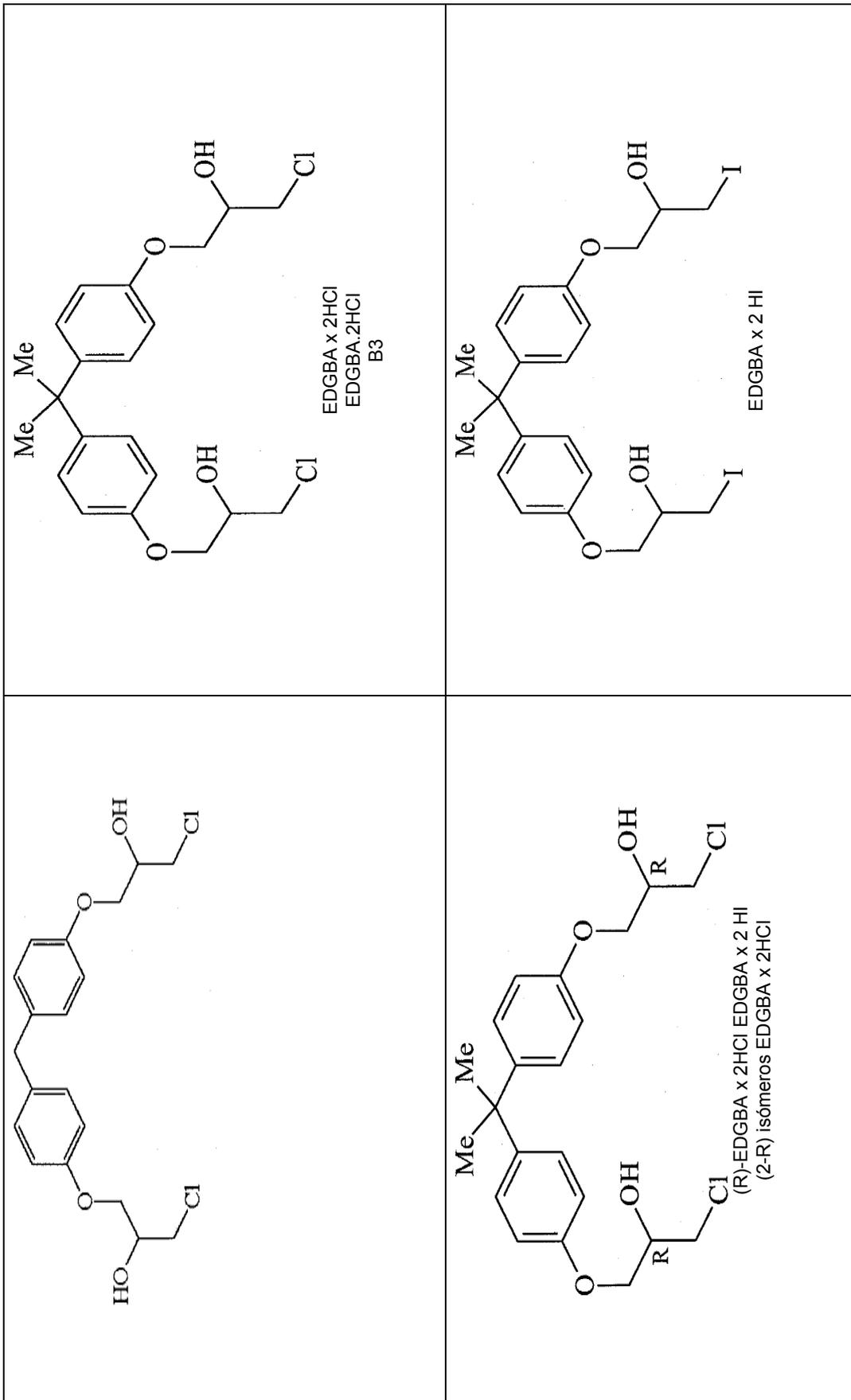
15 ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad o localización.

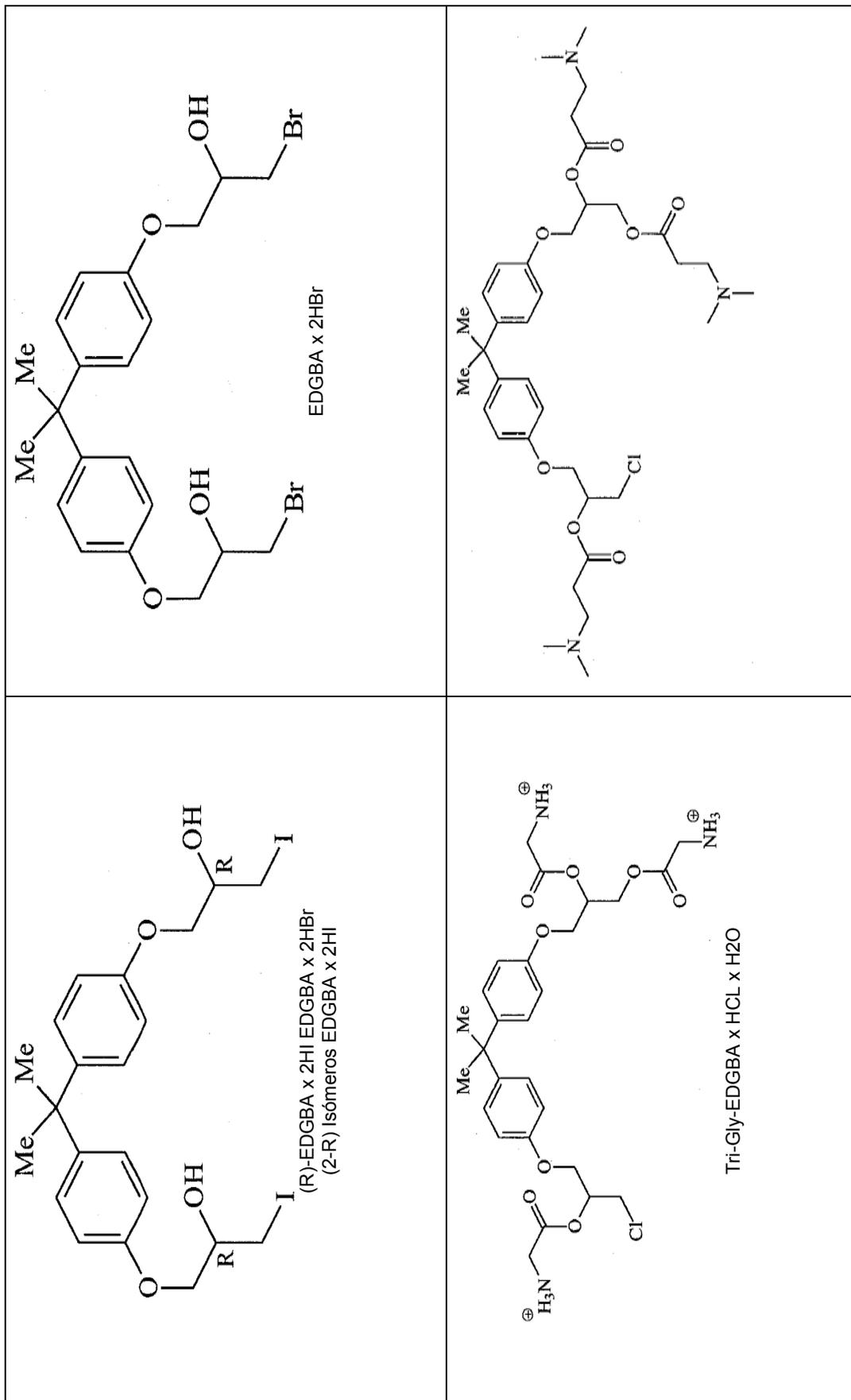
Los siguientes compuestos de la Tabla 2 se desvelan adicionalmente:

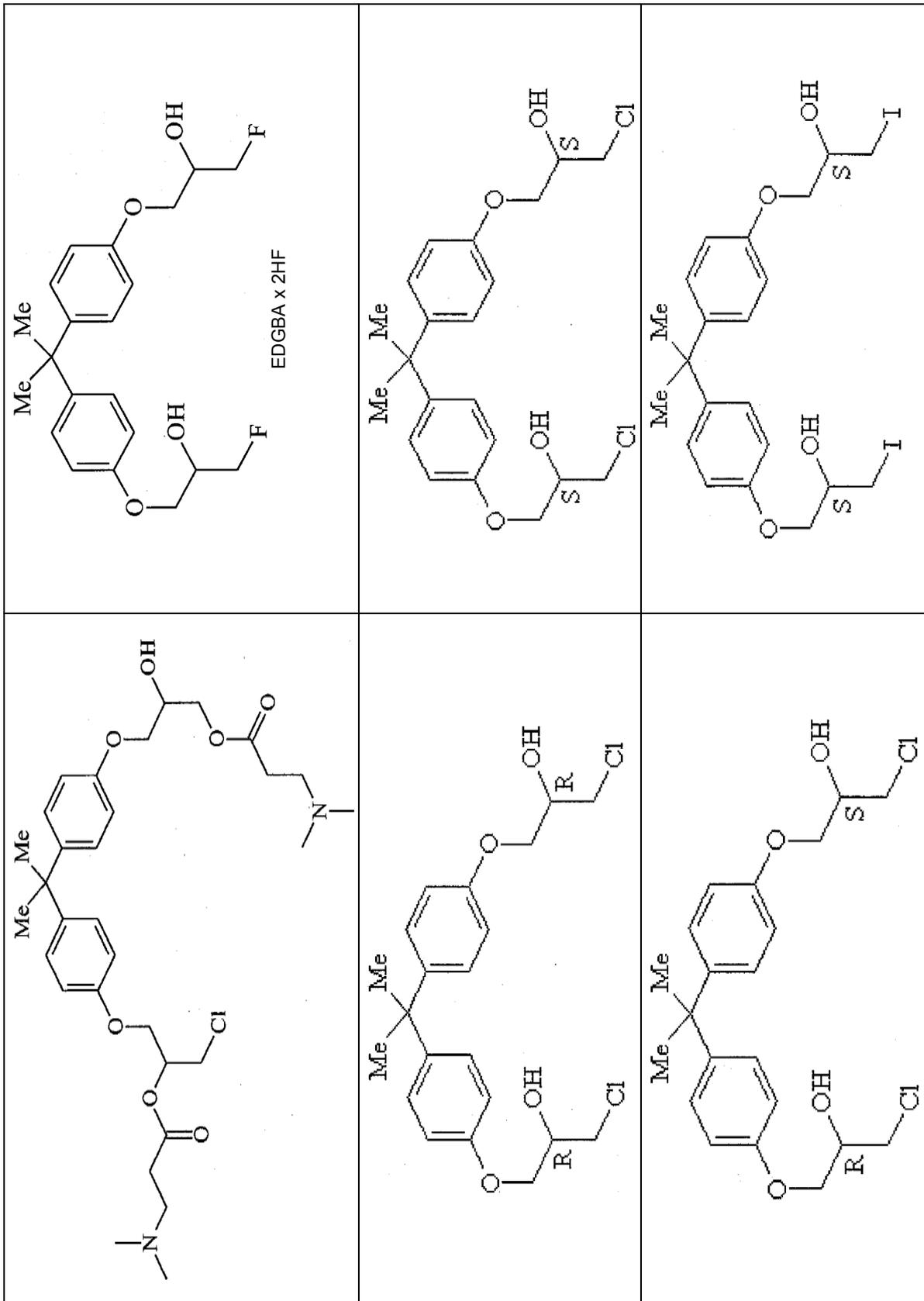
TABLA 2

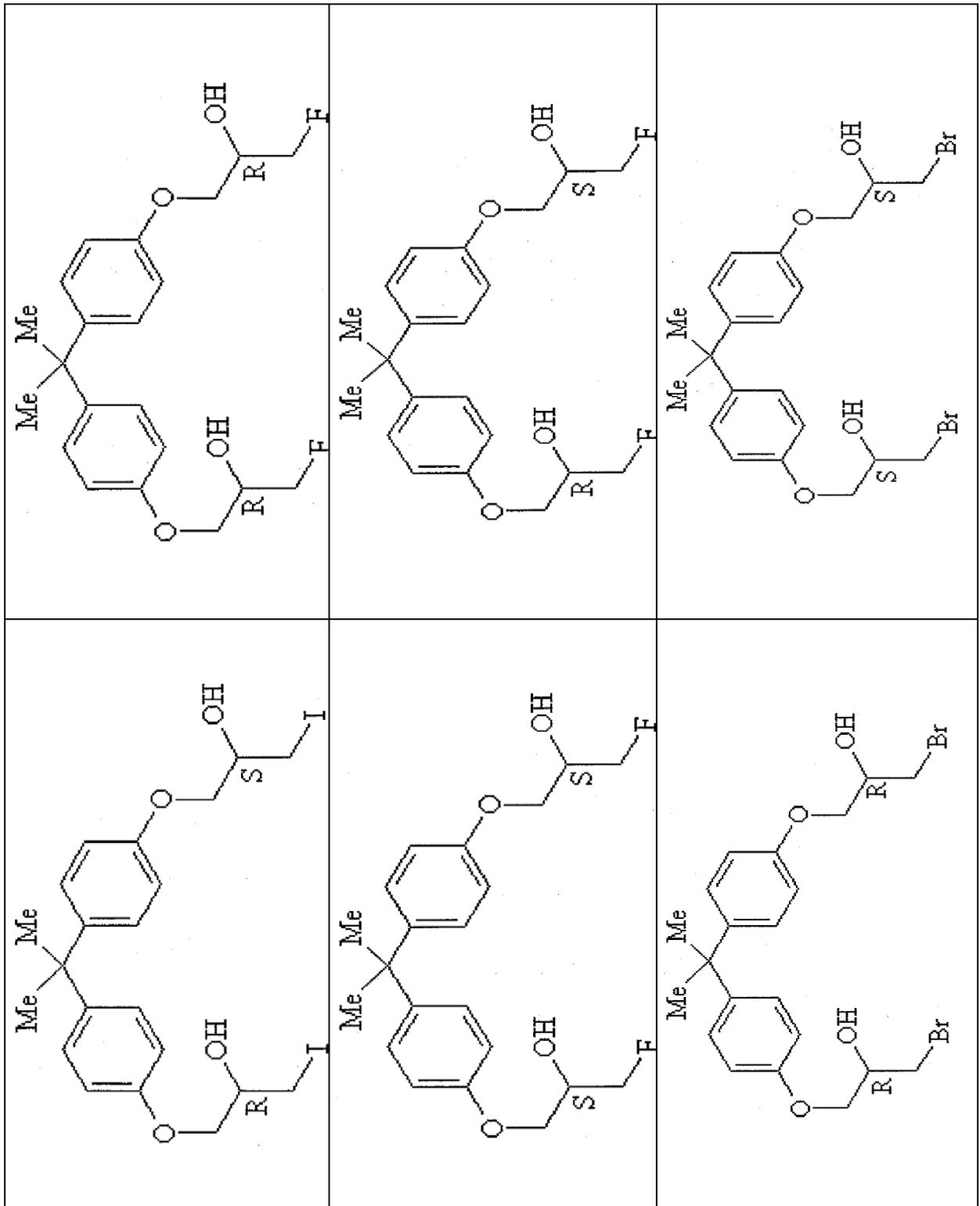
 <p>Extracto de esponja PNG01-185-017-2</p>	 <p>Extracto de esponja PNG01-185-017-5</p>
 <p>Extracto de esponja PNG01-185-017-6</p>	 <p>Extracto de esponja: PNC01-185-017-7</p>
 <p>Extracto de esponja:</p>	 <p>Extracto de esponja:</p>

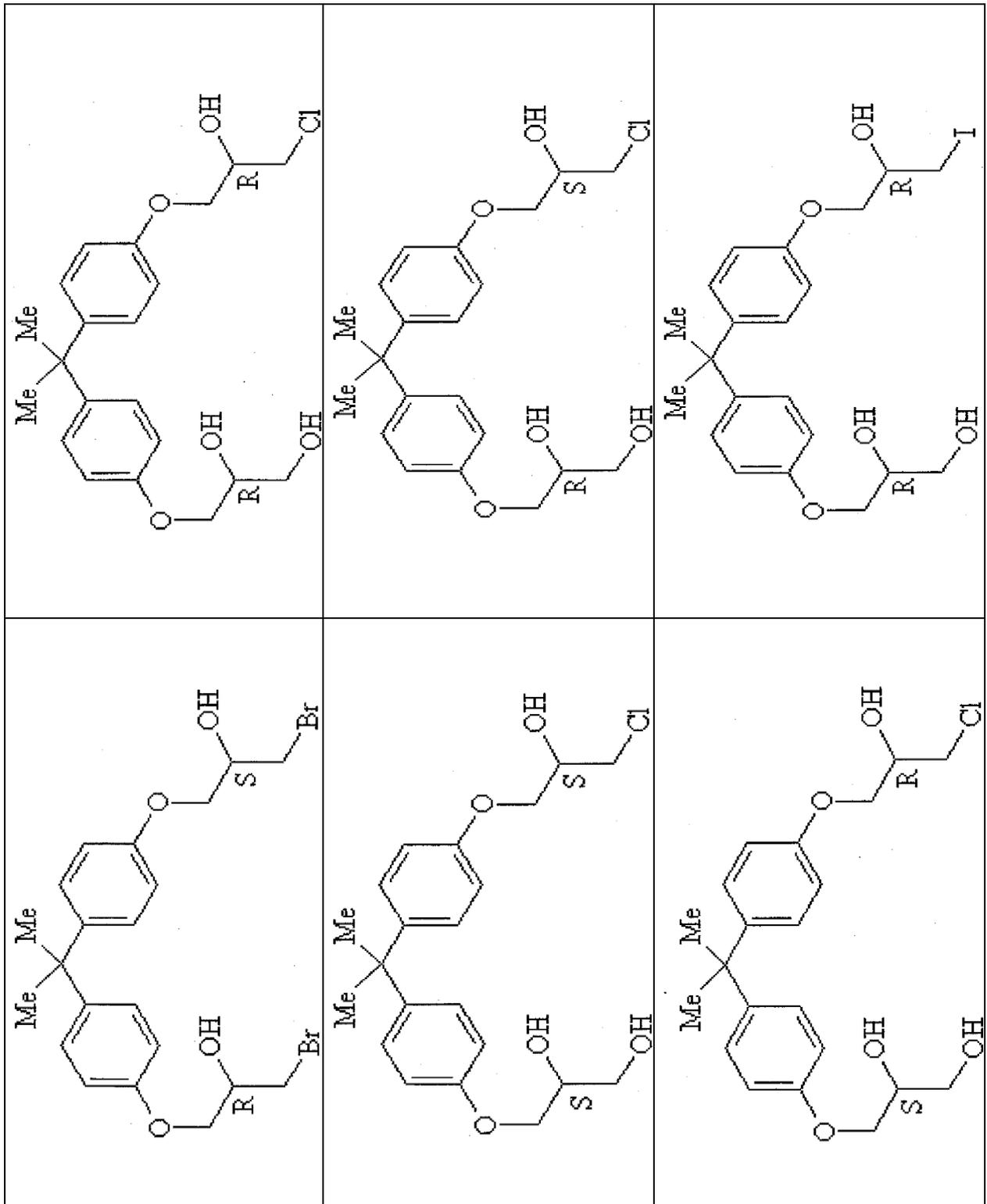
<p>PNG01-185-017-8</p>	<p>PNG01-185-017-9-1 PNG01-185-17-9-1 185-9-1</p> 
<p>PNG01-185-017-9-2 PNG01-185-17-9-2 185-9-2 B2</p>	
<p>PNG01-185-017-9-1 PNG01-185-17-9-1 185-9-1</p>	 <p>(R)-EDGBA x HI x H2O (2-R) Isómeros EDGBA x HI x H2O</p>

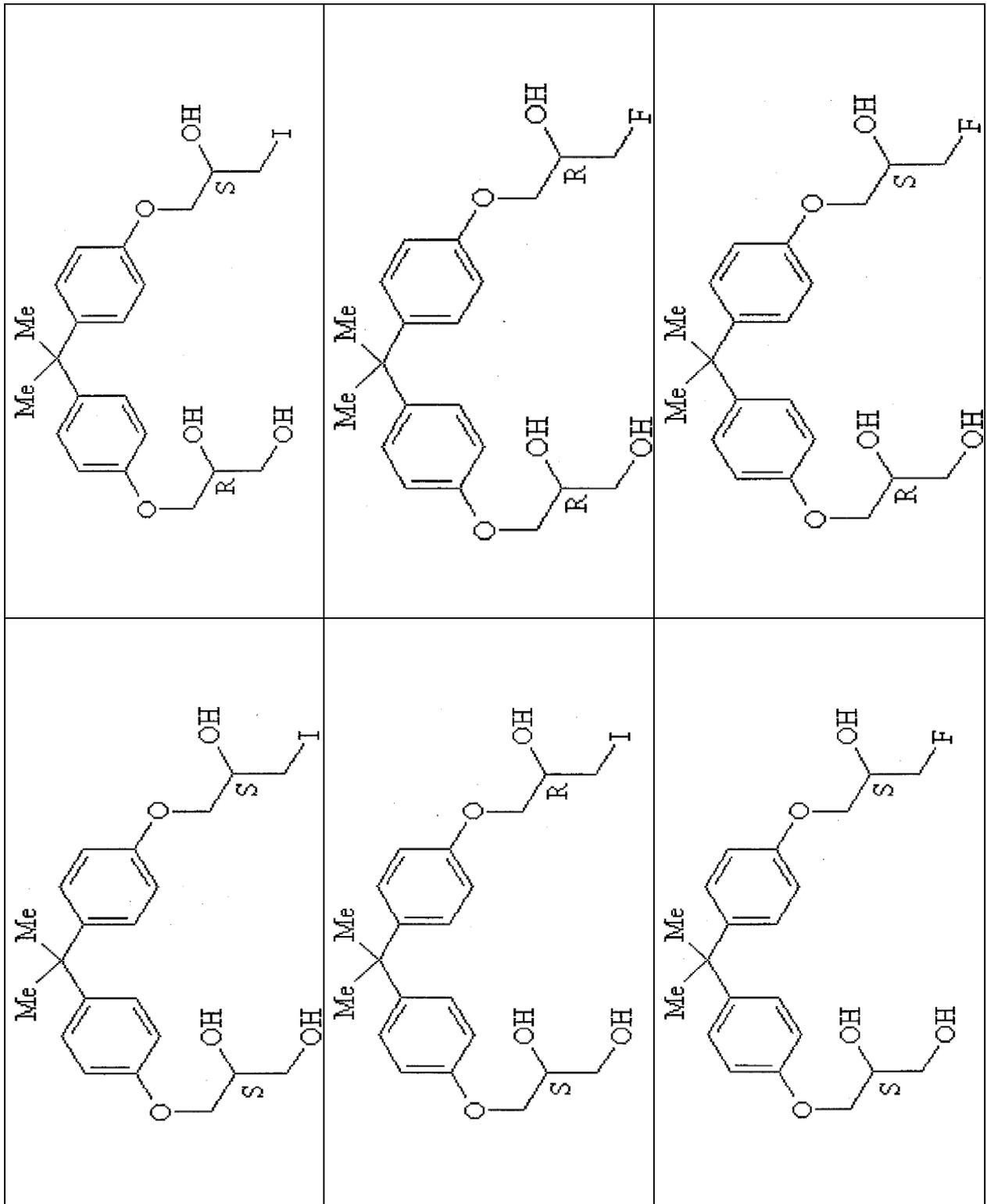


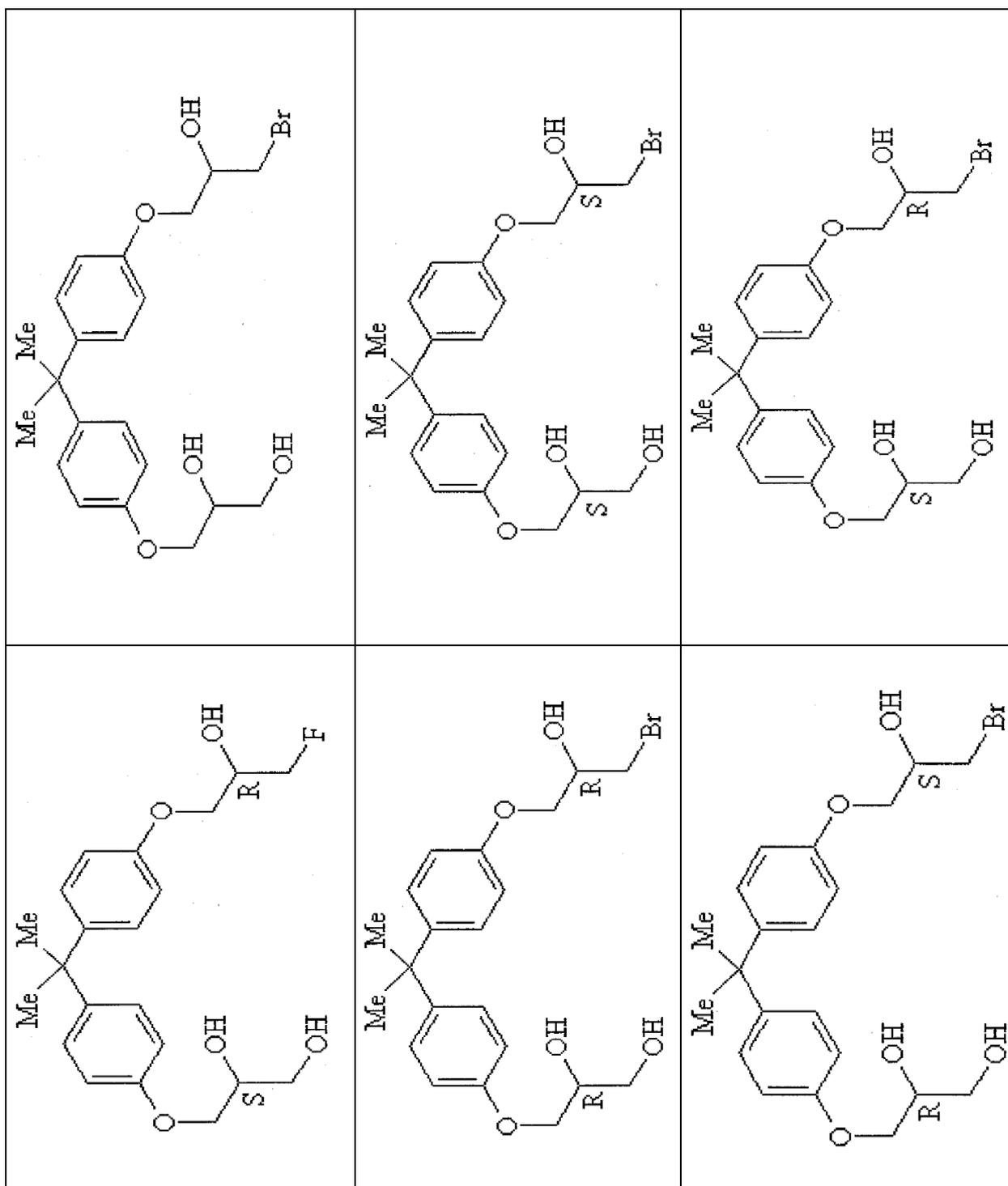










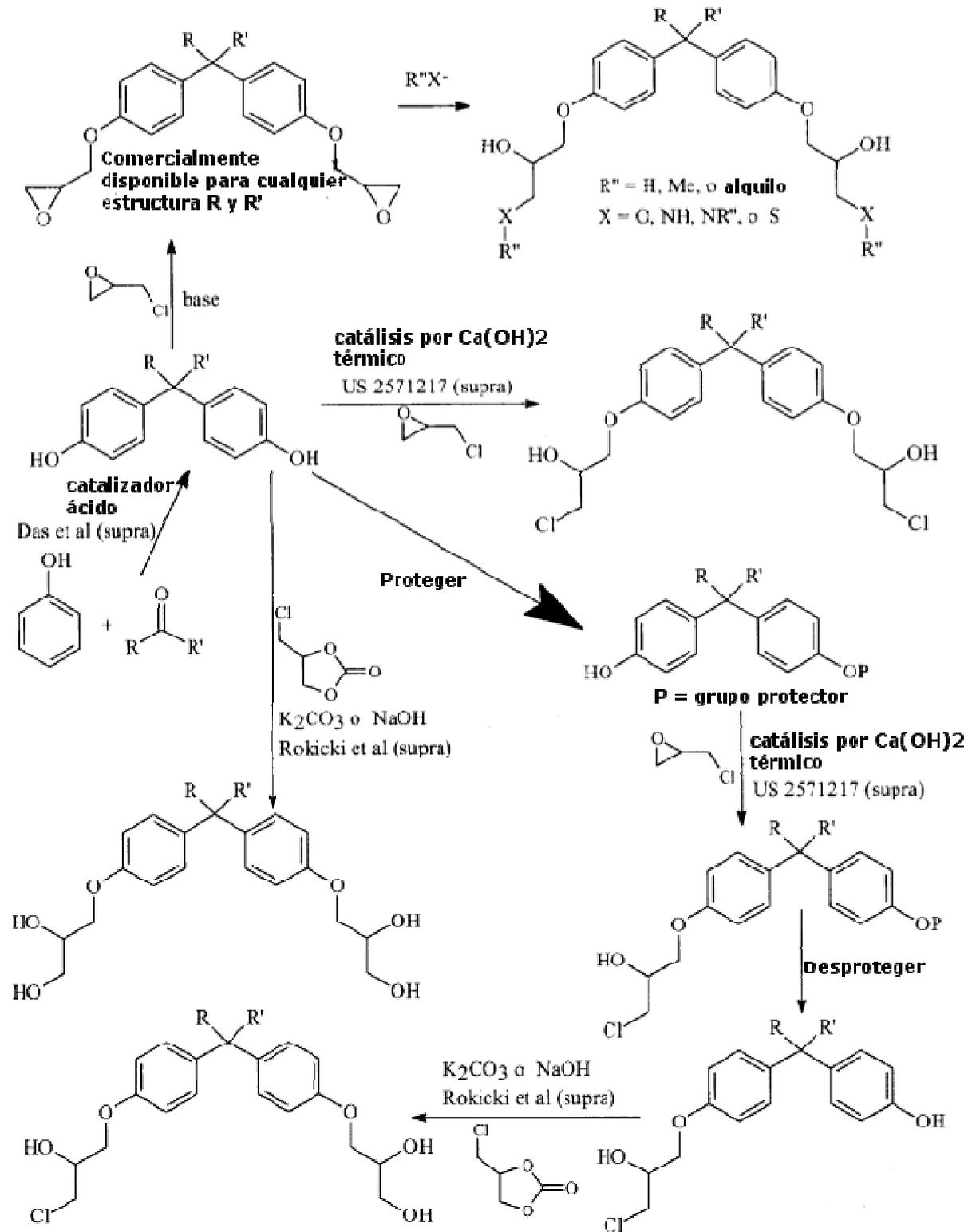


Los métodos de preparación o sintetización de compuestos de la presente invención también pueden ser entendidos por un experto en la materia teniendo como referencia los principios de síntesis química conocidos. Por ejemplo, Auzou *et al* 1974 *European Journal of Medicinal Chemistry* 9(5), 548-554 describen los procedimientos sintéticos adecuados que pueden ser considerados y adaptados adecuadamente para preparar compuestos de Fórmula I o Fórmula II. Otras referencias que pueden ser útiles en la preparación de compuestos de Fórmula I o Fórmula II incluyen: Debasish Das, Jyh-Fu Lee y Soofin Cheng "Sulfonic acid functionalized mesoporous MCM-41 silica as a convenient catalyst for Bisphenol-A synthesis" *Chemical Communications*, (2001) 2178-2179; patente de Estados Unidos n.º 2571217 Davis, Orris L.; Knight, Horace S.; Skinner, John R. (Shell Development Co.) "Halohydrin ethers of phenols". (1951); y Rokicki, G.; Pawlicki, J.; Kuran, W. "Reactions of 4-chloromethyl-1,3-dioxolan-2-one with phenols as a new route to polyols and cyclic carbonates." *Journal fuer Praktische Chemie* (Leipzig) (1985) 327, 718-722.

5

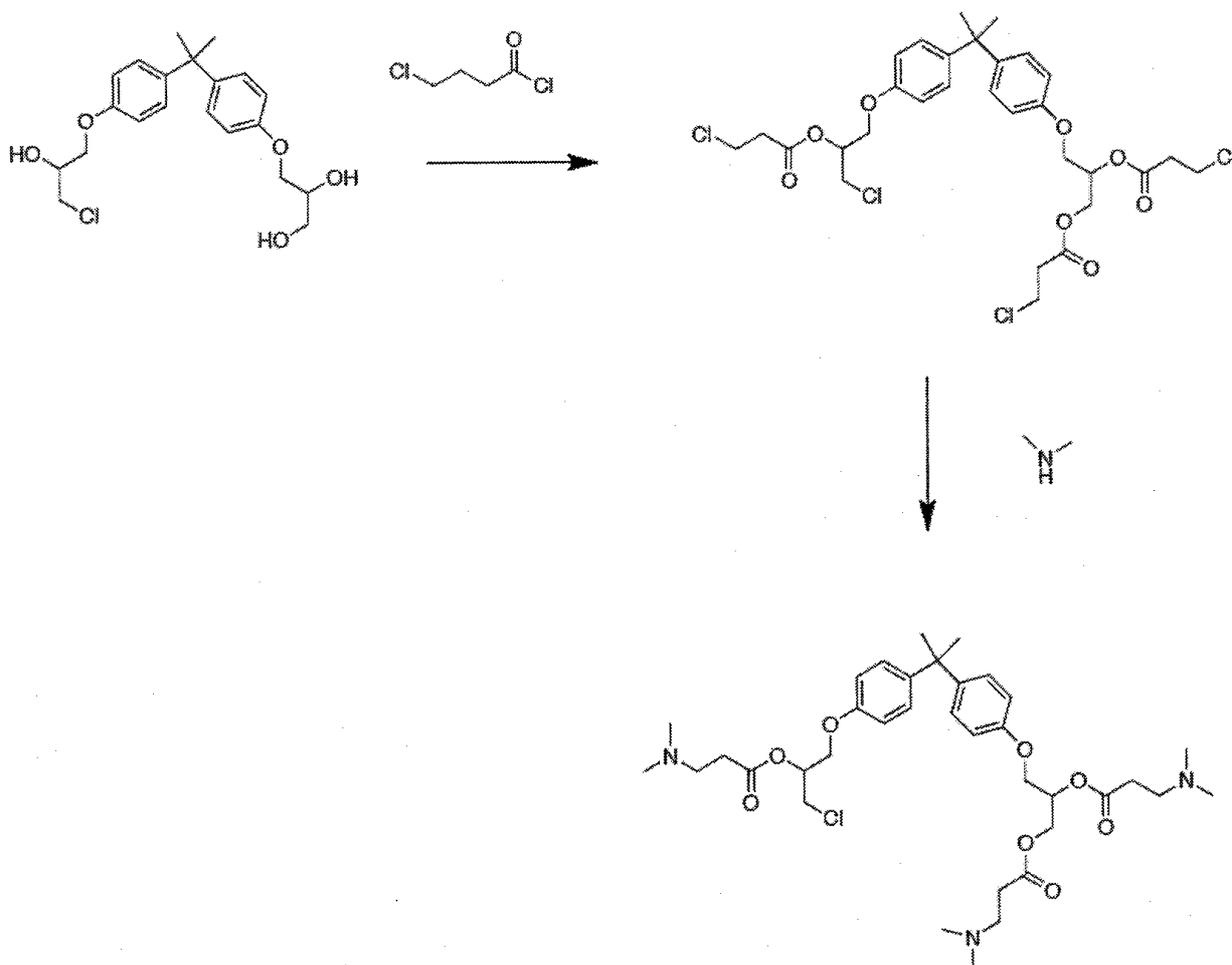
10

La preparación química de los compuestos de Fórmula I y Fórmula II se describe a continuación en los Ejemplos y por el siguiente esquema sintético a modo de ejemplo no limitante.



5 En el esquema anterior, R y R' puede ser, por ejemplo, y sin limitación, independientemente seleccionado entre el grupo que consiste en H, Me o alquilo.

10 Los compuestos que caen dentro del alcance de las reivindicaciones se pueden preparar mediante la siguiente reacción a modo de ejemplo.



Un experto en la materia será capaz de modificar los enfoques sintéticos descritos en la presente memoria, en combinación o no en combinación con las técnicas de aislamiento descritas en la presente memoria para preparar los compuestos de Fórmula I y Fórmula II.

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula I o Fórmula II anteriores se pueden usar para el tratamiento sistémico de al menos una indicación seleccionada entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de endometrio, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz y degeneración macular relacionada con la edad. En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula I o Fórmula II se pueden usar en la preparación de un medicamento o una composición para el tratamiento sistémico de una indicación descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, también se proporcionan métodos de tratamiento sistemático de cualquiera de las indicaciones descritas en la presente memoria.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar en forma libre o en forma de una sal de los mismos. En alguna realización, los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, que es conocida en la materia (Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1). La sal farmacéuticamente aceptable como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, sales que tienen la actividad farmacológica deseada del compuesto original (sales que retienen la eficacia y/o propiedades biológicas del compuesto original y que no son biológicamente y/o indeseables). Los compuestos descritos en la presente memoria que tienen uno o más grupos funcionales capaces de formar una sal pueden ser, por ejemplo, formados como una sal farmacéuticamente aceptable. Los compuestos que contienen uno o más grupos funcionales básicos pueden ser capaces de formar una sal farmacéuticamente aceptable con, por ejemplo, un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden derivar de, por ejemplo, y sin limitación, ácido acético, ácido adípico, ácido algínico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido butírico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido dietilacético, ácido diglucónico, ácido dodecilsulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucoheptanoico, ácido glucónico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hemisulfónico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido isonicotínico, ácido láctico, ácido málico, ácido maleico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido p-

toluensulfónico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pectínico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido fosfórico, ácido pícrico, ácido pimélico, ácido piválico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido tartárico, ácido tiocianico o ácido undecanoico. Los compuestos que contienen uno o más grupos funcionales ácidos pueden ser capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con una base farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, y sin limitación, bases inorgánicas basadas en metales alcalinos o metales alcalinotérreos o bases orgánicas, tales como compuestos de amina primaria, compuestos de amina secundaria, compuestos de amina terciaria, compuestos de amina cuaternaria, aminas sustituidas, aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas o resinas básicas de intercambio iónico. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden derivar de, por ejemplo, y sin limitación, un hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, tal como amonio, sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso o aluminio, amoniaco, benzatina, meglumina, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, isopropilamina, tripropilamina, tributilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, glucamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, procaína, N-etilpiperidina, teobromina, compuestos de tetrametilamonio, compuestos de tetraetilamonio, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, morfolina, N-metilmorfolina, N-etilmorfolina, dicitclohexilamina, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletildiamina o resinas de poliamina. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria pueden contener grupos tanto ácidos como básicos y pueden estar en forma de sales internas o iones bipolares, por ejemplo, y sin limitación, betaínas. Las sales descritas en la presente memoria pueden prepararse por procesos convencionales conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, y sin limitación, por reacción de la forma libre con un ácido orgánico o un ácido inorgánico o base, o mediante intercambio aniónico o intercambio catiónico de otras sales. Los expertos en la técnica apreciarán que la preparación de las sales puede producirse *in situ* durante el aislamiento y purificación de los compuestos o la preparación de sales puede ocurrir haciendo reaccionar por separado un compuesto aislado y purificado.

En algunas realizaciones, los compuestos y todas las formas diferentes de los mismos (p. ej., formas libres, sales, polimorfos, formas isoméricas) descritos en la presente memoria pueden estar en la forma de adición de disolvente, por ejemplo, solvatos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente, en asociación física del compuesto o sal del mismo. El disolvente puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un disolvente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se forman hidratos cuando el disolvente es agua o se forman alcoholatos cuando el disolvente es un alcohol.

En algunas realizaciones, los compuestos y todas las formas diferentes de los mismos (p. ej., formas libres, sales, solvatos, formas isoméricas) descritos en la presente memoria pueden incluir formas cristalinas y amorfas, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, polimorfos conformacionales, formas amorfas, o una combinación de los mismos. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos tienen normalmente diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma cristalina, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y/o solubilidad. Los expertos en la materia apreciarán que varios factores, incluyendo disolvente de recristalización, velocidad de cristalización y temperatura de almacenamiento pueden causar una forma de cristal única a dominar.

En algunas realizaciones, los compuestos y todas las formas diferentes de los mismos (p. ej., formas libres, sales, solvatos, polimorfos) descritos en la presente memoria incluyen los isómeros, tales como isómeros geométricos, isómeros ópticos basados en carbono asimétrico, estereoisómeros, tautómeros, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales, racematos, mezclas diastereoméricas y combinaciones de los mismos, y no están limitados por la descripción de la fórmula ilustrada en aras de la conveniencia.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden comprender una sal de tal compuesto, preferentemente una sal farmacéutica o fisiológicamente aceptable. Las preparaciones farmacéuticas comprenderán normalmente uno o más portadores, excipientes o diluyentes aceptables para el modo de administración de la preparación, ya sea por inyección, inhalación, administración tópica, lavado u otros modos adecuados para el tratamiento seleccionado. Los portadores, excipientes o diluyentes adecuados son los conocidos en la materia para su uso en tales modos de administración.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas se pueden formular por medios conocidos en la materia y su modo de administración y dosis se determina por el profesional capacitado. Para la administración parenteral, un compuesto se puede disolver en agua estéril o solución salina o un vehículo farmacéuticamente aceptable usado para la administración de compuestos no solubles en agua, tales como los usados para la vitamina K. Para la administración enteral, el compuesto puede administrarse en un comprimido, cápsula o disolverse en forma líquida. El comprimido o cápsula puede ser un recubrimiento entérico, o en una formulación para la liberación sostenida. Muchas formulaciones adecuadas son conocidas, incluyendo, micropartículas poliméricas o de proteínas que encapsulan un compuesto para ser liberado, pomadas, pastas, geles, hidrogeles o soluciones que se pueden usar por vía tópica o localmente para administrar un compuesto. Un parche de liberación sostenida o implante se puede emplear para proporcionar una liberación durante un período prolongado de tiempo. Muchas técnicas conocidas por un experto en

la materia se describen en Remington: *the Science & Practice of Pharmacy* por Alfonso Gennaro, 20^a ed, Lippencott Williams & Wilkins, (2000). Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. El polímero lactida biocompatible biodegradable, copolímero lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden usarse para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para compuestos moduladores incluyen partículas de copolímero de etilenvinilacetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicolato o pueden ser soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales o como un gel.

Los compuestos o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención o para su uso en la presente invención se pueden administrar por medio de un dispositivo médico o un aparato, tal como un implante, injerto, prótesis, prótesis endovascular (stent), etc. Asimismo, los implantes se pueden diseñar para tener por objeto contener y liberar tales compuestos o composiciones. Un ejemplo podría ser un implante fabricado de un material polimérico adaptado para liberar el compuesto durante un periodo de tiempo.

Una "cantidad eficaz" de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado, tal como la reducción del tamaño del tumor, aumento de la esperanza de vida o aumento de la expectativa de vida. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado patológico, edad, sexo, y peso del sujeto, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como tumores más pequeños, aumento de la esperanza de vida, aumento de la expectativa de vida o prevención de la progresión del cáncer de próstata a una forma independiente de andrógenos. Normalmente, una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en un estadio anterior de la enfermedad, de modo que una cantidad profilácticamente eficaz pueda ser menor que una cantidad terapéuticamente eficaz.

Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son solamente a modo de ejemplo y no limitan los intervalos de dosificación que pueden seleccionarse por los profesionales sanitarios. La cantidad de compuesto activo o compuestos activos en la composición puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se puede administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

En algunas realizaciones, los compuestos y todas las formas diferentes de los mismos como se describe en la presente memoria pueden usarse, por ejemplo, y sin limitación, en combinación con otros métodos de tratamiento para al menos una indicación seleccionada entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de endometrio, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz y degeneración macular relacionada con la edad. Por ejemplo, los compuestos y todas sus formas diferentes como se describe en la presente memoria se pueden usar como neoadyuvante (antes), auxiliar (durante) y/o adyuvante (después) de la terapia con cirugía, radiación (braquiterapia o haz externo) u otras terapias (p. ej., HIFU).

En general, los compuestos de la invención deben ser usados sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad de los compuestos de la invención se puede determinar usando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el ensayo en cultivos celulares o animales de experimentación y determinación del índice terapéutico, es decir, la relación entre la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DL100 (la dosis letal para el 100 % de la población). No obstante, en algunas circunstancias, tales como en condiciones de enfermedad graves, puede ser necesario administrar excesos sustanciales de las composiciones. Algunos compuestos de la presente invención pueden ser tóxicos en algunas concentraciones. Los estudios de titulación se pueden usar para determinar las concentraciones tóxicas y no tóxicas. La toxicidad puede evaluarse examinando la especificidad de una composición o compuesto particular a través de las estirpes celulares usando células PC3 como control negativo que no expresa RA. Los estudios en animales se pueden usar para proporcionar una indicación de si el compuesto tiene cualquier efecto en otros tejidos. La terapia sistémica que se dirige a RA es probable que no cause grandes problemas a otros tejidos ya que los anti-andrógenos y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos no son fatales.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto. Como se usa en la presente memoria, un "sujeto" puede ser un ser humano, primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, etc. El sujeto puede ser sospechoso de tener o corre el riesgo de tener un cáncer, tal como cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios o cáncer de endometrio, o se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener acné, hirsutismo, alopecia, hiperplasia prostática benigna, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz o degeneración macular relacionada con la edad. Métodos de diagnóstico para varios tipos de cáncer, como el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios o cáncer de endometrio y métodos de diagnóstico para el acné, hirsutismo, alopecia, hiperplasia prostática benigna, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz o degeneración macular relacionada con la edad y la delimitación clínica de cáncer, como el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario o cáncer de endometrio, los diagnósticos y la delimitación clínica de acné, hirsutismo, alopecia, hiperplasia prostática benigna, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz o degeneración macular relacionada con la edad son conocidos por los expertos en la materia.

Definiciones usadas incluyen la activación dependiente del ligando del receptor de andrógenos (RA) por los andrógenos, tales como dihidrotestosterona (DHT) o andrógeno sintético (R1881) usado para fines de investigación. La activación independiente del ligando del RA se refiere a la transactivación del RA en ausencia de andrógenos (ligando), por ejemplo, por estimulación de la vía dependiente de la proteína quinasa (PKA) de AMPc con forskolina (FSK). Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden inhibir la inducción de tanto FSK como R1881 de ERA-luciferasa (ERA-luc) (véase el Ejemplo 1). Tales compuestos pueden bloquear un mecanismo que es común tanto para la activación dependiente del ligando como independiente del ligando del RA. Esto podría implicar cualquier etapa en la activación de RA incluyendo la disociación de las proteínas de choque térmico, modificaciones post-traduccionales esenciales (p. ej., acetilación, fosforilación), translocación nuclear, interacciones proteína-proteína, formación del complejo transcripcional, liberación de co-represores y/o aumento de la degradación.

Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden inhibir solamente R1881 y pueden interferir con un mecanismo específico para la activación dependiente del ligando (p. ej., accesibilidad del dominio de unión de ligando (DUL) a andrógenos). Numerosos trastornos además del cáncer de próstata implican el eje de andrógenos (p. ej., acné, hirsutismo, alopecia, hiperplasia prostática benigna) y compuestos que interfieren con este mecanismo pueden usarse para tratar tales afecciones.

Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden inhibir solamente la inducción de FSK y pueden ser inhibidores específicos para la activación independiente del ligando de RA. Estos compuestos y composiciones pueden interferir con la cascada de eventos que ocurren normalmente con la actividad de FSK y/o PKA o cualquier efecto aguas abajo que puede desempeñar un papel en el RA (p. ej. FSK aumenta la actividad de MAPK que tiene un potente efecto sobre la actividad de RA). Los ejemplos pueden incluir un inhibidor de AMPc y o PKA u otras quinasas.

Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden inducir niveles basales de la actividad de RA (sin andrógenos o estimulación de la vía de PKA).

Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden aumentar la inducción por R1881 o FSK. Tales compuestos y composiciones pueden estimular la transcripción o la transactivación de RA.

Algunos compuestos y composiciones de la presente invención pueden inhibir la actividad del dominio N-terminal del receptor de andrógenos (DNT de RA). La interleucina-6 (IL-6) también provoca la activación independiente del ligando de RA en las células LNCaP y se puede usar además de FSK.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden interactuar con el DNT de RA o con otra proteína requerida para la transactivación de DNT de RA.

Diversas realizaciones alternativas y ejemplos de la invención se describen en la presente memoria. Estas realizaciones y ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Los ejemplos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones tienen un fin meramente ilustrativo.

METODOLOGÍAS GENERALES

Estirpes celulares, andrógenos e indicadores

Se emplearon inicialmente células LNCaP para todos los experimentos ya que son células de cáncer de próstata humano bien diferenciadas en las que se ha caracterizado la activación independiente del ligando de RA por FSK (Nazaret *et al* 1996 *J. Biol. Chem.* 271, 19900-19907; y Sadar 1999 *J Biol. Chem.* 274, 7777-7783). Las células

LNCaP expresan RA endógeno y secretan el antígeno específico de próstata (AEP) (Horszewicz *et al* 1983 *Cancer Res.* 43, 1809-1818). Las células LNCaP se pueden cultivar como monocapas en cultivo celular o como tumores en el modelo de xenoinjerto bien caracterizado que progresa a independencia de andrógenos en huéspedes castrados (Sato *et al* 1996 *J Steroid Biochem. Mol. Biol* 58, 139-146; Gleave *et al* 1991 *Cancer Res.* 51, 3753-3761; Sato *et al* 1997 *Cancer Res.* 57, 1584-1589; y Sadar *et al* 2002 *Mol. Cancer Ther.* 1(8), 629-637). Las células de cáncer de próstata humano PC3 no expresan RA funcional (Kaighn *et al* 1978 *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 49, 17-21) y se usaron para someter a ensayo la especificidad del compuesto para RA. Las moléculas pequeñas que se dirigen específicamente a DNT de RA no deben tener ningún efecto sobre las células PC3. Esto significa que no deben alterar la proliferación de células PC3 si bloquean específicamente el RA para mediar sus efectos inhibidores. R1881 se empleó ya que es estable y evita los problemas asociados con el ligando fisiológico lábil dihidrotestosterona (DHT). La especificidad del indicador puede determinarse usando varias construcciones de gen indicador alternativo. Algunas construcciones de genes indicadores estimulados por ERA bien caracterizadas que se han usado ampliamente son el potenciador/promotor de AEP (6,1 kb) que contiene varios ERAs y es altamente inducible por andrógenos así como por FSK (Ueda *et al* 2002 *A J. Biol. Chem.* 277, 7076-7085) y ARR3-timidina quinasa (tk)-luciferasa), que es una construcción indicadora artificial que contiene tres repeticiones en tándem de las regiones ERA1 y ERA2 de probasina de rata aguas arriba de un indicador de luciferasa (Snoek *et al* 1996 *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59, 243-250). Se empleó CMV-luc (sin ERAs y es constitutivamente activa) para determinar que un compuesto no tiene un efecto inhibidor general sobre la transcripción.

20 Modelos animales

Algunos experimentos implicaban el uso de ratones SCID. Los ratones SCID se eligieron debido a que las estirpes celulares humanas y los tumores trasplantables sobreviven en animales inmunocomprometidos y los ratones SCID muestran las mejores tasas de crecimiento. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Columbia Británica y se revisan anualmente. En caso de una emergencia en la que no se puede proporcionar el cuidado adecuado a los animales, a los animales se les aplica la eutanasia a discreción de los veterinarios o equipo de cuidado animal. Los veterinarios son responsables de las inspecciones y consulta. El Certificado de Cuidado de Animales firmado establece específicamente, "el Comité de Cuidado de Animales ha examinado y aprobado el uso de animales para el proyecto experimental anterior o curso de enseñanza, y se ha dado una garantía de que los animales involucrados serán atendidos de acuerdo con los principios contenidos en el Cuidado de Animales Experimentales - Una guía para Canadá, publicado por el Consejo Canadiense sobre el Cuidado de Animales".

35 Xenoinjertos subcutáneos

A ratones SCID atímicos macho de seis a ocho semanas se les inoculó por vía subcutánea en el costado a través de una aguja de calibre 27 una suspensión de 150 μ l de células LNCaP o de cáncer de próstata humano PC3 (1×10^6 células). Las inoculaciones tuvieron lugar mientras el animal estaba bajo anestesia con isoflurano. La tasa de crecimiento tumoral es de aproximadamente 75 %. Los ratones que portaban tumores de 100 mm^3 fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento. La castración se realizó como se describe a continuación. El volumen tumoral (fórmula: $L \times A \times A \times 0,5236$) se midió en ratones portadores de tumores subcutáneos LNCaP que se volvieron palpables o visibles y al menos con 40 mm^3 . Los animales se controlaron diariamente y los tumores se midieron cada 5 días.

45 Duración de los experimentos

La evaluación del volumen tumoral (que no excede 1.000 mm^3) fue el criterio para determinar la terminación de los experimentos de xenoinjertos subcutáneos.

50 Histología e inmunohistoquímica

Para la histología rutinaria, los órganos principales y los xenoinjertos se recolectaron tras la compleción del experimento y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % y luego se embebieron en parafina. Las secciones fijas se cortaron y tiñeron con H y E. Para determinar los posibles efectos de los compuestos sobre las tasas de proliferación y la apoptosis en xenoinjertos, se realizó inmunotinción por Ki-67 y el ensayo TUNEL. La inmunotinción por Ki-67 usa el anticuerpo monoclonal MIB-1 a una concentración de IgG de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:50) en secciones de tejido procesadas. Los niveles de RA se determinaron por inmunohistoquímica o un análisis de membrana Western.

60 Retirada de andrógenos para inducir la progresión

La retirada de andrógenos se completó por castración. Bajo anestesia con isoflurano, se utilizó una incisión vertical de 5 mm para retirar con cuidado la almohadilla de grasa del epidídimo, a la que se une el testículo, y para extirpar los testículos del cuerpo. El cordón que conecta los testículos al suministro sanguíneo se ligó con una sutura, luego se cortó. A continuación, el cordón se regresó a la cavidad abdominal. La sutura quirúrgica se usó para cerrar la incisión. Para aliviar el dolor, se inyectó buprenorfina (0,05 mg/kg) antes de la cirugía.

Xenoinjerto y recuperación de órganos

5 Todos los xenoinjertos y los órganos principales fueron recuperados para su análisis. La recuperación se realizó después del sacrificio por paro cardíaco por gas CO₂ y los xenoinjertos u órganos se extirparon para el análisis de inmunohistoquímica.

Eutanasia

10 Los animales se sacrificaron por paro cardíaco por gas CO₂. Este método es la política establecida por el Comité de Cuidado de Animales y es sensible al medio ambiente, eficaz, económico y aprobado éticamente.

Síntesis química

15 Todas las reacciones se realizaron en matraces de fondo redondo secado a fuego. Los matraces se equiparon con septa de caucho y las reacciones se llevaron a cabo bajo una presión positiva de argón a menos que se especifique lo contrario. Jeringas de acero inoxidable se usaron para transferir líquidos sensibles a aire y a la humedad. Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida como se ha descrito por Still *et al.* (Still, W. C, Kahn, M., Mitra, A., *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2923) usando gel de sílice de malla de 230-400. Se realizó cromatografía en capa fina usando placas de aluminio recubiertas previamente con 0,25 mm de gel de sílice de malla de 230-400 impregnado con un indicador fluorescente (254 nm). Las placas de cromatografía en capa fina se visualizaron por exposición a la luz ultravioleta y una solución de *p*-anisaldehído (*p*-anisaldehído al 1 %, H₂SO₄ al 2 %, ácido acético al 20 % y etanol al 77 %), seguido por calentamiento (~1 min) con una pistola de calentamiento (~250 °C). Las soluciones orgánicas se concentraron en evaporadores rotatorios Büchi B-114 a ~33 hPa (~25 torr) a 25-30 °C.

20 Los reactivos y disolventes comerciales se usaron como se recibieron. Todos los disolventes usados para la extracción y la cromatografía fueron de calidad HPLC. Gel de Si en fase normal de Sep paks™ se adquirieron de Waters, Inc. Las placas de cromatografía en capa fina eran Kieselgel 60F₂₅₄. Todos los reactivos sintéticos se adquirieron de Sigma Aldrich Canadá.

30 Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (¹H RMN) se registraron a 25 °C usando un espectrómetro Bruker 400 con sonda inversa y Bruker 400, se notificaron en partes por millón en la escala δ, y se hace referencia a partir de un protio residual en el disolvente de RMN (CDCl₃: δ 7,24 (CHCl₃), DMSO-*d*₆: δ 2,50 (DMSO-*d*₅)). Los datos se notificaron según se indica: desplazamiento químico [multiplicidad (s = singlete, d = doblete, dd = doblete de dobletes, ddd = doblete de dobletes, dm = doblete multiplete, t = triplete, m = multiplete), constantes de acoplamiento en hercios, integración]. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³C RMN) se registraron con un espectrómetro Bruker 400, se notifican en partes por millón en la escala δ, y se hace referencia a partir de las resonancias de carbono del disolvente (CDCl₃: δ 77,23, DMSO-*d*₆: δ 39,51). Los datos se notifican según se indica: desplazamiento químico. Los espectros de resonancia magnética nuclear de flúor (¹⁹F RMN) se registraron a 25 °C usando un espectrómetro Bruker 300, se notifican en partes por millón en la escala δ. Los datos se notifican según se indica: desplazamiento químico [multiplicidad (td = triplete de dobletes), constantes de acoplamiento en hercios].

Ejemplo 1

45 Se utilizó una aplicación de una serie de identificaciones sistemáticas para identificar compuestos activos que inhiben la actividad de DNT de RA. La identificación sistemática inicial era un ensayo basado en células que comprende células LNCaP mantenidas en cultivo. El ensayo consiste en la activación de RA usando tanto andrógenos (dependiente de ligando) como forskolina (independiente de ligando) y la medición de los niveles de AEP secretados por células LNCaP en presencia y ausencia de extractos crudos. AEP es un gen regulado por andrógenos que contiene varios ERAs bien caracterizados. Los aumentos independientes de andrógenos en la expresión génica de AEP se producen en células de cáncer de próstata mediante un mecanismo dependiente de RA. Se observó que el extracto PNG 01-185 bloquea la secreción de AEP inducida tanto por andrógenos como por forskolina.

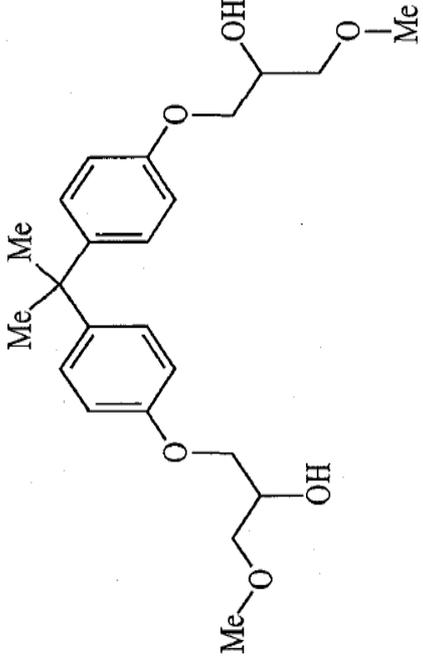
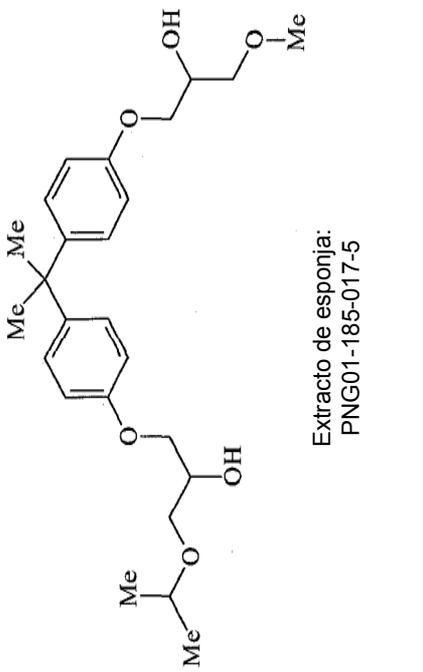
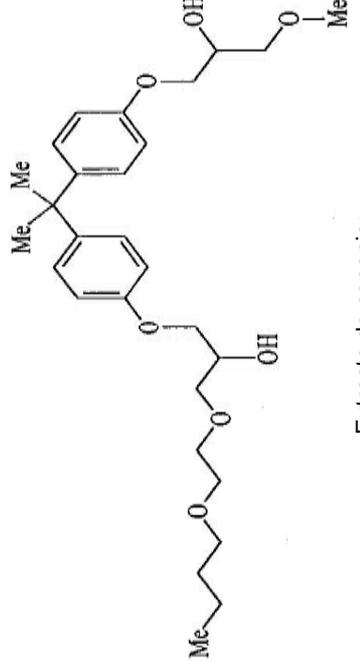
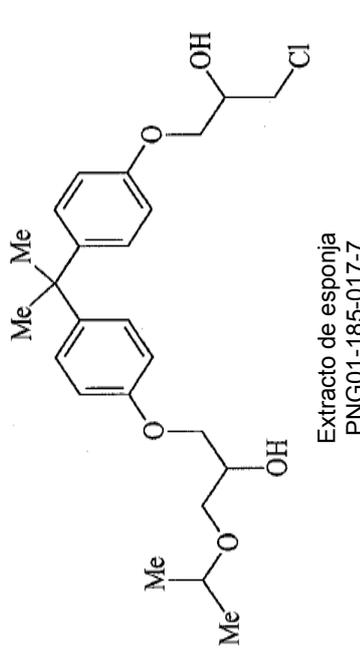
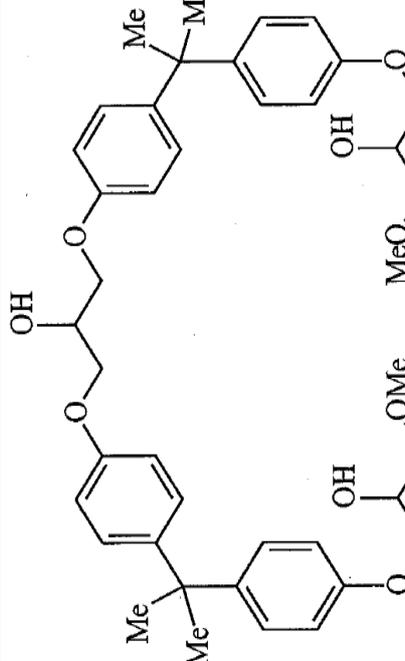
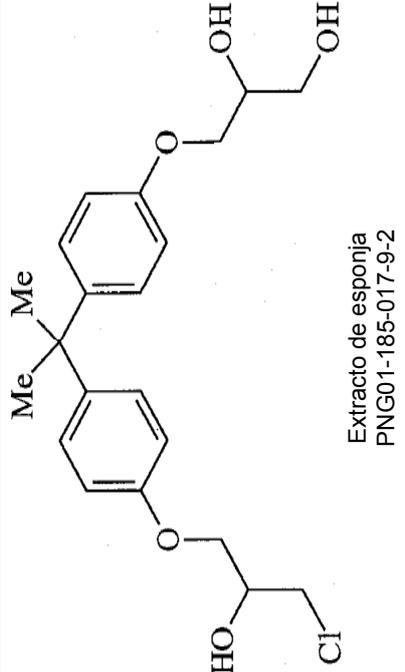
55 Para asegurar que los efectos inhibidores del extracto PNG 01-185 sobre la proteína AEP endógena estaban en el nivel transcripcional, también se examinaron las construcciones de genes indicadores. La activación de RA endógeno se midió en células de cáncer de próstata humano LNCaP mediante la medición de los indicadores sensibles a andrógenos que contienen elementos de respuesta a andrógenos (ERAs), tales como la construcción del gen indicador AEP-luciferasa o el indicador ARR3-luciferasa. Las células LNCaP mantenidas como monocapas se transfectaron con AEP-luciferasa y se usaron para identificar sistemáticamente los extractos crudos preparados a partir de esponjas marinas, así como algunos compuestos comerciales seleccionados. La medición de ambos AEP-luc y ARR3-luc se llevó a cabo puesto que AEP-luc está altamente inducido por andrógenos y en ausencia de andrógenos inducidos por FSK. R1881 (1 nM) se usó para mediar la activación dependiente del ligando de RA y las concentraciones de FSK (50 μM) se usaron para mediar la activación independiente del ligando de RA. Se observó que PNG 01-185 bloquea la actividad de AEP-luciferasa inducida tanto por R1881 como por FSK (Figura 1). Los controles incluyeron experimentos paralelos con estirpes celulares que no expresan RA y otros indicadores que no contienen ERAs.

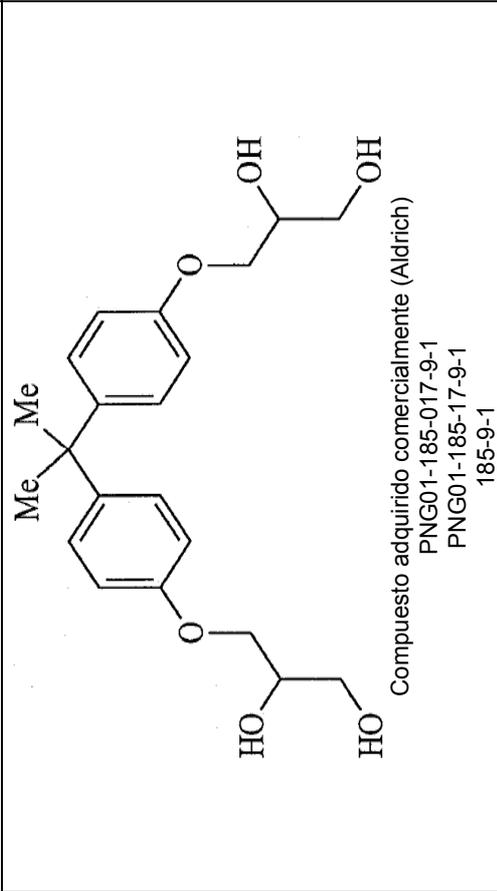
El extracto PNG 01-185 se fracciona de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 2 para producir PNG 01-185-17. Cada fracción de PNG 01-185-17 se volvió a someter a ensayo sobre la actividad de ARR3-luc y las fracciones 3 y 8 mostraron una inhibición de al menos el 50 % (Figura 3). Estas fracciones se sometieron a ensayo a continuación para determinar su capacidad para inhibir DNT de RA. Las células LNCaP se co-transfectaron con el vector de expresión para Gal4DUA-AR₁₋₅₅₈ y el indicador de 5XGal4UAS-luciferasa complementario como se muestra en la Figura 4. La inducción de este indicador por FSK es una medida de la transactivación de la proteína de fusión Gal4DUA-AR₁₋₅₅₈ (Sadar 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783). Los extractos identificados anteriormente se identificaron sistemáticamente mediante tales ensayos, así como algunos compuestos adquiridos de proveedores comerciales. R1881 no induce tales ensayos (se une al dominio de unión a ligando (DUL) del RA que no está presente en la quimera Gal4DUA-AR₁₋₅₅₈) y por lo tanto no se usó excepto como un control negativo. Estos estudios mostraron que PNG 01-185-17-8 inhibió la activación de DNT de RA.

Lo siguiente en la Tabla 3 son estructuras químicas para los compuestos a partir de extractos de esponja o compuestos disponibles comercialmente que mostraron actividad usando los ensayos descritos anteriormente:

15

TABLA 3

 <p>Chemical structure of a bisphenol A derivative with two methoxy groups and two hydroxyl groups.</p>	 <p>Extracto de esponja: PNG01-185-017-5</p>
 <p>Chemical structure of a bisphenol A derivative with two hydroxyl groups and two methoxy groups.</p>	 <p>Extracto de esponja PNG01-185-017-7</p>
 <p>Extracto de esponja.</p>	 <p>Extracto de esponja PNG01-185-017-9-2</p>

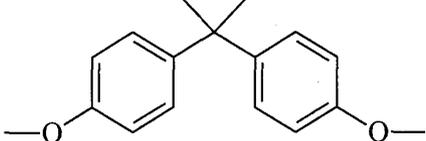
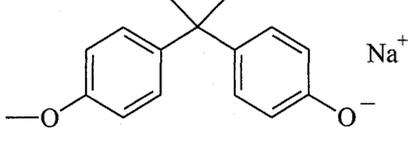
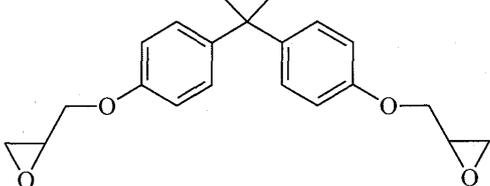
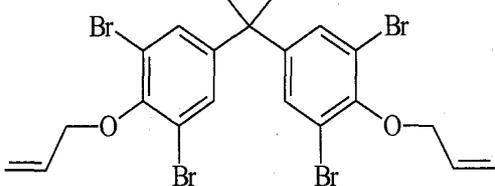
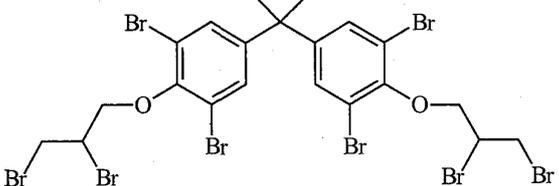
<p>PNG01-185-017-8</p>	<p>PNG01-185-17-9-2 185-9-2 B2</p>
<p>Me Me</p>  <p>HO HO</p> <p>Compuesto adquirido comercialmente (Aldrich) PNG01-185-017-9-1 PNG01-185-17-9-1 185-9-1</p>	

Las CI50 se determinaron para cada intento que mostró una respuesta a la dosis. Los extractos identificados se usaron para aislar una forma purificada del compuesto de la biblioteca de compuestos naturales que median el efecto inhibitor sobre la transactivación de RA como se describe en el Ejemplo 2, seguido por identificaciones sistemáticas secundarias descritas en el Ejemplo 3.

5

Los siguientes compuestos de la Tabla 4 no mostraron actividad alguna en los ensayos descritos anteriormente.

TABLA 4

10 La semejanza estructural de algunos de los compuestos activos con respecto a EDGBA (éter diglicídico del bisfenol A) indica que tienen probablemente un origen industrial. La esponja recogida presumiblemente bioacumuló los compuestos del agua de mar contaminada. Este fue un caso fortuito, ya que es poco probable que estos compuestos se identificaran sistemáticamente en los bioensayos en cualquier otra circunstancia.

15 Ejemplo 2

Se aisló el compuesto activo purificado a partir de los extractos descritos en el Ejemplo 1. Los especímenes de *Geodia lindgreni* (Lendenfeld, 1903) se recogieron a mano usando SCUBA a una profundidad de 5 m bajo las rocas en un arrecife protegido cerca de la isla Loloata, Papúa Nueva Guinea. La esponja congelada (890 g) se extrajo posteriormente de forma exhaustiva con MeOH y se observaron los extractos crudos a activarse en los ensayos descritos anteriormente en el Ejemplo 1. El fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto por aplicación secuencial de Sephadex LH20, cromatografía en columna ultrarrápida en fase inversa y HPLC de gradiente en fase inversa dio muestras purificadas de PNG01-185-017-2, -5, -6, -7 y -8 (Figura 2). Las estructuras se aclararon por análisis de RMN y MS y se muestran anteriormente en el Ejemplo 1.

25 El fraccionamiento guiado por bioensayo de extractos activos siguió un protocolo convencional. Inicialmente, el extracto crudo se suspendió en agua y se extrajo secuencialmente con hexanos, CH_2Cl_2 y EtOAc para generar cuatro sub-fracciones de diferente polaridad. La primera cromatografía llevada a cabo en la fracción activa de esta partición inicial fue cromatografía Sephadex LH20 que usa metanol puro o un sistema de disolvente mixtos como el eluyente. Fraccionamientos posteriores se llevaron a cabo por una columna abierta ultrarrápida sobre gel de sílice o cromatografía ultrarrápida en fase inversa, HPLC (fase normal y/o fase inversa), o cromatografía centrífuga en contracorriente (en un aparato Ito Coil), etc., cuando la situación lo justifique. El esclarecimiento estructural de metabolitos innovadores se consiguió mediante análisis espectroscópico, usando técnicas de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas, incluyendo un espectrómetro RMN Bruker AV600 equipado con una criosonda y el espectrómetro RMN de 800 MHz de NANUC Varian en Edmonton, Alberta, Canadá. Los compuestos purificados se sometieron a ensayo para la actividad usando las identificaciones sistemáticas descritas anteriormente en el Ejemplo 1 (actividades de ERA-luciferasa y transactivación de DNT) y luego se usaron para identificaciones sistemáticas secundarias descritas en el Ejemplo 3.

40 Ejemplo 3

Los compuestos se validaron mediante la aplicación de identificaciones sistemáticas secundarias. Los compuestos purificados se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inhibir: transactivación del dominio N-terminal del receptor de andrógenos (DNT de RA); otros receptores esteroideos (especificidad); expresión endógena de ARNm de AEP; interacción RA sobre ERAs; interacción N/C y proliferación de células de cáncer de próstata en respuesta a andrógenos.

45

Transactivación del DNT de RA

En ausencia de suero y de andrógenos, tanto la forskolina (FSK), que estimula la actividad de PKA, como la IL-6 aumentan la expresión del gen de AEP en células de cáncer de próstata mediante un mecanismo que implica la transactivación de DNT de RA (Sadar, MD, *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783 (1999); Ueda, T., Bruchofsky, N., Sadar, M.D., *J. Biol. Chem.* 277, 7076-7085 (2002); Ueda, T., Mawji, N.R., Bruchofsky, N., Sadar, M.D., *J. Biol. Chem.* 277, 38087-38094 (2002 B); Quayle SN, Mawji NR, Wang J, Sadar M.D., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 23 de enero de 2007; 104(4):1331-6). La capacidad de 185-9-2 para inhibir la transactivación de DNT de RA se sometió a ensayo mediante la clonación de los aminoácidos 1-558 de DNT de RA humano en el C-terminal de Gal4DUA. Los vectores de expresión de estas proteínas quiméricas se co-transfectaron en células LNCaP con un gen indicador que contiene el sitio de unión a Gal4 como elementos que actúan en *cis* (p5xGal4UAS-TATA-luciferasa). Las células se trataron previamente con bicalutamida (BIC, 10 μ M) o 185-9-2 (5 μ g/ml = 12 μ M)) antes de la adición de FSK o IL-6. Los controles incluyeron bicalutamida que no afecta a tales ensayos, ya que se une a DUL de RA que no está presente en la quimera Gal4DUA-AR₁₋₅₅₈. Se observó que 185-9-2 reduce tanto la transactivación inducida por FSK como la inducida por IL-6 de DNT de RA a los niveles de valor basal (Figura 5). Se observó que 185-9-2 tiene una CI₅₀ de ~6,6 μ M para la inhibición de la transactivación de DNT de RA.

Especificidad del receptor esteroideo

Las similitudes de secuencia de aminoácidos en el RA con los receptores RP esteroideos humanos relacionados y el receptor de glucocorticoides (RG) son significativas en algunos dominios tales como el DUA. El DNT de RA comparte menos del 15 % de homología con RP y RG, pero estos receptores interactúan con algunas de las mismas proteínas (p. ej., SRC-1 y CBP). Por lo tanto, se usaron ensayos de gen indicador para determinar si los compuestos candidatos que bloquean la actividad de RA tienen algún efecto sobre la actividad transcripcional de RG y RP. Las células se co-transfectaron con plásmidos de expresión para hGR de longitud completa, PR β y el indicador relativo (es decir, pGR-Luc o indicadores PRE-E1b-Luc). Las células se trataron entonces con un vehículo de etanol, dexametasona (RG), 4-pregнено-3,20 diona (progesterona) (RP) seguido de la medición de la actividad de luciferasa. 185-9-2 inhibió la actividad transcripcional de RA, pero no inhibió las actividades de PRE-luciferasa o GRE-luciferasa en respuesta al ligando (Figura 6). En cambio, bicalutamida (10 μ M) inhibió la actividad transcripcional de RP. Algunos anti-andrógenos actualmente usados en la clínica tienen actividades progestacionales y glucocorticoidales. En los machos adultos, el papel de la actividad de RP no está claro. 185-9-2 no inhibe la transactivación de otros receptores esteroideos. Estos estudios también proporcionan pruebas de que 185-9-2 no tiene efectos no específicos y generales sobre la transcripción o traducción, ya que no inhibió la inducción de estos indicadores de luciferasa en respuesta a sus ligandos cognados. Dado que 185-9-2 bloquea la actividad del gen indicador de AEP-luciferasa que contiene varios ERAs y es inducible por andrógenos y FSK soporta que sus efectos inhibidores se encuentran en el nivel de la transcripción. Estos estudios sugieren que 185-9-2 es específico de RA que implica que debe haber menos efectos secundarios a partir de la administración sistémica a diferencia de si otros receptores de esteroides se ven afectados.

Expresión de genes endógenos

La inducción de ARNm de AEP tanto por R1881 (dependiente de ligando) como FSK (independiente de ligando) en células LNCaP depende de RA (Sadar, MD, *J. Biol. Chem.* 274, 7777-7783 (1999); Wang G, Jones SJ, Marra MA, Sadar MD, *Oncogene* 2006; 25:7311-23). Para ensayar si los compuestos tienen un efecto sobre la expresión de genes endógenos, se midieron los niveles de ARNm de AEP en células LNCaP expuestas a R1881. Las células LNCaP (en medio libre de suero y libre de rojo fenol) se incubaron con compuestos durante 1 hora antes de la adición de R1881 (1 nM) durante 16 horas adicionales antes de la recolección y el aislamiento de ARN total. Los niveles de ARNm se midieron usando QPCR. Los niveles de ARNm de AEP se normalizaron a niveles de ARNm de GAPDH. Se observó que 185-9-2 bloquea la inducción de ARNm de AEP endógeno por R1881 a niveles casi de valor basal (Figura 7).

Interacción de RA con ERAs en el ADN

Se usó la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para evaluar si 185-9-2 impidió la unión de RA a los ERAs endógenos en la región potenciadora del gen de AEP en el contexto fisiológico de la estructura de la cromatina. El RA muestra la ocupación constitutiva en el promotor de AEP ERA, mientras que el potenciador ERA tiene una ocupación inducible en la respuesta a andrógenos (Jia L, Coetzee GA, *Cancer Res.* 1 de septiembre de 2005; 65(17):8003-8). Ocupación de RA en estas regiones picos reguladoras en 16 h de tratamiento con andrógenos (Jia L, Choong CS, Ricciardelli C, Kim J, Tilley WD, Coetzee GA., *Cancer Res.* 1 de abril de 2004; 64(7):2619-26; Louie MC, Yang HQ, Ma AH, Xu W, Zou JX, Kung HJ, Chen HW, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 4 de marzo de 2003; 100(5): 2226-30; Wang Q, Carroll JS, Brown M., *Mol Cell.* 2 de septiembre de 2005; 19(5):631-42). Las células LNCaP se trataron durante un periodo de tiempo corto (3 h) u óptimo (16 h) con DHT más o menos 185-9-2, antes de la reticulación con formaldehído al 1 % y la recolección de células. Se lisaron las células, se sometieron a ultrasonidos, y los extractos se usaron para la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-RA. 185-9-2 inhibió la interacción de RA con ERA en el potenciador de AEP en células LNCaP en respuesta a andrógenos (Figura 8A). La disminución en la interacción de RA con ERA no era debido a la disminución de los niveles de la proteína RA. El análisis de membrana

Western de la proteína RA a partir de lisados enteros preparados de células LNCaP recolectadas en estos mismos puntos temporales, reveló que 185-9-2 TAMPOCO disminuye los niveles de proteína RA (Figura 8B). La incubación a largo plazo de las células LNCaP con 185-9-2 tampoco redujo los niveles de proteína RA (Figura 9). De este modo, se cree que 185-9-2 no inhibe la actividad transcripcional de RA mediante la reducción de los niveles de

5 proteína RA. Esto sugiere que el mecanismo de acción de 185-9-2 es único de otros compuestos, tales como ribozima cabeza de martillo de ARNm de RA, ARNip de RA, piranocumarina, calpaína, isotiocianato de fenetilo, fulvestrant, decursin, LAQ824, y baicaleína que disminuyen los niveles de proteína de RA y se están explorando en otros laboratorios.

10 **185-9-2 no impide la translocación nuclear de RA**

Otro posible mecanismo por el cual cualquiera de estos inhibidores puede disminuir la transactivación de RA podría implicar la prevención de la translocación nuclear de la proteína RA. En ausencia de ambos andrógenos o la estimulación por vías alternativas, RA es principalmente citoplasmático. El fraccionamiento celular y microscopía

15 fluorescente (Figura 10A, B) revelaron que 185-9-2 no causó la translocación nuclear de RA por sí solo en la ausencia de andrógenos, ni impidió la translocación nuclear de la proteína RA en respuesta a los andrógenos (dihidrotestosterona, DHT).

20 **Interacción N/C**

La actividad dependiente del ligando de RA requiere la interacción entre los extremos amino terminales (N) y carboxi terminales (C) para la formación del dímero anti-paralelo (He B, Kemppainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM., *J Biol Chem.* 1999, 274(52):37219-25). Los anti-andrógenos tales como bicalutamida, flutamida y acetato de ciproterona no estimulan esta interacción por su propia cuenta, y cada uno inhibe la interacción N/C inducida por

25 andrógenos (Wong, CI, Zhou, ZX, Sar, M., y Wilson, E. M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 19004-19012; Langley, E., Zhou, Z. X., y Wilson, E. M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 29983-29990; Kemppainen, J. A., Langley, E., Wong, C. I., Bobseine, K., Kelce, W. R., y Wilson, E. M. (1999) *Mol. Endocrinol.* 13, 440-454; Masiello D, Cheng S, Bublely GJ, Lu ML, Balk SP. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 29, 26321-26326). El sistema de dos híbridos de mamífero se usó para medir esta interacción. Las células CV1 se co-transfectaron con el vector de expresión para una proteína de fusión de los aminoácidos 1-565 de DNT de RA fusionado a VP16 en el extremo N-terminal (VP16-ARTAD, el extremo N-terminal), el vector de expresión para el DUA de Gal4 fusionado a DUL de RA (aminoácidos 628-919; Gal4-ARLBD; el extremo C-terminal), y el indicador Gal4-luciferasa (Masiello D, Cheng S, Bublely GJ, Lu ML, Balk SP. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 29, 26321-26326). No hubo interacción detectable entre VP16-ARTAD y Gal4-ARLBD en ausencia de andrógenos (Figura 11). Los andrógenos estimularon esta interacción como se mide por el aumento de la actividad de luciferasa que se bloqueó por la bicalutamida (véase también, por ejemplo, Masiello D, Cheng S, Bublely GJ, Lu ML, Balk SP. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 29, 26321-26326). Es importante destacar que, se observó que 185-9-2 inhibe la interacción N/C estimulada por andrógenos (compárense las columnas 6 y 2). Por consiguiente, se cree que 185-9-2 inhibe la actividad transcripcional del RA mediante la prevención de la interacción N/C.

40 **Ensayo de proliferación**

La glándula prostática es un órgano dependiente de andrógenos, en el que los andrógenos son el estímulo mitogénico predominante (Isaacs JT, Scott WW, Coffey DS., *Prog Clin Biol Res.* 1979;33:133-44). Esta dependencia de los andrógenos proporciona los fundamentos subyacentes para el tratamiento del cáncer de próstata con la

45 castración química o quirúrgica. Los andrógenos (0,1 nM) estimulan la proliferación de células LNCaP. Para ensayar si 185-9-2 interfiere con RA, la función de AF-1 reduce la proliferación dependiente de andrógenos de las células LNCaP, similar a lo que se observa para los anti-andrógenos usados clínicamente, las células LNCaP se pre-trataron durante 1 h con bicalutamida (10 µM, control positivo) o 185-9-2 (5 µg/ml) antes de la adición de 0,1 nM de R1881. La incorporación de BrdU se midió 4 días más tarde para indicar cambios en la proliferación en respuesta a los andrógenos (Figura 12). R1881 (0,1 nM) aumentó la proliferación sobre el control (vehículo para R1881 y moléculas pequeñas). Se observó que 185-9-2 era tan eficaz como la bicalutamida en el bloqueo de la proliferación inducida por andrógenos. Se observó que 185-9-2 no bloquea la proliferación de células de cáncer de próstata humano PC3 (Figura 13, p>0,05) que no expresan RA funcional y por lo tanto no se basan en el RA para el crecimiento y la supervivencia (Kaighn *et al* 1978 *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 49, 17-21).

55 **Ejemplo 4**

Los modelos de xenoinjertos subcutáneos se usaron para ensayar si las moléculas pequeñas que inhiben la activación del receptor de andrógenos *in vitro* tienen algún efecto sobre estos tumores. PNG01-185-017-9-2 se ensayó *in vivo* usando los modelos de xenoinjertos subcutáneos LNCaP y PC3. Los experimentos *in vivo* se realizaron para proporcionar la información pertinente a la toxicidad, el requisito para la expresión endógena de RA, y si PNG01-185-017-9-2 tuvo un efecto sobre el crecimiento tumoral y la progresión a la independencia de andrógenos. El volumen tumoral se controló en ambos modelos de xenoinjertos.

60

PNG01-185-017-9-2 redujo el volumen tumoral de los xenoinjertos de LNCaP

Las células de cáncer de próstata humano LNCaP expresan el receptor endógeno de andrógenos (RA) y el antígeno específico de próstata (AEP), y el progreso a la independencia de andrógenos en huéspedes castrados. Las células LNCaP ($10^6/ml$) se implantaron por vía subcutánea en ratones macho NOD-SCID que tenían al menos 8 semanas de vida. Las células se suspendieron en 75 μl de medio RPMI 1640 (SFB al 5 %) con 75 μl de Matrigel y se inyectaron en el costado del huésped bajo anestesia. Los animales se castraron cuando los tumores tenían aproximadamente 100 mm^3 (media = $131,1 \pm 24,9 mm^3$; $n = 19$) y se asignaron al azar en dos grupos. Una semana después de la castración, los animales fueron tratados cada 5 días con una dosis intratumoral (I.T.) de 20 mg/kg de peso corporal de 185-9-2 o volumen equivalente de vehículo (control, DMSO). A los animales se les inyectó 185-9-2 durante un periodo de 25 días y se recolectaron 5 días después de la última inyección. Se administró un total de cinco dosis al animal. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron cada 5 días. Se observó 185-9-2 para reducir significativamente los tumores, incluso después de la primera inyección (Figura 14). En la duración del experimento, los tumores tratados con 185-9-2 fueron $35,4 \pm 15,7 mm^3$, mientras que los tumores tratados con vehículo continuaron creciendo y fueron $435,6 \pm 334,9 mm^3$. Por lo tanto, se observó que 185-9-2 reducía el volumen tumoral y no simplemente ralentizaba el crecimiento. Esto sugiere que 185-9-2 puede ser curativo para el cáncer de próstata independiente de andrógenos. La administración por I.T. del compuesto relacionado, EDGBA.2HCl racémico (B3), también se observó que reducía el volumen tumoral a partir de $109,6 \pm 17,4 mm^3$ a $79,0 \pm 63,6 mm^3$ en comparación con la administración por I.T. de DMSO que continuó creciendo (comenzando en $105,2 \pm 15,1 mm^3$ a $256,6 \pm 73,4 mm^3$) siguiendo el mismo régimen de tratamiento al igual que para 185-9-2 (Figura 15A). Las mediciones de AEP en suero correlacionan con los datos de volumen tumoral (datos de AEP en suero no mostrados).

Es importante destacar que, la administración I.V. mediante inyecciones en la vena de la cola cada dos días (50 mg/kg de peso corporal), mostró una tasa similar de citorreducción de los tumores (Figura 15A). En tan solo 2 semanas, se observó que la inyección I.V. de 185-9-2 reducía tumores de $105,6 \pm 12,0 mm^3$ a $64,3 \pm 29,6 mm^3$, mientras que los tumores eran de $187,9 \pm 42,8 mm^3$ en animales que recibieron una inyección I.V. de DMSO. Estos datos prometedores hacen hincapié en que la administración sistémica es eficaz en la reducción del cáncer de próstata independiente de andrógenos. La inmunohistoquímica (IHQ) que usa un marcador de apoptosis (TUNEL) y la proliferación (Ki67) muestra que la administración intravenosa de 185-9-2 aumenta la apoptosis y reduce la proliferación (Figura 15 B) acorde con la citorreducción de los tumores. Los datos de IHQ se prepararon por un laboratorio comercial que fue cegado a los tratamientos. Se observó que 185-9-2 no causa toxicidad general a los animales indicados por ningún cambio en el comportamiento animal o peso corporal (Figura. 14C y 15C). El examen patológico de las secciones de pulmón, corazón, hígado, bazo, y riñón recolectadas de los ratones que recibieron 185-9-2 o DMSO mediante la administración I.V. no mostraron signos de toxicidad (Figura 16).

Niveles de proteína RA en xenoinjertos recolectados

IHQ (Figura 17A) y el análisis de membrana Western (Figura 17B) proporcionan evidencia de que la administración por I.V. o I.T. de 185-9-2 no disminuyó los niveles de proteína RA en xenoinjertos en comparación con los niveles de proteína RA en xenoinjertos tratados con vehículo. Los niveles de citoqueratina 18 se midieron como una indicación de la cantidad de células epiteliales en las muestras de xenoinjerto.

Efectos sobre la angiogénesis

La angiogénesis en el cáncer de próstata es predominantemente dependiente sobre el factor de crecimiento endotelial vascular (FCVE). La testosterona es un potente inductor de FCVE en la próstata (Håggström *et al* 1999 *J Urol.* 161, 1620-1625) y la re-expresión de FCVE en tumores independientes de andrógenos es consistente con la re-expresión de genes regulados por andrógenos (Gregory *et al* 1998 *Cancer Res.* 58, 5718-5724). La expresión de FCVE se asocia con la independencia de andrógenos (Mitsiades *et al* 2001 *Expert Opin Investig Drugs.* 10, 1099-1115) y la enfermedad metastásica agresiva (Harper *et al* 1998 *J Pathol.* 186, 169-177; Balbay *et al* 1999 *Clin Cancer Res.* 5, 783-789; Melnyk *et al* 1999 *J Urol.* 161, 960-963). La tinción de los tumores recolectados para FCVE revela que PNG01-185-017-9-2 inhibió la expresión de FCVE (Figura 18).

Modelos de xenoinjertos de PC3 subcutáneos en huéspedes no castrados

Se empleó el modelo de xenoinjerto de PC3 para dar una indicación de si RA endógeno ha de expresarse para los compuestos para reducir la carga tumoral. PC3 son células de cáncer de próstata humano que no expresan RA funcional y por lo tanto no debe responder a la terapia con estas pequeñas moléculas que se han seleccionado por su especificidad en el bloqueo de la transactivación de DNT de RA. Las células PC3 se implantaron por vía subcutánea en ratones macho NOD-SCID. Los animales se asignaron al azar en dos grupos cuando los tumores tenían aproximadamente 100 mm^3 ($n = 9$ y 10 , media del volumen tumoral = $112,1 \pm 19,7 mm^3$). Los animales se trataron cada 5 días con una dosis subcutánea de 20 mg/kg de peso corporal de PNG01-185-017-9-2 o un volumen equivalente de vehículo (control, DMSO). El volumen tumoral y el peso corporal se midieron cada 5 días. En contraste con los xenoinjertos de LNCaP, PNG01-185-017-9-2 no redujo los tumores, pero redujo ligeramente el crecimiento de xenoinjertos de PC3 (Figura 19A, B). De acuerdo con los experimentos anteriores mostrados en este

caso, no se observó toxicidad alguna como se indica por el comportamiento animal y se mide por el peso corporal en el curso de los tratamientos (Figura 19C).

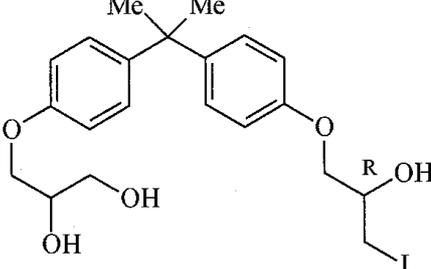
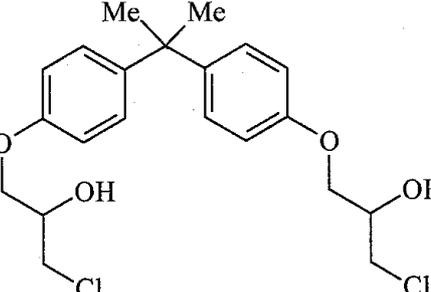
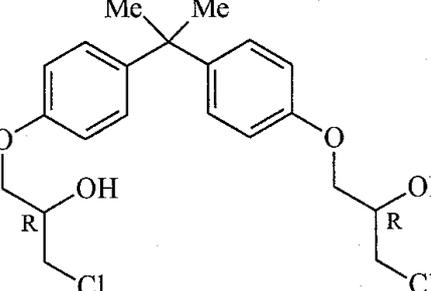
Ejemplo 5

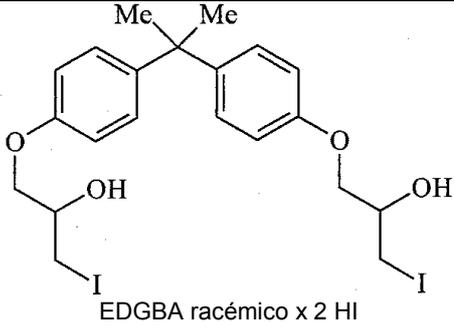
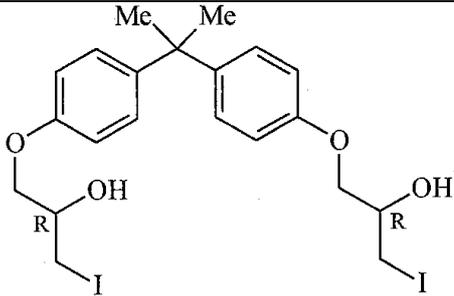
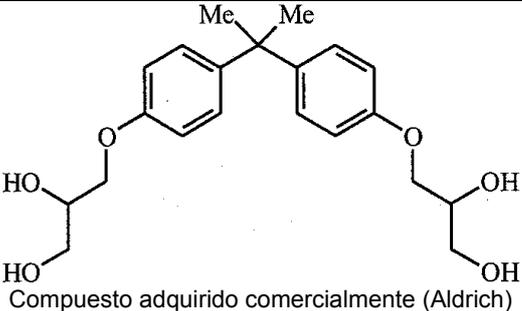
5 Para mejorar la administración de 185-9-2, se fabricó un derivado de éster de glicina de EDGBA.HCL.H2O (Figura 20A). Es fácilmente soluble en agua. Este compuesto se sometió al ensayo basado en células y se observó que inhibe la transactivación de DNT de RA inducido por interleucina-6 (IL-6) (Figura 20B, compárense el carril 2 con el

10

La siguiente Tabla 5 incluye los datos experimentales relativos a los compuestos que se muestran.

TABLA 5

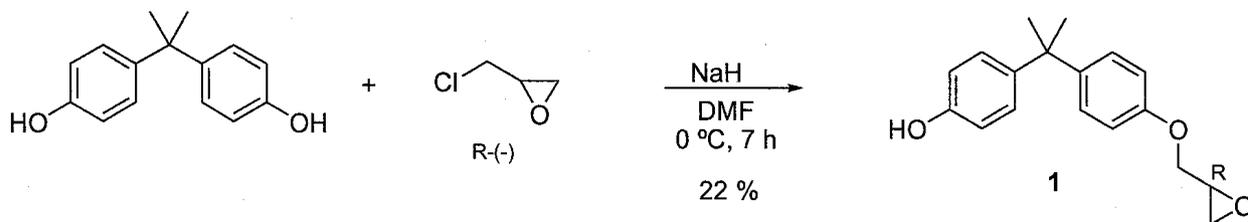
COMPUESTO	DATOS EXPERIMENTALES
 <p>(R)- EDGBA x HI x H2O (2-R) EDGBA x HI x H2O</p>	<p>7 % de inhibición de la activación de Fsk de Gal4ARN a 20 μM 33 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc a 20 μM y 20 % a 12,5 μM</p>
 <p>EDGBA racémico x 2HCl</p>	<p>79 % de inhibición de la activación de Fsk de gal4ARN a 12,5 μM 69 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p> <p>63 % de inhibición de activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p>
 <p>(R)- EDGBA x 2HCl (2-R) isómeros EDGBA x 2HCl</p>	<p>88 % de inhibición de la activación de Fsk de Gal4ARN a 12,5 μM 34,8 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc</p> <p>55 % de inhibición de 12,5 μM activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p>

 <p>EDGBA racémico x 2 HI</p>	<p>33 % de inhibición de la activación de Fsk de Gal4ARN a 20 μM 35 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p> <p>33 % de inhibición de activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p>
 <p>(R)-EDGBA x 2HI (2-R) Isómeros EDGBA x 2HI</p>	<p>42 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM 29 % de inhibición de la activación de R1881 de p6.1luc a 12,5 μM</p>
 <p>Compuesto adquirido comercialmente (Aldrich) PNG01-185-017-9-1 PNG01-185-17-9-1 185-9-1</p>	<p>10 % de inhibición de la activación de R1881 de ARR3luc a 50 μM</p>

Ejemplo 6

(R)-EGBA (1)

5



NaH como una dispersión al 60 % en aceite mineral (96 mg, 2,40 mmol, 2,2 equiv) se suspendió en dimetilformamida anhidro (5 ml) bajo atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió bisfenol A (250 mg, 1,09 mmol, 1 equiv). Después de 15 min, (R)-epiclorohidrina (214 μ l, 2,73 mmol, 2,5 equiv, 99 % ee) se añadió mediante una jeringa y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 7 h. Después, la solución se inactivó con agua desionizada (~3 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 ml). La capa orgánica se lavó con agua desionizada (2 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano y 2 % de metanol en diclorometano) para proporcionar (R)-EGBA (67 mg, 22 %) como un residuo

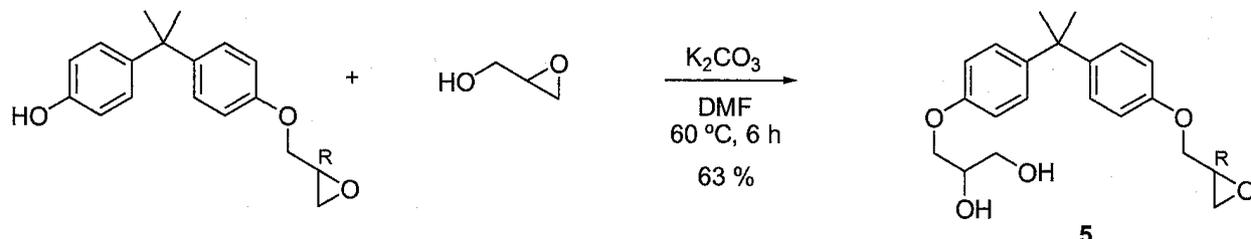
10

15

espumoso blanco.

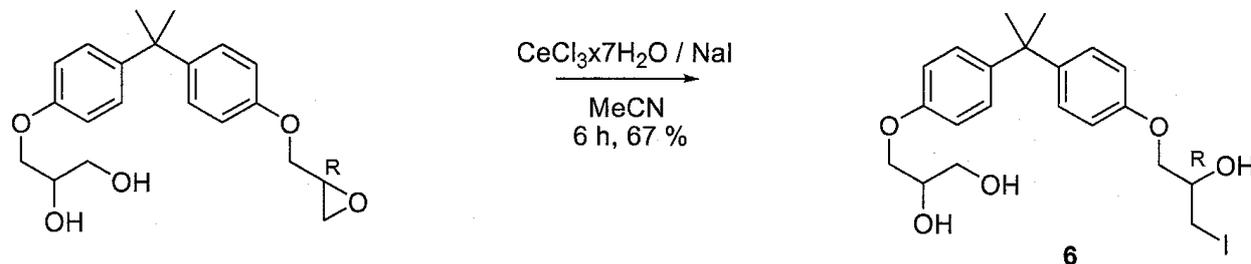
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9,13 (s, 1H), 7,09 (d, J = 8,8, 2H), 6,97 (d, J = 8,4, 2H), 6,83 (d, J = 8,8, 2H), 6,63 (d, J = 8,8, 2H), 4,25 (dd, J = 11,2, 2,8, 1H), 3,78 (dd, J = 11,2, 6,4, 1H), 3,29 (m, 1H), 2,82 (t, J = 4,8, 1H), 2,68 (dd, J = 4,8, 2,4, 1H), 1,54 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 156,5, 155,6, 143,8, 141,3, 128,0, 127,9, 115,2, 114,4, 69,5, 50,4, 44,4, 41,7, 31,4. CCF (5 % de metanol en diclorometano), Rf: 0,45 (UV, *p*-anisaldehído).

(R)-EDGBA x H₂O (5)



- 10 A una solución agitada de (*R*-EGBA) (13 mg, 0,045 mmol, 1 equiv) en dimetilformamida anhidra (0,3 ml) a ta se
añadió K_2CO_3 (6 mg, 0,045 mmol, 1 equiv) y glicidol racémico (9 μl , 0,135 mmol, 3 equiv). Después de agitar durante
6 h a 60 °C, se añadió agua desionizada (0,2 ml) a la solución de color marrón anaranjado resultante. La mezcla se
extrajo con acetato de etilo (3 x 1 ml). La capa orgánica se lavó con agua desionizada (2 ml), se secó sobre sulfato
de magnesio anhidro, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por
15 cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g (eluyente: diclorometano y 5 % de metanol en
diclorometano) para proporcionar (*R*-EDGBA x H₂O (10,3 mg, 63 %) como un aceite incoloro. ^1H RMN (400 MHz,
DMSO- d_6): δ 7,08 (dd, J = 8,0, 5,2, 4H), 6,83 (dd, J = 10,8, 8, 4H), 4,89 (d, J = 5,2, 1H), 4,62 (t, J = 5,6, 1H), 4,26
(dd, J = 11,6, 2,8, 1H), 3,93 (dd, J = 9,6, 4,0, 1H), 3,78 (m, 3H), 3,42 (t, J = 5,6, 2H), 3,29 (m, 1H), 2,82 (t, J = 4,8,
1H), 2,68 (dd, J = 4,8, 2,4 J = 11,6, 2,8, 1H), 1,57 (s, 6H). CCF (5 % de metanol en diclorometano), Rf: 0,36 (UV, *p*-
20 anisaldehído).

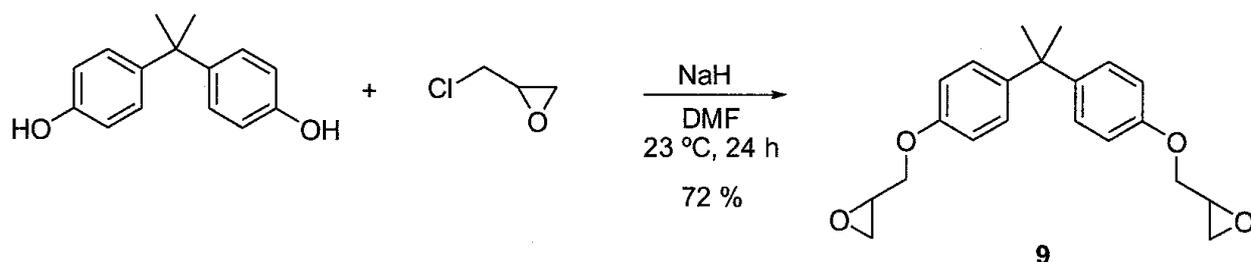
(R)-EDGBA x HI x H₂O (6)



- 25 A una solución de (*R*-EDGBA x H₂O (10 mg, 0,029 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo (0,5 ml) se añadió $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (21
mg, 0,057 mmol, 2 equiv) y NaI (9 mg, 0,057 mmol, 2 equiv). Después de agitar durante 6 h a ta, la suspensión
amarilla resultante se concentró bajo presión reducida. La mezcla de reacción se disolvió con diclorometano (2 ml) y
se lavó con H₂O (3 x 0,5 ml), la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se eliminó bajo presión
30 reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g
(eluyente: diclorometano y 10 % de metanol en diclorometano) para proporcionar (*R*-EDGBA x HI x H₂O (9 mg,
67 %) como una espuma incolora.
 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7,09 (m, 4H), 6,81 (m, 4H), 5,52 (d, J = 4,8, 1H), 4,86 (d, J = 4,8, 1H), 4,59 (t, J =
5,6, 1H), 3,88 (m, 3H), 3,75 (m, 3H), 3,40 (m, 3H), 3,31 (m, 1H), 1,57 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ
35 157,1, 156,7, 143,4, 143,0, 128,0, 127,9, 114,5, 114,4, 71,4, 70,6, 70,1, 68,6, 63,4, 41,8, 31,3, 12,7. CCF (5 % de
metanol en diclorometano), Rf: 0,30 (UV, *p*-anisaldehído).

Ejemplo 7

40 **EDGBA racémico (9)**

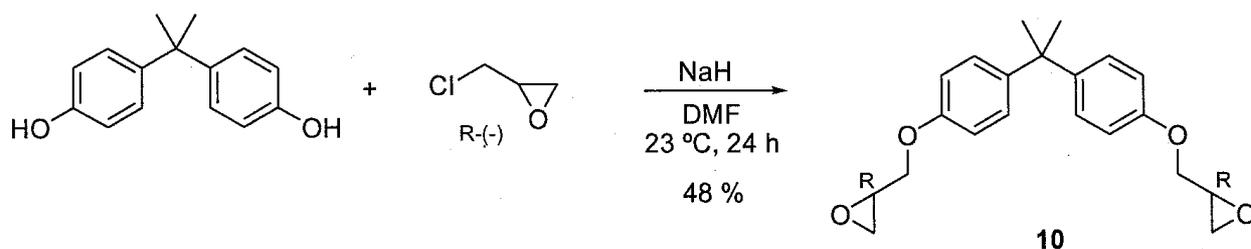


5 Un matraz de fondo redondo se cargó secuencialmente con NaH (200 mg, 4,80 mmol, 2,2 equiv) y bisfenol A (500 mg, 2,18 mmol, 1 equiv), y el contenido se colocó en una atmósfera de argón. Dimetilformamida anhidra (5 ml) se introdujo mediante una jeringa y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 15 min, se añadió epiclorhidrina racémica (700 μl , 8,96 mmol, 4,1 equiv) mediante una jeringa y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 18 h. Después, la solución se inactivó con agua desionizada (~1 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 4 ml). La capa orgánica se lavó con agua desionizada (2 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por

10 cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano) para proporcionar EDGBA racémico (536 mg, 72 %) como un residuo espumoso blanco. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7,10 (d, $J = 8,8$, 4H), 6,84 (d, $J = 8,8$, 4H), 4,25 (dd, $J = 11,6$, 2,8, 2H), 3,78 (dd, $J = 11,2$, 6,4, 2H), 3,29 (m, 2H), 2,81 (t, $J = 4,8$, 2H), 2,68 (m, 2H), 1,60 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 156,6, 143,5, 128,0, 114,5, 69,5, 50,3, 44,4, 41,8, 31,3. CCF (5 % de metanol en diclorometano), R_f 0,77 (UV, p -anisaldehído).

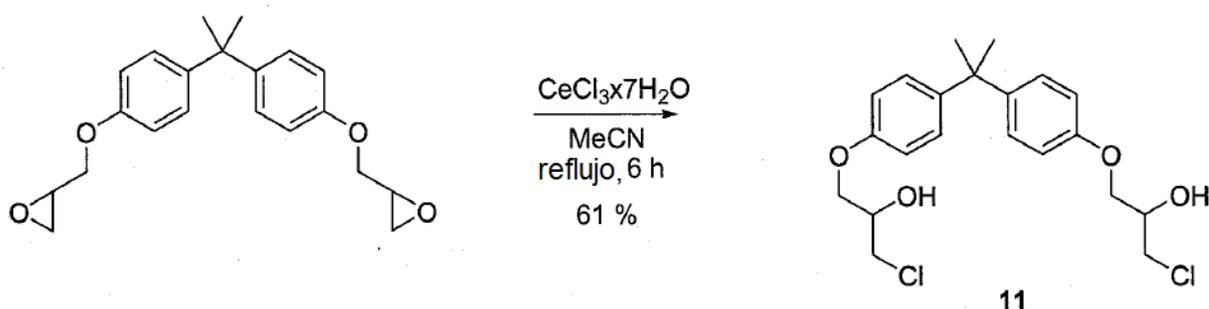
15

(R)-EDGBA (10)



20 El mismo procedimiento que se ha descrito previamente para EDGBA *racémico*, pero usando (*R*)-epiclorohidrina.

EDGBA *racémico* x 2HCl (11)

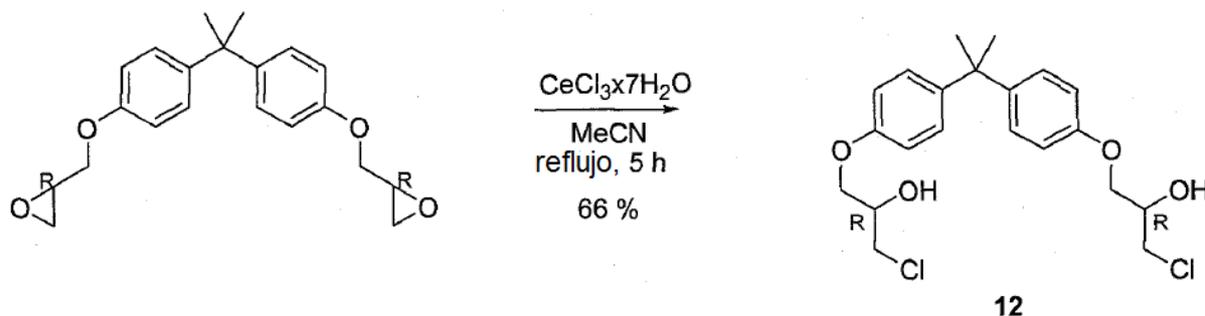


25 A una solución de EDGBA *racémico* (95 mg, 0,279 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo (1,0 ml) se añadió $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (208 mg, 0,558 mmol, 2 equiv) y la mezcla se calentó a reflujo durante 6 h. La pasta blanca resultante se filtró con diclorometano y la suspensión transparente se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g (eluyente: diclorometano y 10 % de metanol en diclorometano) para proporcionar EDGBA *racémico* x 2HCl (70 mg, 61 %) como una espuma incolora.

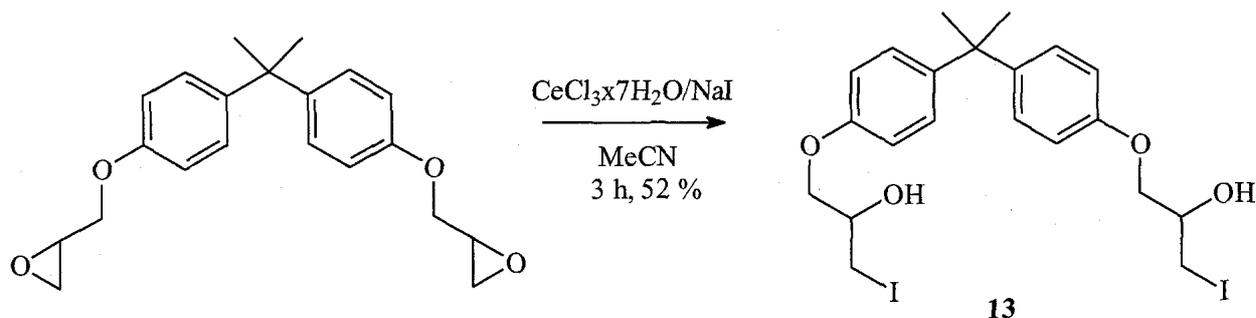
30

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7,09 (d, $J = 8,8$, 4H), 6,83 (d, $J = 8,4$, 4H), 5,50 (d, $J = 5,2$, 2H), 3,99 (m, 2H), 3,92 (d, $J = 5,6$, 4H), 3,73 (dd, $J = 11,2$, 4,4, 2H), 3,65 (dd, $J = 11,2$, 5,6, 2H), 1,57 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 156,7, 143,4, 128,0, 114,5, 69,5, 69,3, 47,4, 41,8, 31,3. CCF (5 % de metanol en diclorometano), R_f 0,31 (UV, p -anisaldehído).

Ejemplo 8

(R)-EDGBA x 2HCl (12)

5 El mismo procedimiento que se describe previamente para EDGBA *racémico* x 2HCl, pero usando (R)-EDGBA como material de partida.

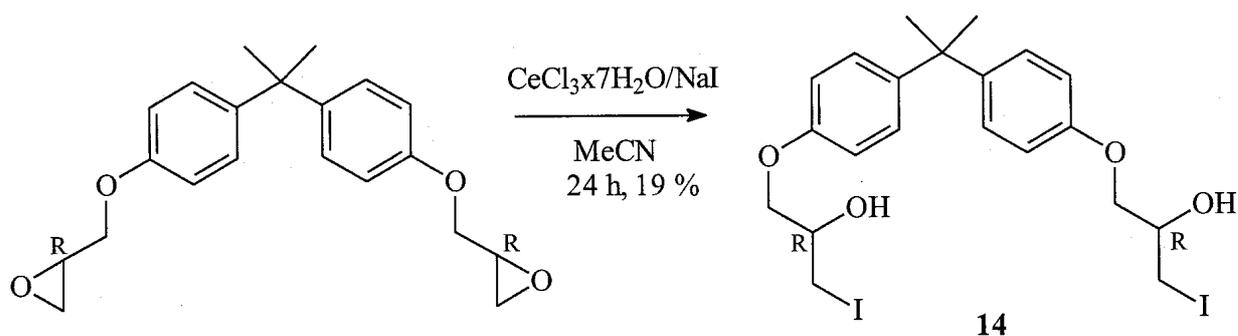
EJEMPLO 9**EDGBA *racémico* x 2HI (13)**

15 A una solución de EDGBA *racémico* (60 mg, 0,176 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo (1,0 ml) se añadió $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (131 mg, 0,352 mmol, 2 equiv) y NaI (53 mg, 0,352 mmol, 2 equiv). Después de agitar durante 3 h a ta, la suspensión amarilla resultante se concentró bajo presión reducida. La mezcla de reacción se disolvió con diclorometano (3 ml) y se lavó con H_2O (3 x 1 ml), la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g (eluyente: diclorometano y 10 % de metanol en diclorometano) para proporcionar EDGBA *racémico* x 2HI (55 mg, 52 %) como una espuma marrón.

20 ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,09 (d, $J = 8,8$, 4H), 6,82 (d, $J = 8,8$, 4H), 5,53 (d, $J = 5,2$, 2H), 3,87 (m, 4H), 3,71 (m, 2H), 3,40 (dd, $J = 10,4$, 4,8, 2H), 3,31 (m, 2H), 1,57 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 156,7, 143,5, 128,1, 114,5, 71,4, 68,6, 41,8, 31,3, 12,7.

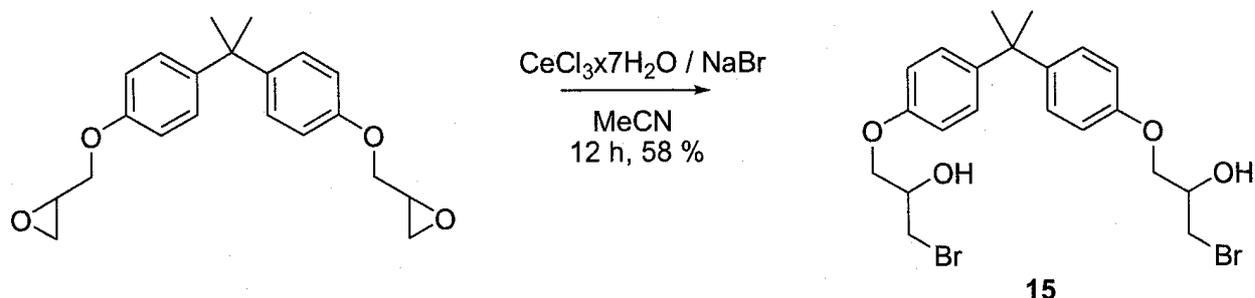
CCF (5 % de metanol en diclorometano), Rf: 0,43 (UV, *p*-anisaldehído).

Ejemplo 10

(R)-EDGBA x 2HI (14)

30 El mismo procedimiento que se describe previamente para EDGBA *racémico* x 2HI, pero usando (R)-EDGBA como material de partida.

Ejemplo 11

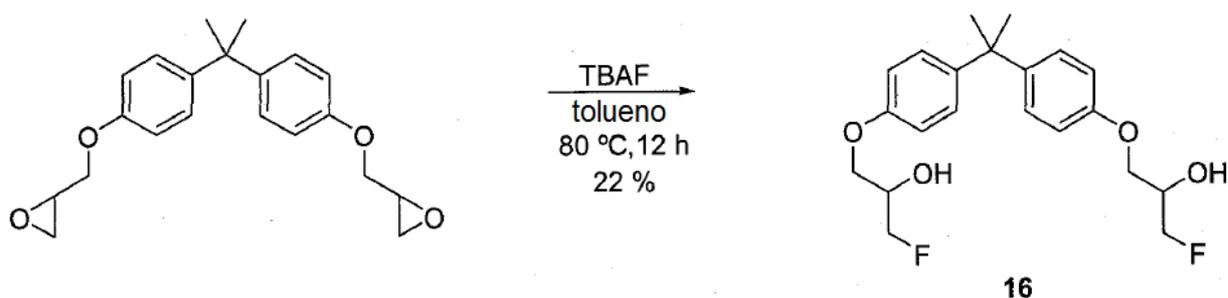
EDGBA racémico x 2HBr (15)

5 A una solución de EDGBA *racémico* (60 mg, 0,176 mmol, 1 equiv) en acetonitrilo (1,0 ml) se añadió $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (131 mg, 0,352 mmol, 2 equiv) y NaBr (36 mg, 0,352 mmol, 2 equiv). Después de agitar durante la noche a ta, se filtró la suspensión con diclorometano (6 ml) y se lavó con H_2O (3 x 2 ml), la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g (eluyente: diclorometano y 5 a 10 % de metanol en diclorometano) para proporcionar EDGBA *racémico* x 2HBr (33 mg, 58 %) como una espuma incolora.

10 ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,09 (d, $J = 8,4$, 4H), 6,83 (d, $J = 8,8$, 4H), 5,54 (d, $J = 5,2$, 2H), 3,98 (m, 2H), 3,93 (d, $J = 5,6$, 4H), 3,62 (dd, $J = 10,0$, 4,4, 2H), 3,53 (dd, $J = 10,4$, 5,2, 2H), 1,57 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 156,7, 143,5, 128,1, 114,5, 70,2, 68,8, 41,8, 37,2, 31,3. CCF (5 % de metanol en diclorometano), R_f 0,53 (UV, *p*-anisaldehído).

15

Ejemplo 12

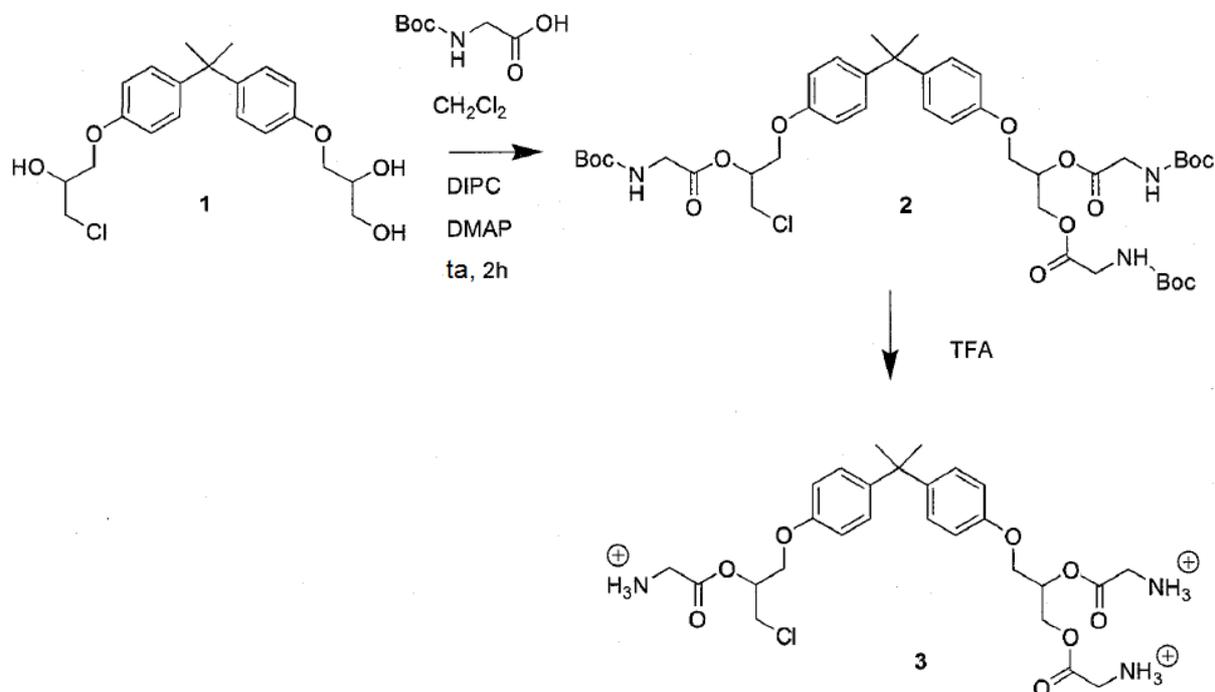
EDGBA racémico x 2HF (16)

20

25 A una solución de EDGBA *racémico* (60 mg, 0,176 mmol, 1 equiv) en tolueno anhidro (1,0 ml) se añadió solución 1 M de TBAF en THF (0,88 ml, 0,88 mmol, 5 equiv), y la mezcla se dejó en agitación a 80 °C durante 12 h. La mezcla se sometió a una cromatografía en columna de trayectoria corta (eluyente: diclorometano y 5 % de metanol en diclorometano) para eliminar TBAF. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice Sep pak 2 g (eluyente: acetato de etilo al 30 % en hexano) para proporcionar EDGBA *racémico* x 2HF (14 mg, 22 %) como una espuma incolora.

30 ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,09 (d, $J = 8,4$, 4H), 6,82 (d, $J = 8,8$, 4H), 5,40 (d, $J = 5,2$, 2H), 4,50 (ddd, $J = 47,6$, 9,6, 3,6, 2H), 4,39 (ddd, $J = 47,6$, 9,6, 3,6, 2H), 3,99 (dm, $J = 20,8$, 2H), 3,90 (m, 4H), 1,56 (s, 6H). ^{19}F RMN (282,4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -230,4 (td, $J = 50,4$, 22,2). CCF (5 % de metanol en diclorometano), R_f 0,38 (UV, *p*-anisaldehído).

Ejemplo 13

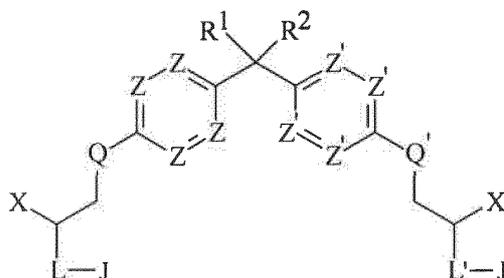
Síntesis del éster de triglicina 3 de EDGBA.HCl.H₂O

5 Parte experimental para la síntesis de la sal de TFA 3 de Tri-Gly-Edgba,HCL.H₂O (1): A una solución de
 10 EDGBA.HCL.H₂O (1) (8,80 mg, 0,02 mmol) en 1 ml de CH₂Cl₂ se añadió BOC-Gly-OH (30,8 mg, 0,18 mmol), DMAP
 (cantidad catalítica) y DIPC (0,03 ml, 0,18 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas y
 después se filtró. El filtrado se añadió a 2 ml de TFA, se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y después se
 concentró al vacío. El residuo se dividió entre EtOAc y agua y la capa acuosa se concentró, se secó, y después se
 pasó a través de una columna LH-20 (eluida con MeOH al 100 %) para dar un producto puro 3. Después de que el
 producto de sal de TFA se concentrase, se disolvió en 2 ml de MeOH, después se añadieron 2 ml de HCl 2N. La
 mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min, se concentró bajo una corriente de N₂, y luego se secó al
 vacío durante la noche para dar las sales de HCl.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



5

en la que:

- 10 X es CH₂F, CH₂Br, CH₂I, CH₂OG o CH₂OGOG';
 X' es H, CH₃, CH₂F, CH₂Cl, CH₂Br, CH₂I, CH₂OJ''', CH₂OG o CH₂OGOG';
 J, J' y J''' son cada uno independientemente H;
 L y L' son cada uno independientemente O;
 Q y Q' son cada uno independientemente O;
 15 Z y Z' son cada uno independientemente CH;
 R¹ y R² son cada uno independientemente H o un alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido;
 cada G y G' es independientemente un alquilo C₁-C₁₀ ramificado, no ramificado o cíclico aromático o cíclico no aromático, sustituido o no sustituido, saturado o no saturado; y
 20 en el que el sustituyente opcional se selecciona entre el grupo que consiste en: oxo, OJ''', COOH, R, OH, OR, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR, NR₂, CN, SH, SR, SO₃H, SO₃R, SO₂R, OSO₃R y NO₂, en donde R es un alquilo C₁-C₁₀ no sustituido;
 para su uso como medicamento.

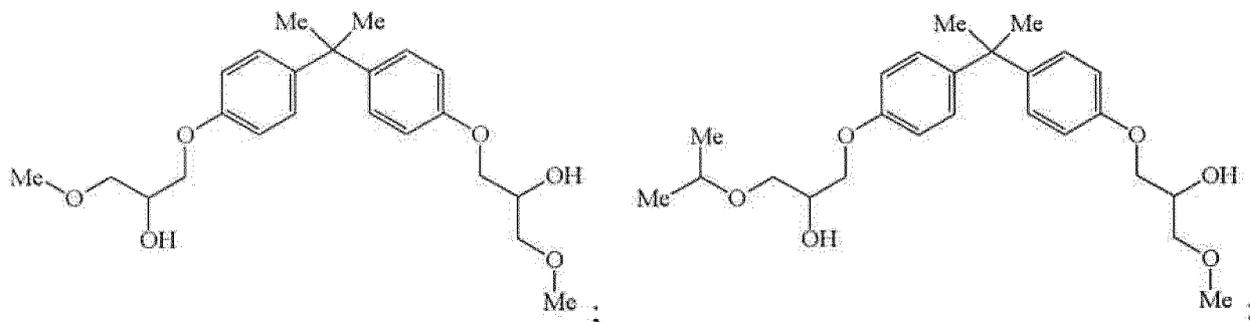
25 2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto modula la actividad del receptor de andrógenos (RA) en una célula de mamífero.

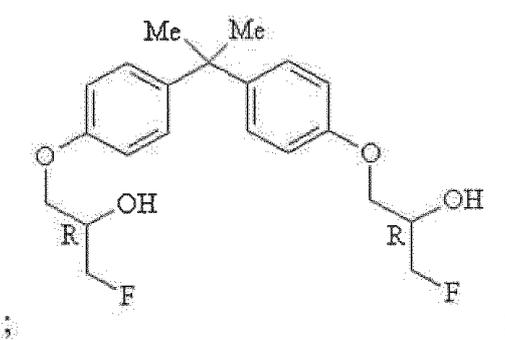
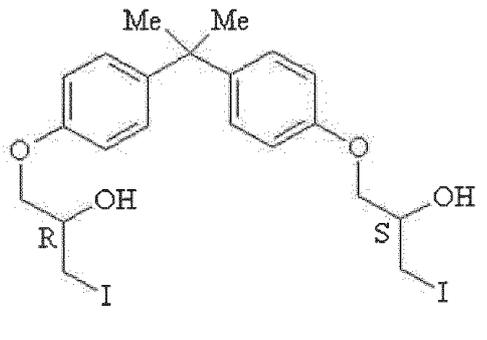
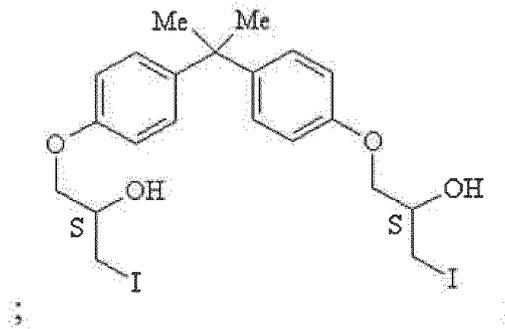
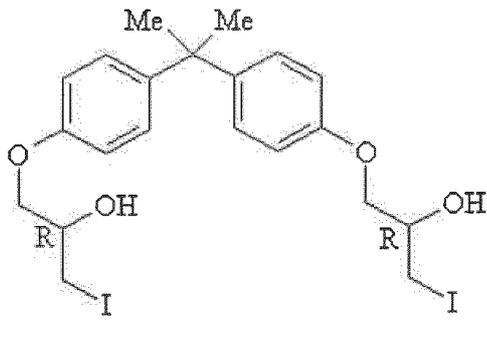
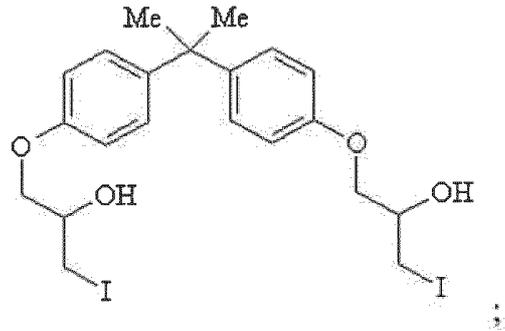
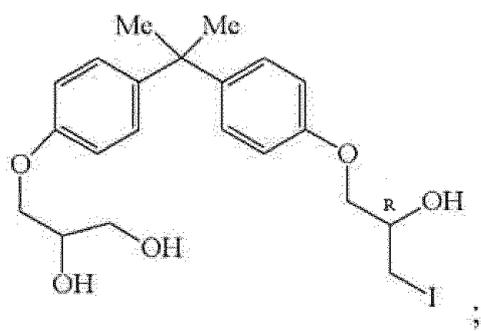
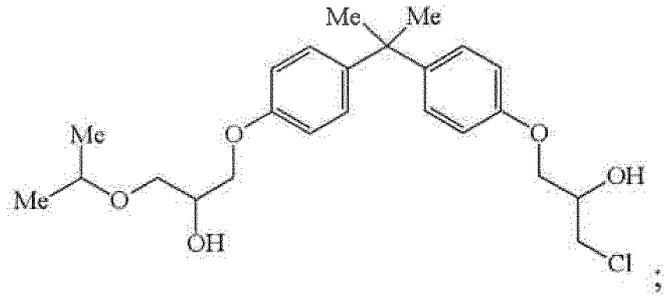
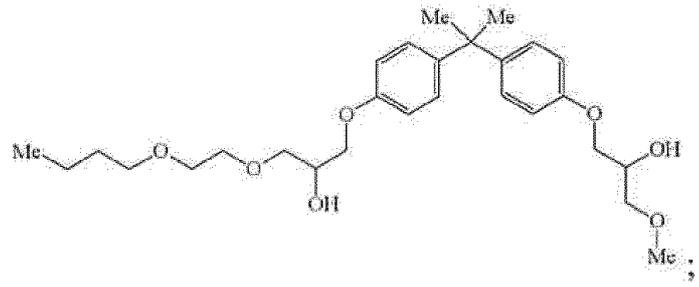
3. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que cada R¹ y R² es CH₃.

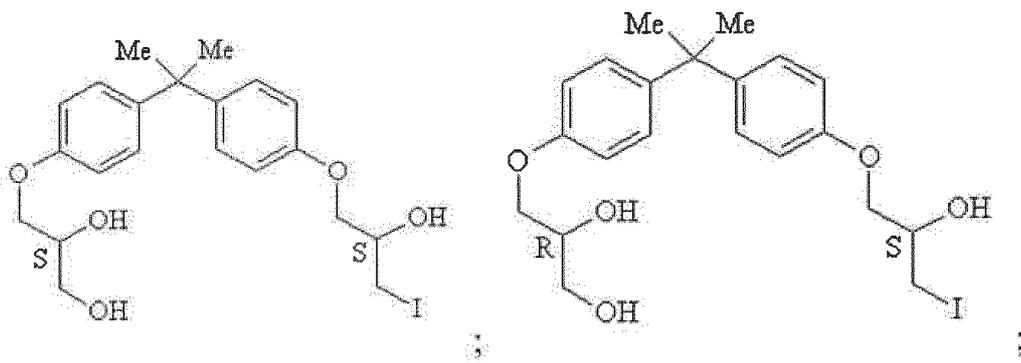
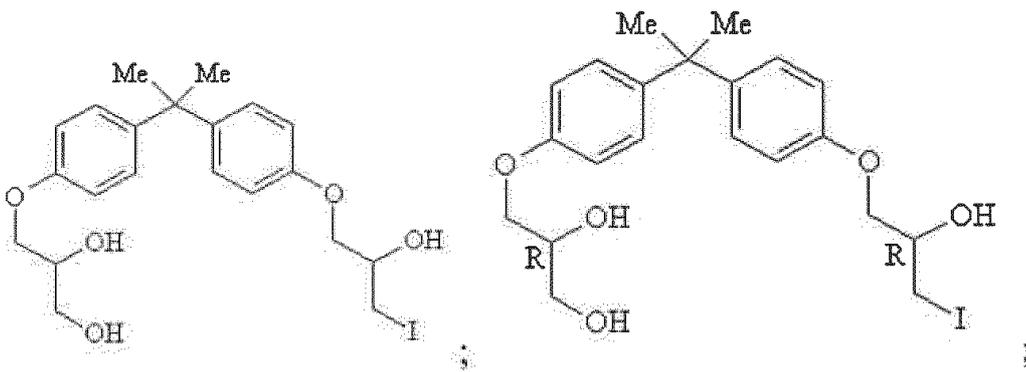
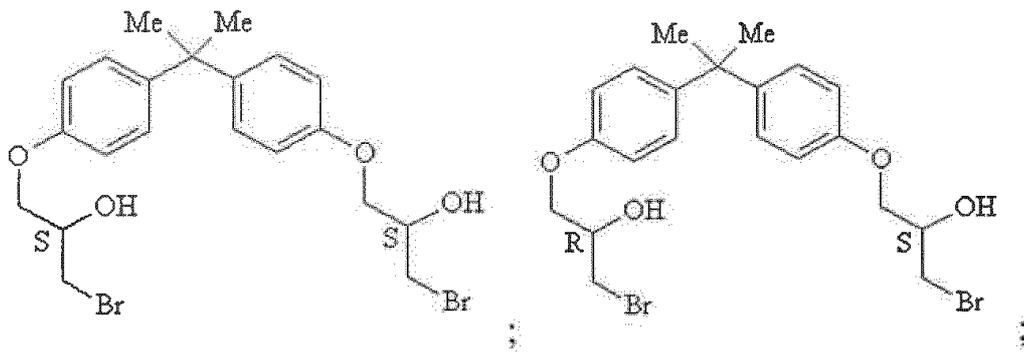
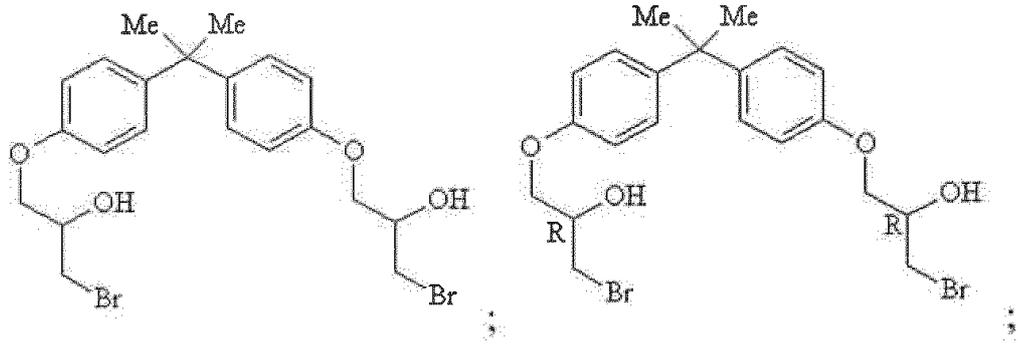
30 4. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que X es CH₂F, CH₂I, CH₂Br, CH₂OCH₃, CH₂O (isopropilo) o CH₂OC₂H₄OC₄H₉, preferentemente en el que X es CH₂F, CH₂Br o CH₂I.

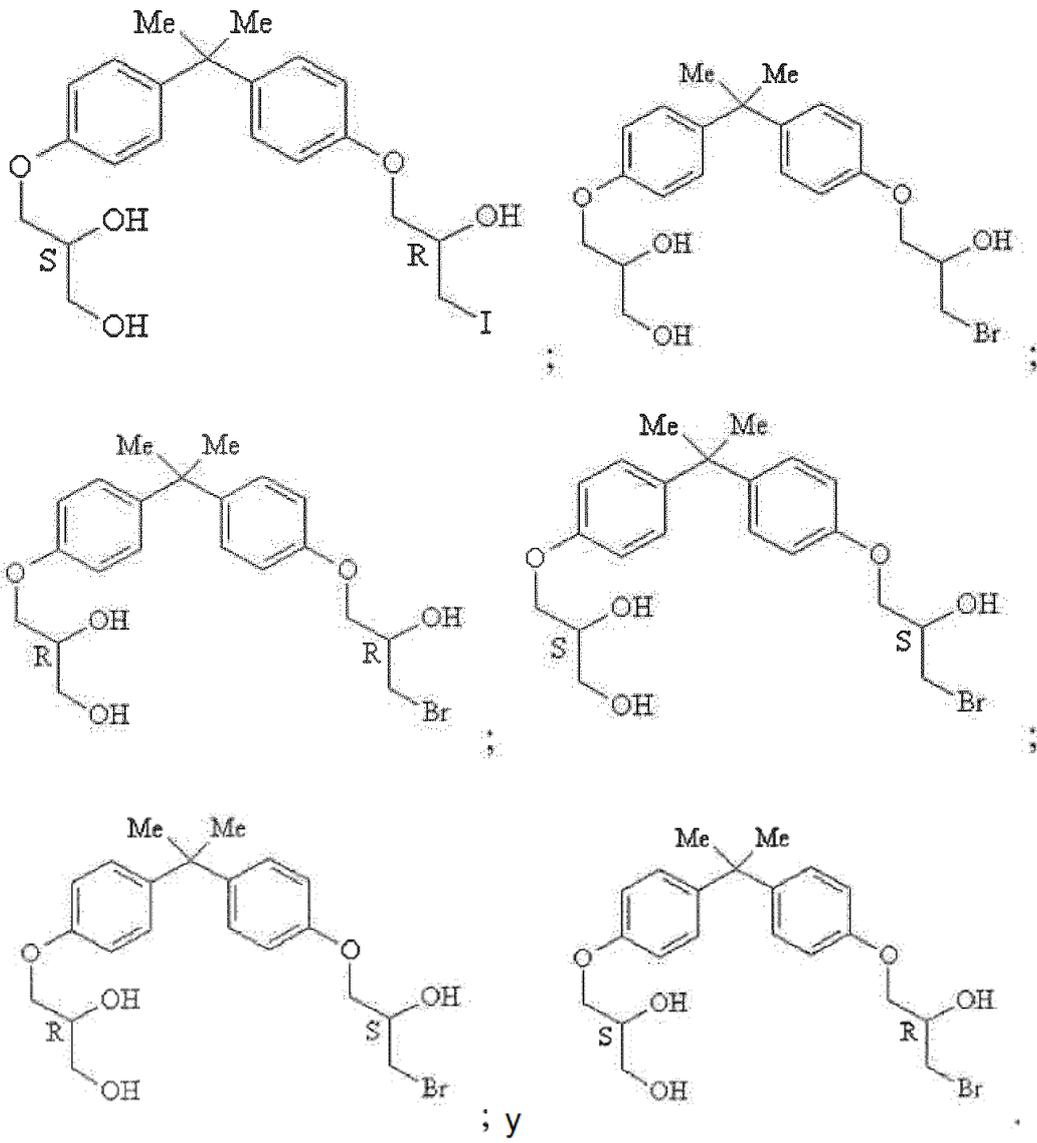
5. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que X' es CH₂Cl, CH₂F, CH₂I, CH₂Br, CH₂OH, CH₂OCH₃, CH₂O (isopropilo) o CH₂OC₂H₄OC₄H₉.

35 6. El compuesto para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el compuesto se selecciona entre uno o más de los siguientes:



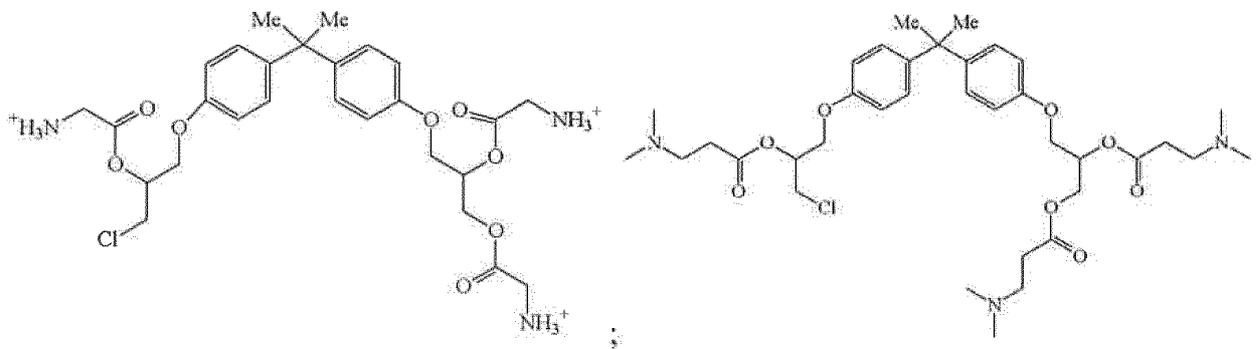




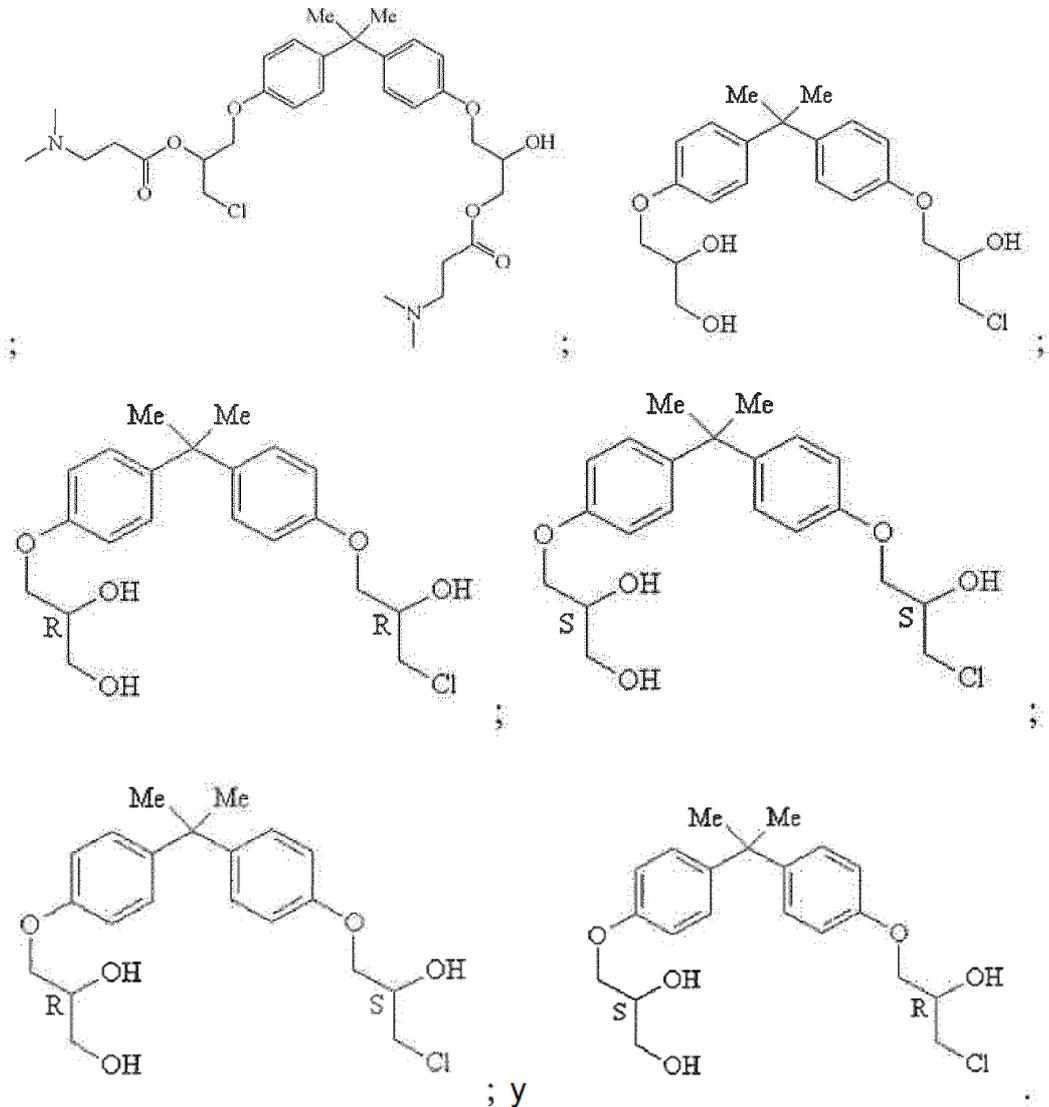


5

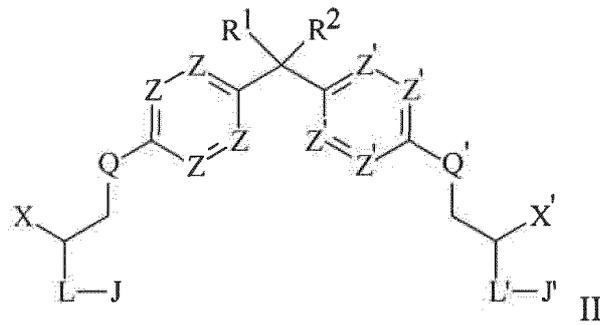
7. Un compuesto para su uso como medicamento, en donde el compuesto se selecciona entre uno o más de los siguientes:



10



- 5
8. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto modula la actividad del receptor de andrógenos en una célula de mamífero y la célula de mamífero es una célula humana.
- 10 9. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto inhibe la actividad del dominio N-terminal de RA.
10. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto modula *in vivo* la actividad del receptor de andrógenos.
- 15 11. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto es para el tratamiento de al menos una indicación seleccionada entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, pérdida de cabello, acné, hirsutismo, quistes ováricos, enfermedad del ovario poliquístico, pubertad precoz y degeneración macular relacionada con la edad.
- 20 12. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la actividad moduladora de RA es para el tratamiento del cáncer de próstata.
- 25 13. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en el que el cáncer de próstata es un cáncer de próstata independiente de andrógenos o en el que el cáncer de próstata es un cáncer de próstata dependiente de andrógenos.
14. Un compuesto que tiene una estructura de Fórmula II



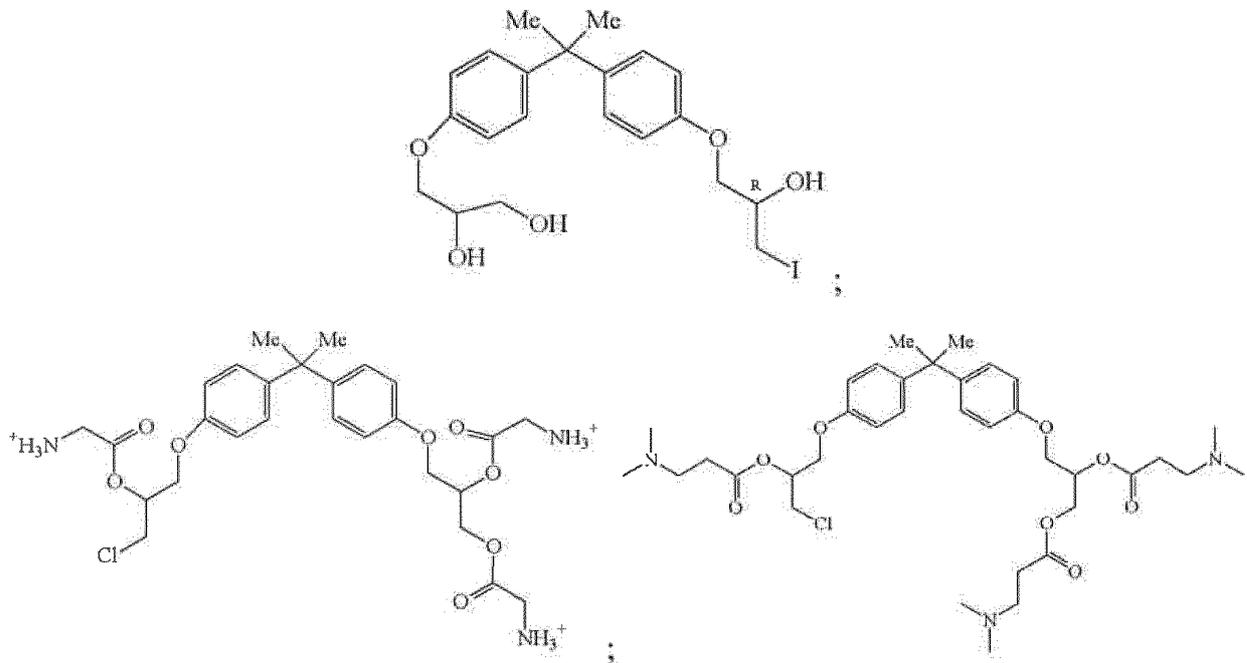
en la que

- 5 X es CH₂I, CH₂Br, CH₂F, CH₂OCH₃, CH₂O (isopropilo) o CH₂OC₂H₄OC₄H₉;
 X' es CH₂F, CH₂Cl o CH₂O (isopropilo);
 cada J, J' y J''' es independientemente H;
 cada L y L' es independientemente O;
 cada Q y Q' es independientemente O;
 10 cada Z y Z' es independientemente CH;
 R¹ y R² son cada uno independientemente H o un alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; y
 cada G y G' es independientemente un alquilo C₁-C₁₀ ramificado o no ramificado, cíclico no aromático, sustituido o no sustituido, saturado; y
 15 en el que el sustituyente opcional se selecciona entre el grupo que consiste en: oxo, OJ''', COOH, R, OH, OR, F, Cl, Br, I, NH₂, NHR, NR₂, CN, SH, SR, SO₃H, SO₃R, SO₂R, OSO₃R y NO₂, en donde R es un alquilo C₁-C₁₀ no sustituido.

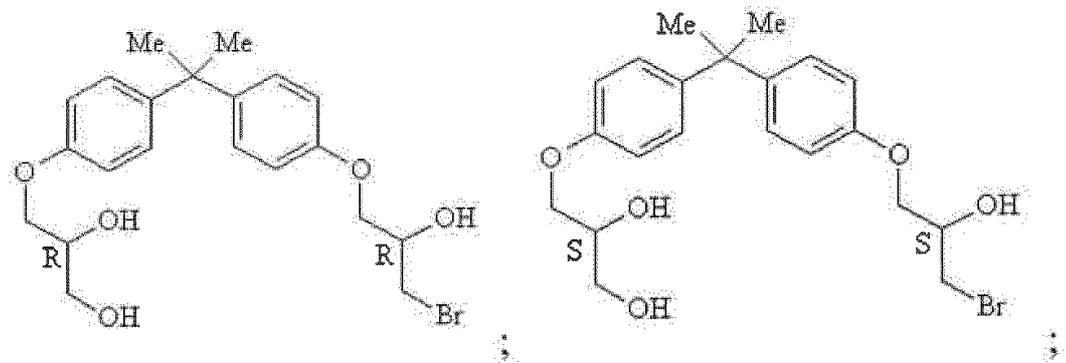
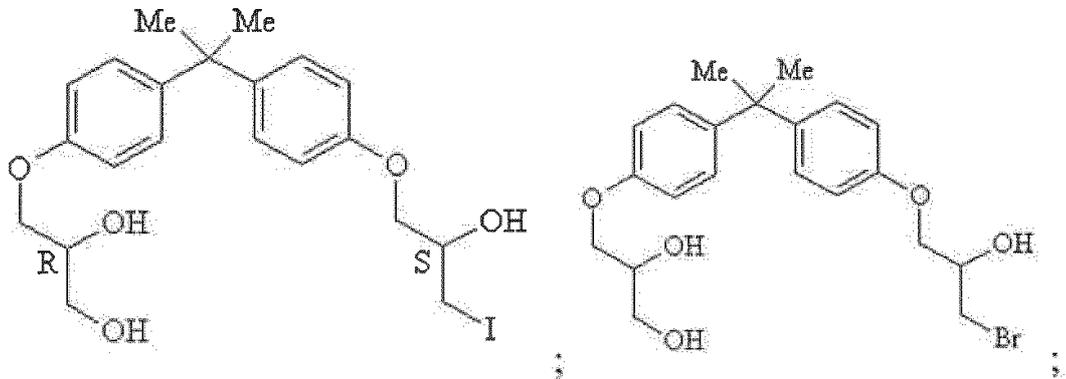
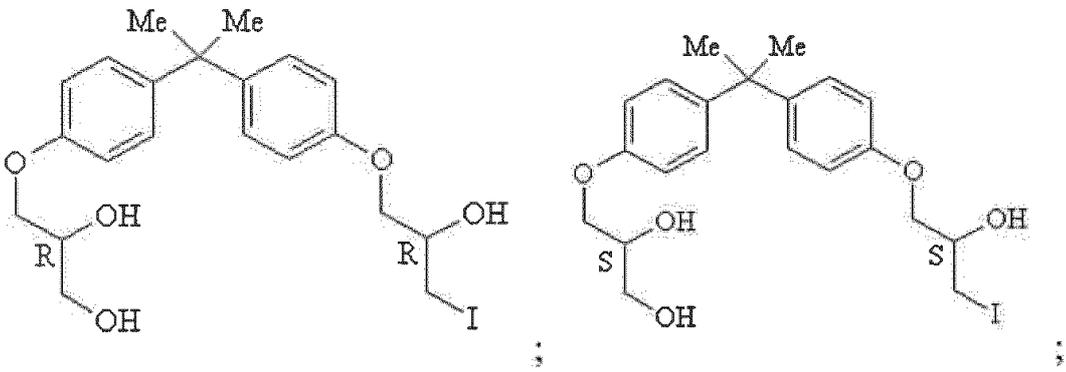
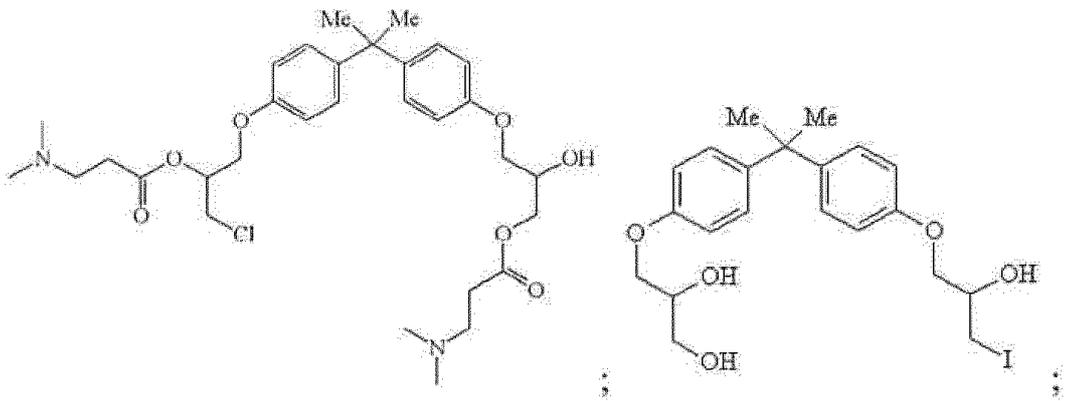
15. El compuesto de la reivindicación 14, en el que cada R¹ y R² es CH₃.

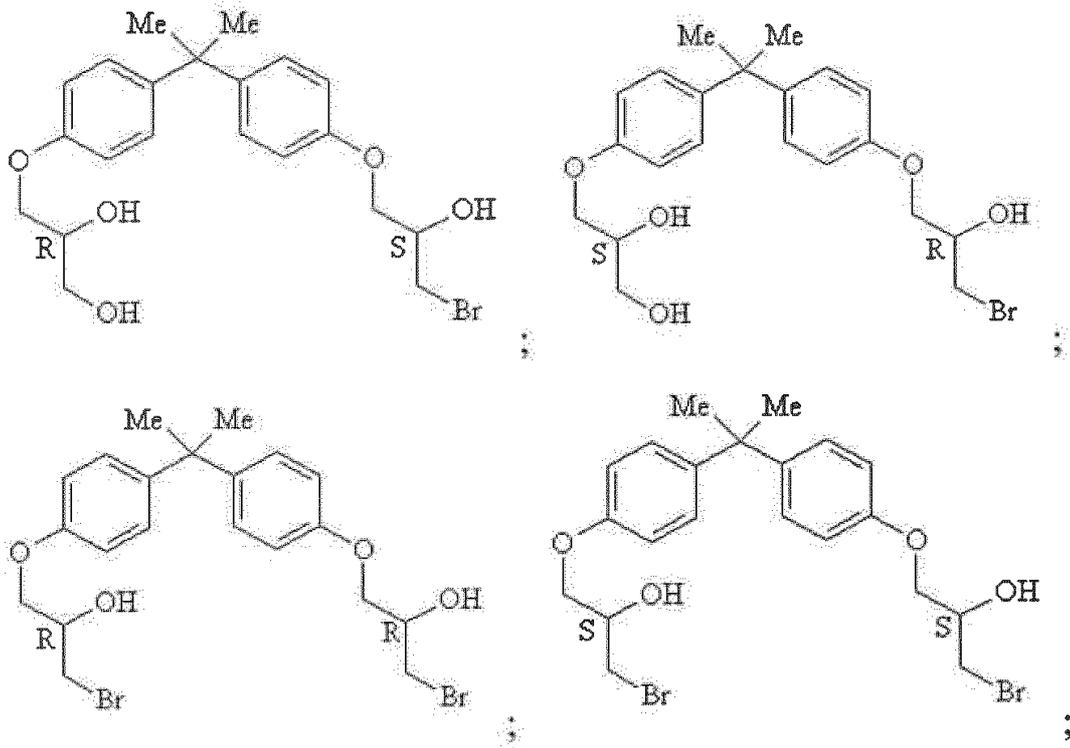
20

16. Un compuesto seleccionado entre uno o más de los siguientes:

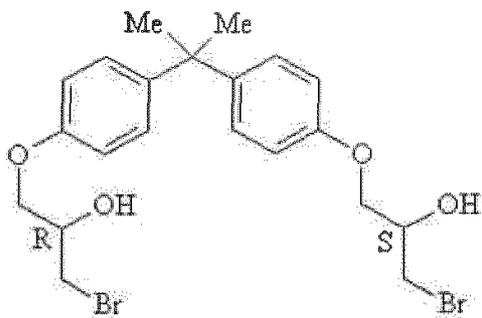


25

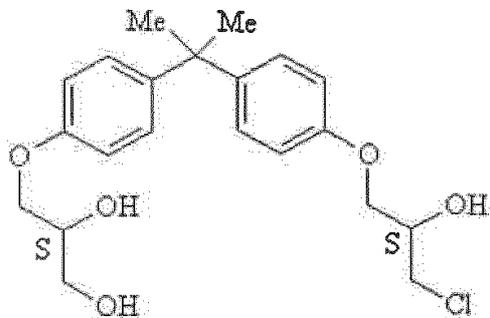




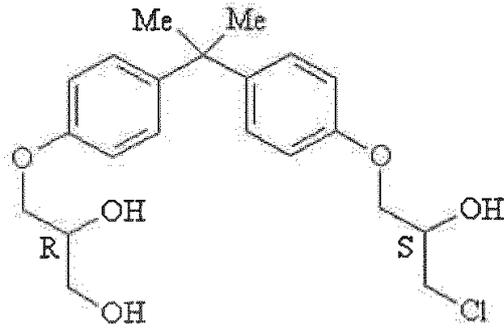
5 y



10 17. El compuesto



18. El compuesto



19. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

20. Un método para modular la actividad de RA *in vitro*, comprendiendo el método la administración a una célula de mamífero de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

FIGURA 1

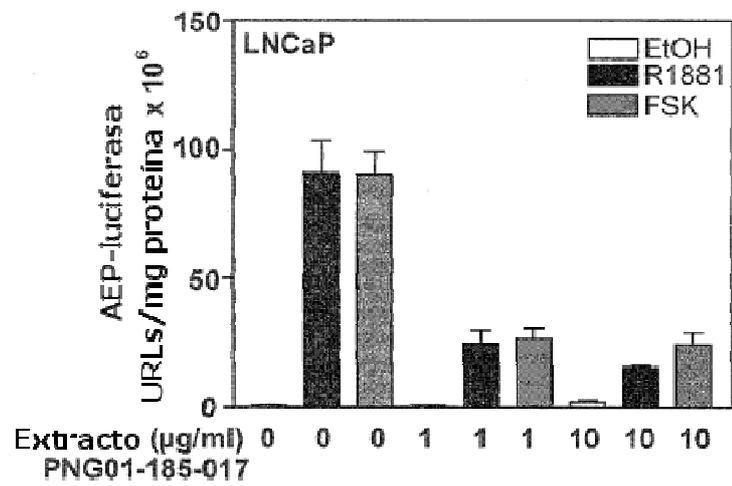


FIGURA 2

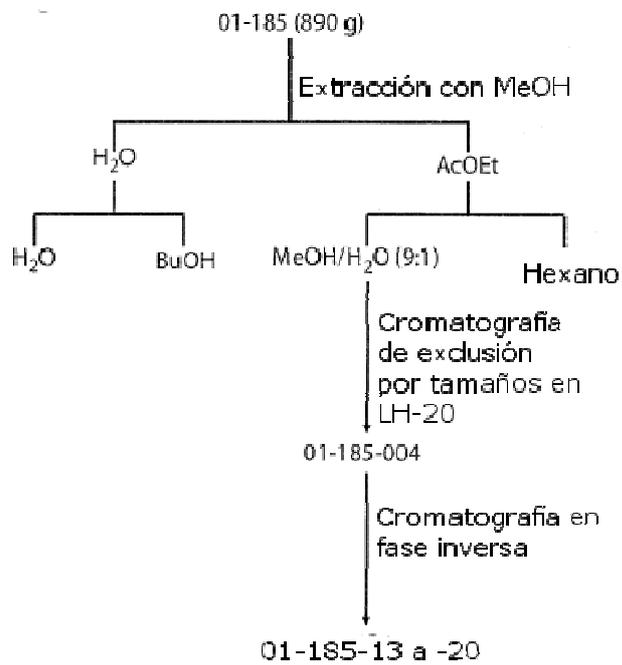


FIGURA 3

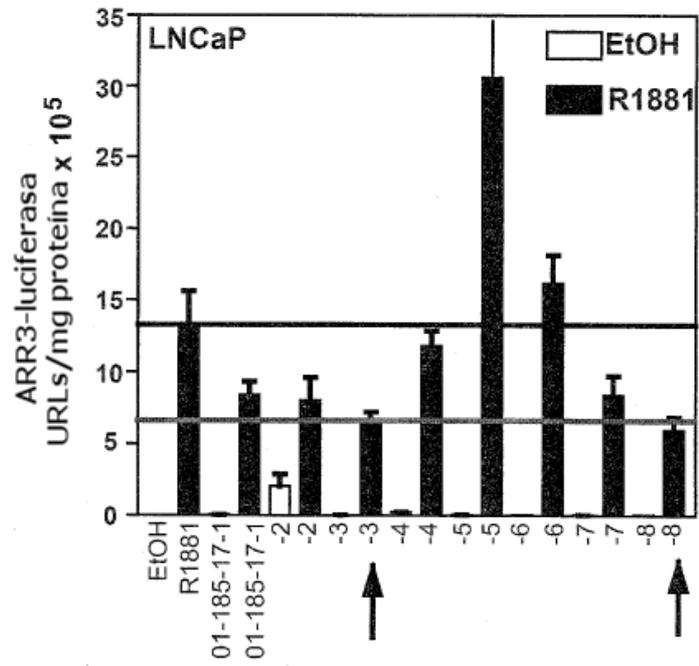


FIGURA 4

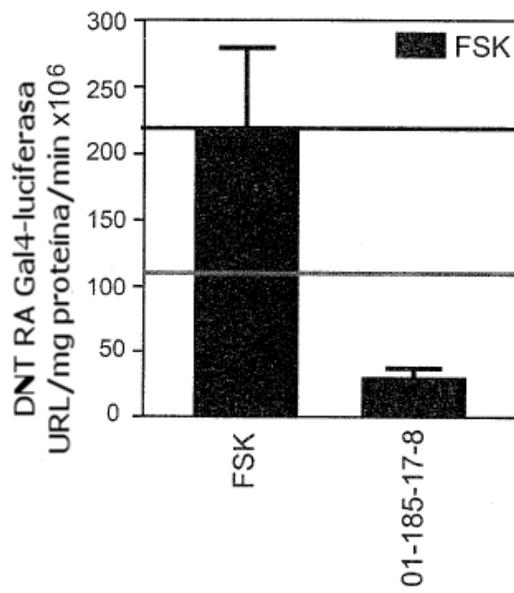


FIGURA 5

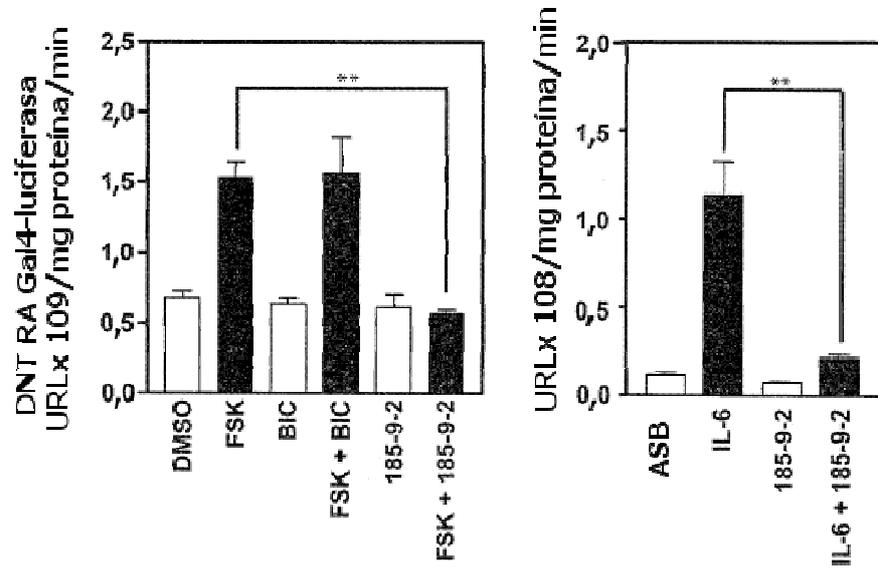
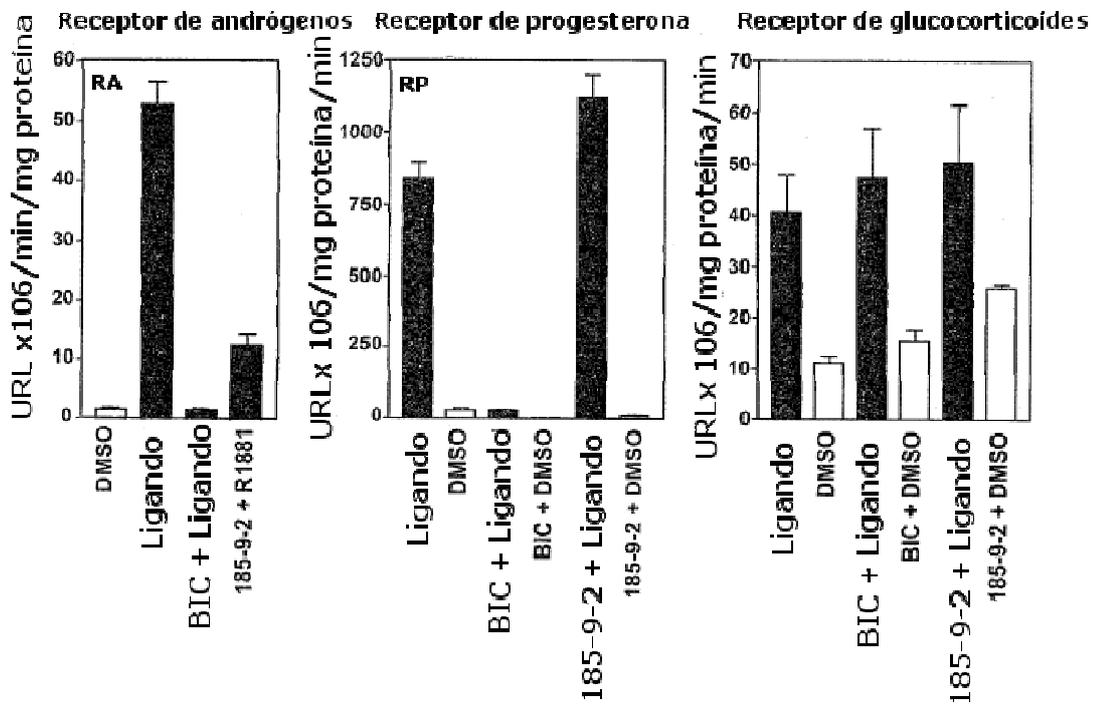


FIGURA 6



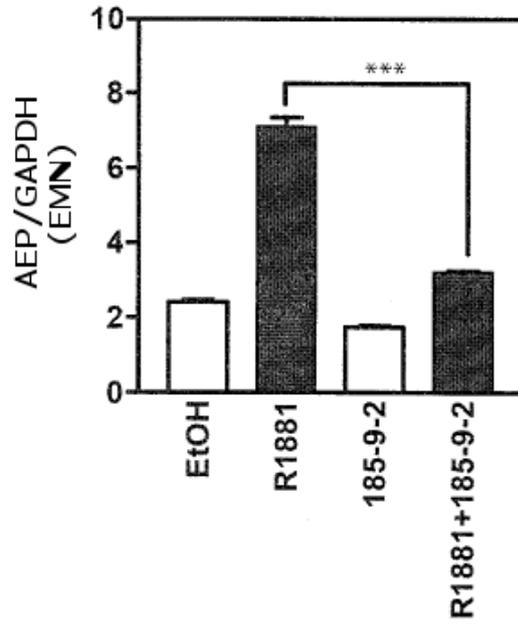


FIGURA 8

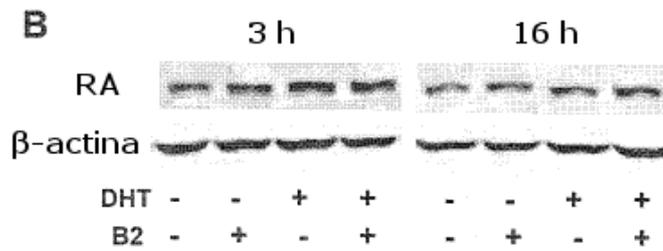
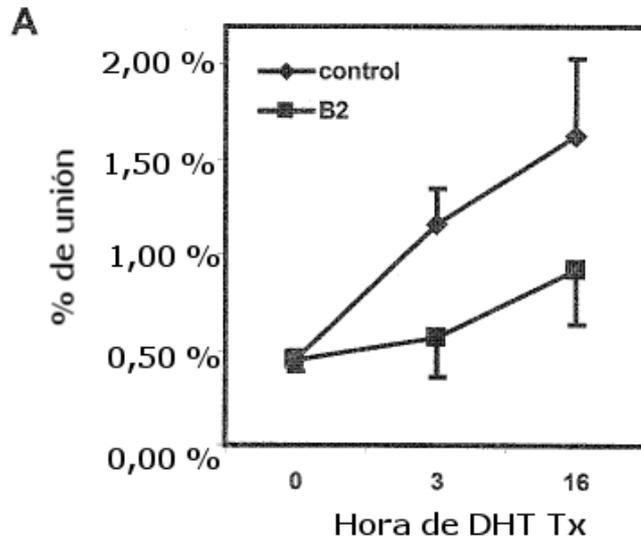


FIGURA 9

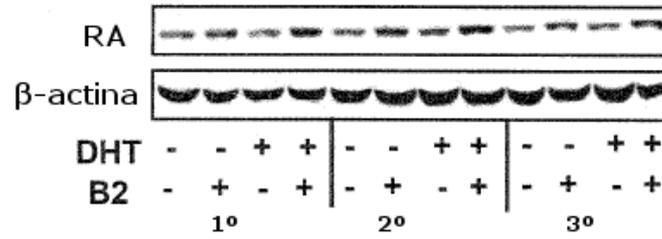


FIGURA 10

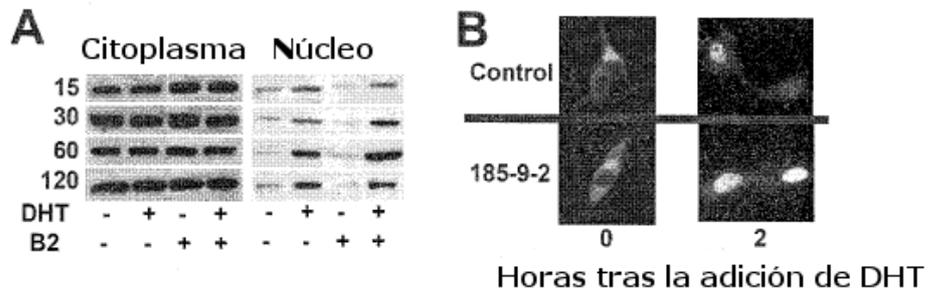


FIGURA 11

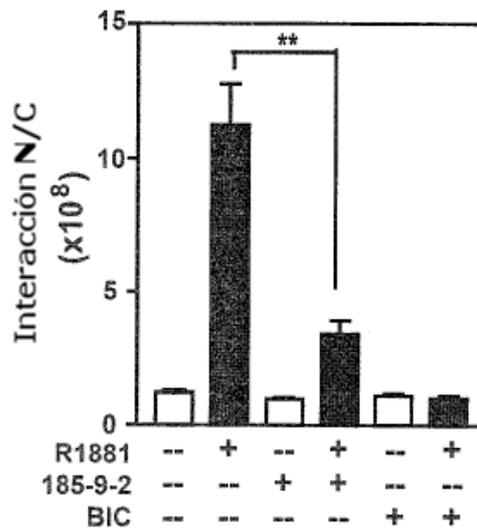


FIGURA 12

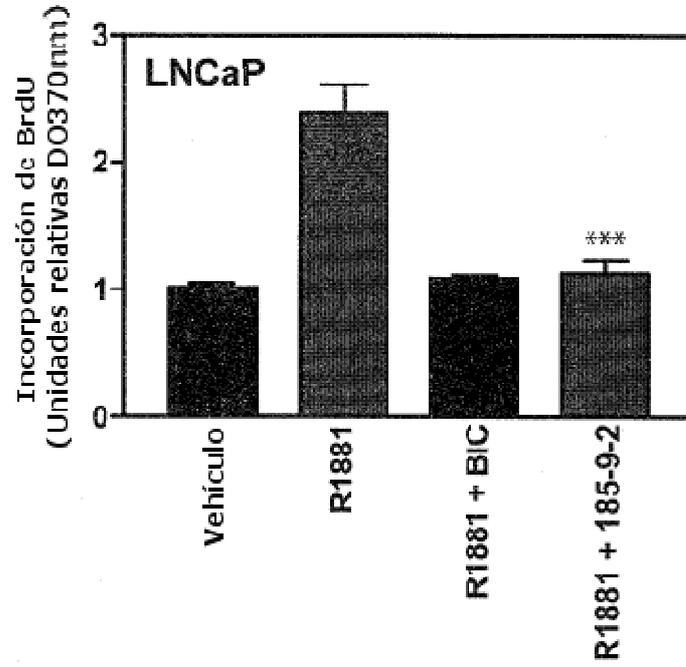


FIGURA 13

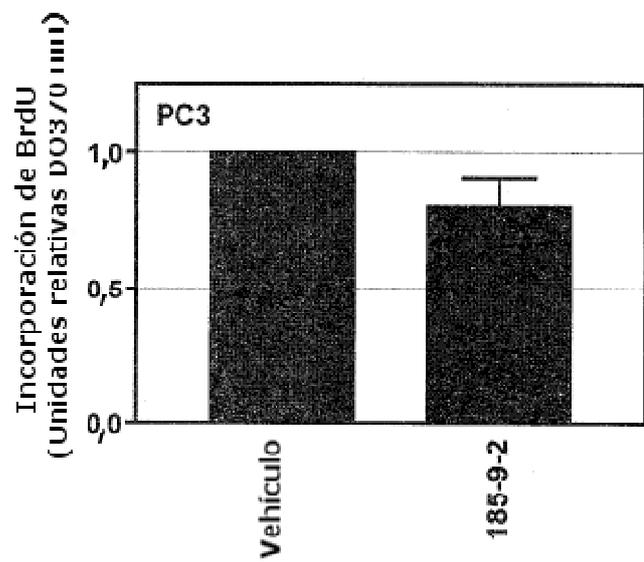


FIGURA 14

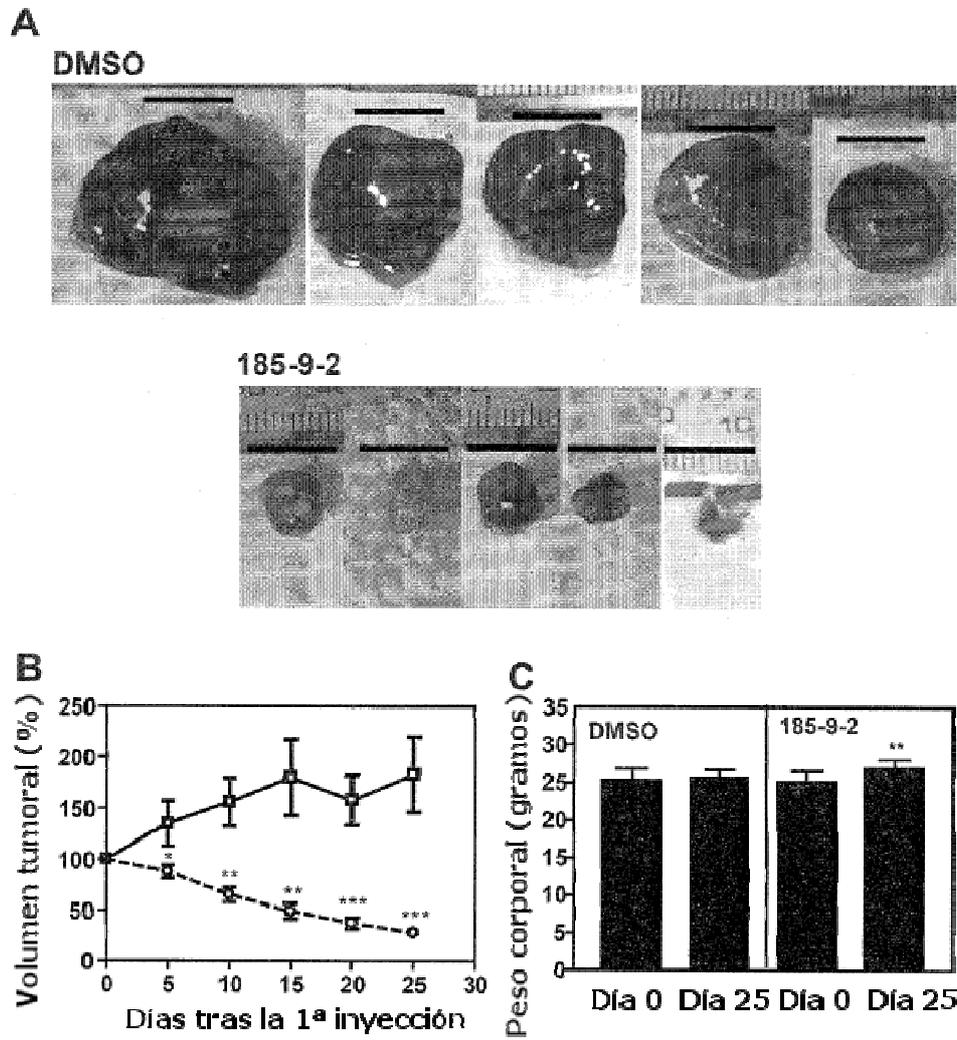


FIGURA 15

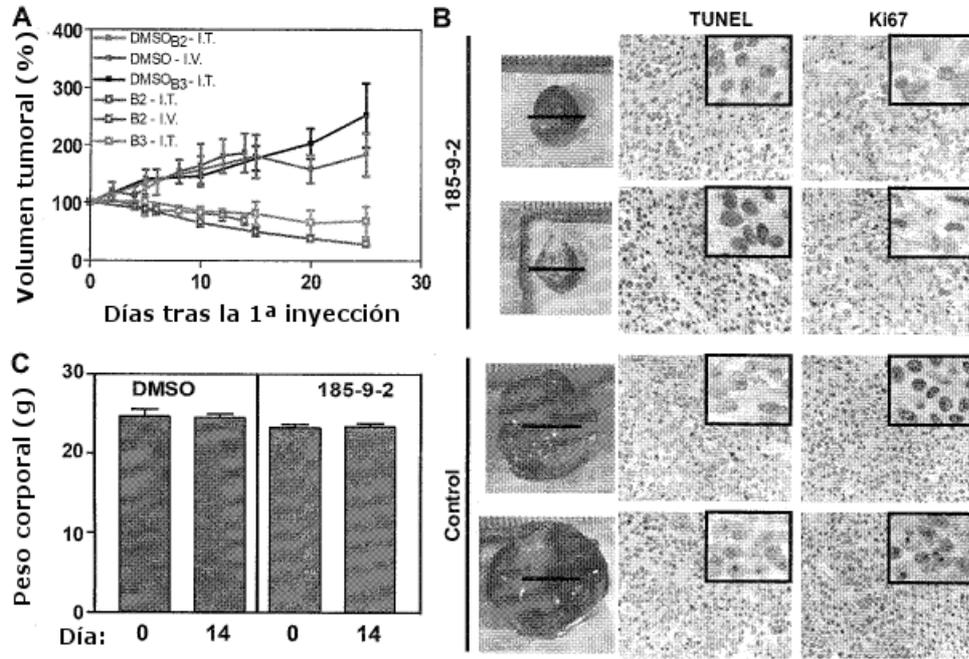


FIGURA 16

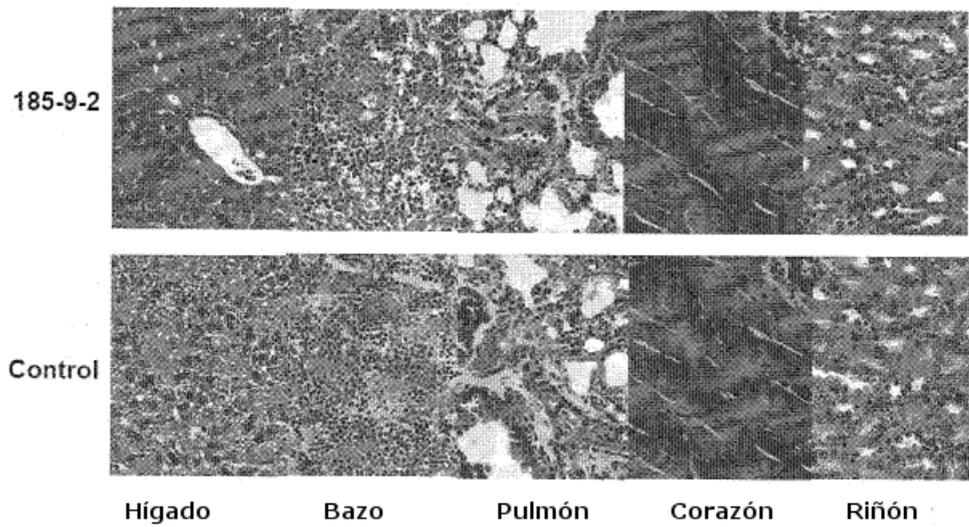


FIGURA 17

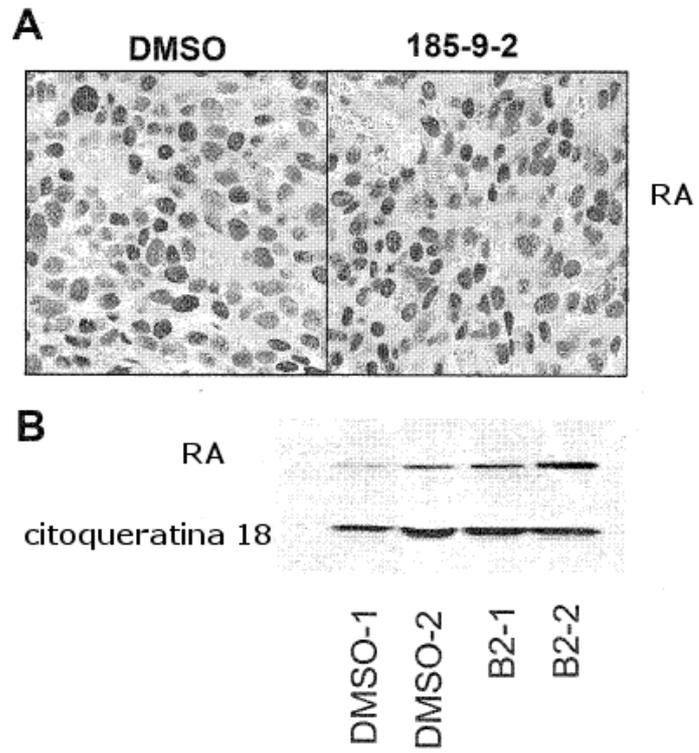


FIGURA 18

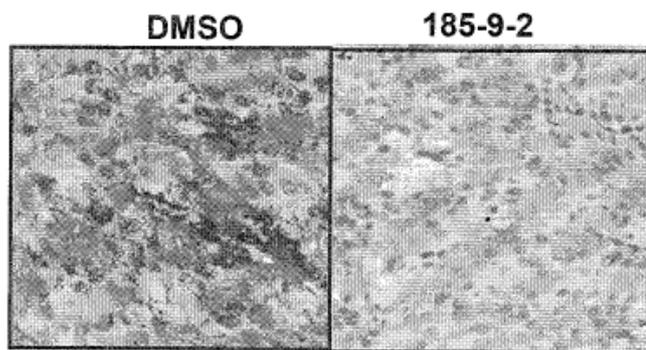


Figura 19

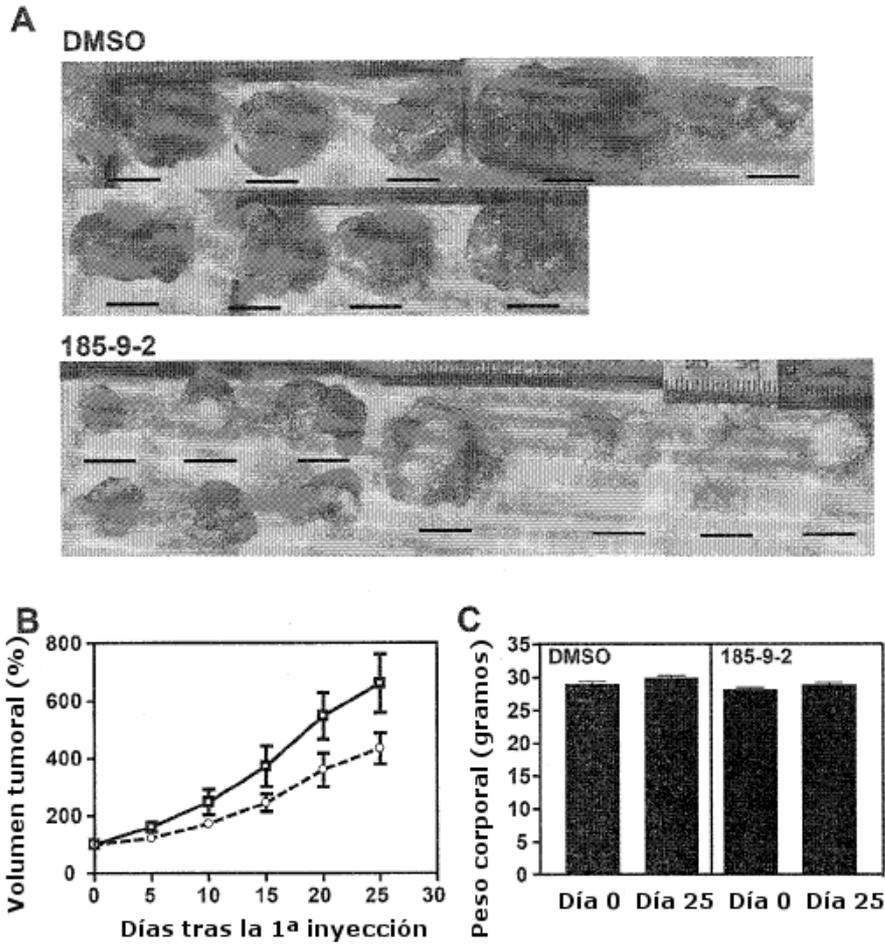


FIGURA 20

