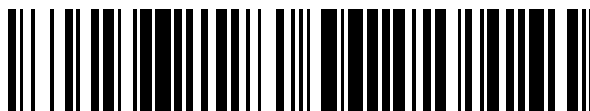


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 935**

51 Int. Cl.:

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/38 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013 PCT/US2013/066699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013 E 13848425 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2911660**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar trastornos médicos relacionados con estrógeno**

30 Prioridad:

24.10.2012 US 201261718035 P

05.04.2013 US 201361808971 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2020

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS (16.7%)**

**352 Henry Administration Building, 506 South
Wright Street**

Urbana, IL 61801, US;

THATCHER, GREG, R. (16.7%);

TONETTI, DEBRA (16.7%);

MOLLOY, MARY ELLEN (16.7%);

MICHALSEN, BRADLEY (16.7%) y

QIN, ZIHUI (16.7%)

72 Inventor/es:

THATCHER, GREGORY, R.;

TONETTI, DEBRA;

MOLLOY, MARY, ELLEN;

MICHALSEN, BRADLEY y

QIN, ZIHUI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 774 935 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

Composiciones y métodos para tratar trastornos médicos relacionados con estrógeno

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento de trastornos médicos relacionados con estrógeno tales como cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades del sistema cardiovascular.

Antecedentes

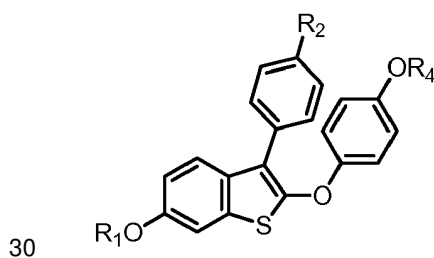
- 10 El modulador selectivo de receptor de estrógeno (MSRE) tamoxifeno (TAM) es la terapia endocrina más ampliamente prescrita para el tratamiento y prevención del cáncer de mama. El desarrollo de resistencia al TAM, ya sea *de novo* o adquirida, limita su eficacia clínica y conduce a la progresión de la enfermedad. Antes de la introducción del TAM, los pacientes con cáncer de mama recibían tratamiento con altas dosis de 17β-estradiol (E2) o dietilestilbestrol (DES). Aunque se observaban tasas de respuesta similares (9, 10), el tratamiento con TAM se convirtió en el tratamiento predominante, debido a la menor incidencia de efectos secundarios.

- 15 La proteína cinasa C-alfa (PKCα) pertenece a una familia de proteína cinasas de serina/treonina (1, 2). La expresión de la PKCα está asociada al desenlace de la enfermedad para pacientes de cáncer de mama en terapia endocrina. Se ha asociado a la expresión de PKCα una menor duración de la respuesta a la terapia endocrina (3), y los pacientes cuyos tumores primarios sobreexpresaban PKCα tenían más probabilidades de sufrir recurrencia de la enfermedad cuando se les trataba con TAM (4). La positividad con respecto a PKCα también está asociada con una escasa supervivencia de los pacientes y con la agresividad del cáncer de mama (5).

- 20 El documento WO-A98/56812 describe derivados de 2-arilbenzotiofeno como ligandos de receptor de estrógeno que se unen a los ligandos de receptor de estrógeno, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la deficiencia de estrógeno. El documento EP0905132 (A1) describe compuestos de benzotiofeno que son útiles para inhibir las diversas afecciones médicas asociadas con enfermedades dependientes de estrógeno.

Compendio

- 25 En la presente memoria se provee una composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno en un sujeto que necesita tal tratamiento, donde el trastorno médico relacionado con estrógeno se selecciona del grupo consistente en cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades del sistema cardiovascular, donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I-vii)



(I-vii)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

donde

R₁ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

- 35 R₂ se selecciona del grupo consistente en halo y -OR₃;

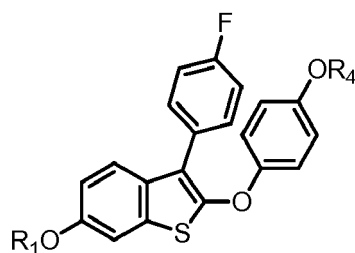
R₃ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R₄ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R^a se selecciona en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en -OH y alquilo; y

- 40 R^{x1}, R^{y1} y R^{z1} se seleccionan en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en hidrógeno y un catión farmacéuticamente aceptable.

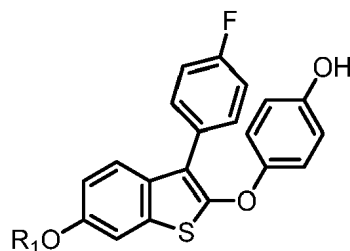
En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (I-vii) tiene la fórmula (I-viii)



(I-viii)

donde R₁ y R₄ son como se han definido antes.

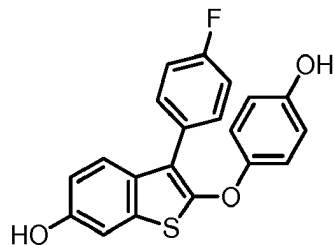
En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (I-vii) tiene la fórmula (I-ix)



(I-ix)

donde R₁ es como se ha definido antes. En ciertas realizaciones, R₁ se selecciona de hidrógeno y alquilo (p. ej., alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆).

10 En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (I-vii) tiene la fórmula (I-x), también denominada TTC-352 en la presente memoria,



(I-x).

En ciertas realizaciones, el compuesto de fórmula (I-vii) se selecciona del grupo consistente en:

3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol (TTC-352); y

15 4-((3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)oxi)fenol (monometoxil-TTC-352);

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

20 Cuando el trastorno médico relacionado con estrógeno es una enfermedad del sistema nervioso central, entonces las enfermedades del sistema nervioso central pueden seleccionarse del grupo consistente en enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve. Cuando el trastorno médico relacionado con estrógeno es cáncer, el cáncer puede seleccionarse del grupo consistente en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama resistente a tamoxifeno o un cáncer de mama triple negativo.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra el efecto de BTC (es decir, 2-(4-hidroxifenil)benzo[b]tiofen-6-ol) y TTC-352 (es decir, 3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol) sobre la proliferación de células T47D:A18/neo y T47D:A18/PKCα *in vitro*. A) Estructura de BTC. B) Estructura de TTC-352. Efecto del tratamiento con BTC sobre el crecimiento de C) células T47D:A18/neo y D) células T47D:A18/PKCα. Efecto del tratamiento con TTC-352 sobre el crecimiento de E) células T47D:A18/neo y F) células T47D:A18/PKCα. Los ensayos de ADN se realizaron como se describe en el

apartado Materiales y métodos. Las gráficas muestran la media \pm ETM (error típico de la media) y son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 2 muestra la inhibición por BTC y TTC-352 de la formación de colonias de T47D:A18/PKC α en MATRIGEL 3D. Las colonias se formaron como se describe en Materiales y Métodos, y se sometieron a tratamiento durante 10 días (testigo [DMSO al 0,1%], E2 1 nM, BTC 100 nM, TTC-352 100 nM). *, $P < 0,05$ frente a DMSO. La gráfica muestra la media \pm ETM (error típico de la media) de 3 experimentos independientes. A) T47D:A18/neo. B) T47D:A18/PKC α .

La Figura 3 muestra la inducción por BTC y TTC-352 de actividad transcripcional de receptor α de estrógeno (RE- α) en líneas celulares T47D:A18/neo y T47D:A18/PKC α . Líneas celulares A) T47D:A18/neo y B) T47D:A18/PKC α . Los datos se expresan normalizados con respecto a E2 (100%). *, $P < 0,05$ frente a DMSO. La gráfica muestra la media \pm ETM de 3 experimentos independientes.

La Figura 4 muestra la inhibición por BTC y TTC-352 de tumores por xenoinjerto T47D:A18/PKC α . A) El tratamiento con BTC y TTC-352 origina la regresión de tumores T47D:A18/PKC α . La gráfica muestra el porcentaje de regresión de tumor (100% \sim 0,5 cm²). La línea punteada indica cuándo se concluyó el tratamiento. La flecha indica de dónde se obtuvieron los tumores de (B). *, $P < 0,05$ frente al testigo. La gráfica muestra la media \pm ETM. B) Localización de RE- α en tumores T47D:A18/PKC α mediante tinción por inmunofluorescencia. Aumento total: 630X.

La Figura 5 muestra que ni BTC ni TTC-352 tienen efecto sobre el crecimiento tumoral de T47D:A18/neo, el peso corporal o el peso uterinos de ratones ovariectomizados. A) Ni BTC ni TTC-352 originan crecimiento de tumores T47D:A18/neo. B) Pesos corporales de los ratones tratados en (A). C) Pesos uterinos de los ratones de (A). Los pesos se expresan como peso uterino (mg)/peso corporal (g). *, $P < 0,05$ frente al testigo. Las gráficas muestran la media \pm ETM.

La Figura 6 muestra cromatogramas de LC-MS/MS con MRM de BTC y de dansil-BTC. A) Cromatograma de iones reconstruido para la transición MRM de m/z 241 \rightarrow 208 de BTC estándar (100 ng/mL). B) Cromatograma de iones reconstruido para la transición MRM m/z 709 \rightarrow 171 de dansil-BTC estándar (100 ng/mL).

La Figura 7 muestra la síntesis de estándares de dansil-BTC y de dansil-Br-BTC. Reactivos y condiciones: (a) N-Bromoacetamida, DCM, EtOH, temp. amb.; (b) BBr₃, DCM seco, 0 °C; (c) Cloruro de dansilo, TEA, DCM, 60 °C.

La Figura 8 muestra una curva de calibración para BTC. Los patrones de calibración se prepararon añadiendo solución de trabajo y patrón interno (20 ng/mL) a un blanco de plasma de ratón, para proporcionar concentraciones plasmáticas finales de BTC de 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 ng/mL.

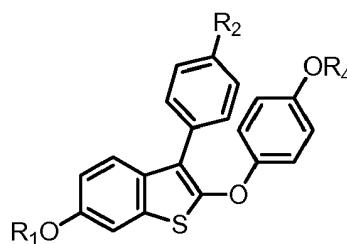
La Figura 9 muestra cromatogramas LC-MS/MS con MRM de dansil-BTC y el patrón interno (dansil-Br-BTC). A) Cromatograma de iones totales. B) BTC (25 g/mL) en plasma de ratón. C) Patrón interno Br-BTC (20 ng/mL).

La Figura 10 muestra el perfil de concentración plasmática frente a tiempo para BTC después de la administración de una dosis oral única de 10 mg de BTC/kg, a ratones. Cada punto de datos representa el valor medio \pm DT (desviación típica) ($n = 3$).

La Figura 11 muestra que el tratamiento con TTC-352 (es decir, el TTC-352) origina la regresión de tumores por xenoinjerto resistentes a TAM sin los efectos secundarios asociados a otros tratamientos. A) Estructura de TTC-352. Tumores B) T47D/Tam1 y C) T47D/PKC α tratados con 1,5 mg de TTC-352/día p. o. En el estudio para T47D/PKC α se incluyó el MSRE raloxifeno (1,5 mg/día). La línea de puntos representa el inicio del tratamiento. D) Pesos uterinos de ratones tratados con E2 (cápsula de 1 cm), TAM (1,5 mg/día), raloxifeno (1,5 mg/día) y TTC-352 (1,5 mg/día). Sirvieron como testigos positivos E2 y TAM. Sirvió como testigo negativo raloxifeno. * $P < 0,05$.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento de trastornos médicos relacionados con estrógeno en un sujeto que necesita tal tratamiento, donde el trastorno médico relacionado con estrógeno se selecciona del grupo consistente en cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve) y enfermedades del sistema cardiovascular, comprendiendo dicha composición una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I-vii)



(I-vii)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

donde

5 R₁ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R₂ se selecciona del grupo consistente en halo y -OR₃;

R₃ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R₄ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R^a se selecciona en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en -OH y alquilo; y

10 R^{x1}, R^{y1} y R^{z1} se seleccionan en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en hidrógeno y un catión farmacéuticamente aceptable.

El cáncer puede seleccionarse del grupo consistente en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama resistente a tamoxifeno o un cáncer de mama triple negativo.

15 1. Definiciones

Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto ordinario en la materia. En caso de conflicto prevalecerá la presente memoria, incluidas las definiciones. Se describen a continuación métodos y materiales preferidos, pero en la práctica o la prueba de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en la presente memoria son meramente ilustrativos.

Se pretende que, en la presente memoria, los términos "comprende" o "comprenden", "incluye" o "incluyen", "tiene" o "tienen", "puede" o "pueden", "contiene" o "contienen", y sus variantes, sean frases, términos o palabras transicionales abiertos, que no excluyan la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas singulares "un", "una", "uno" y "el", "la", "le", "lo" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. La presente descripción también contempla otras realizaciones "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" las realizaciones o elementos presentados en la presente memoria, estén o no explícitamente expuestas.

En la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo

En la presente memoria, el término "cicloalquilo" se refiere a un sistema anular carbocíclico que contiene de tres a diez átomos de carbono, cero heteroátomos y cero enlaces dobles. Los ejemplos representativos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo y ciclodecilo. Los grupos cicloalquilo de esta invención pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 sustituyentes alquilo.

En la presente memoria, el término "halógeno" significa Cl, Br, I o F.

La expresión "catión farmacéuticamente aceptable" se refiere a una molécula, o átomo, cargado positivamente que está equilibrado por una molécula, o átomo, cargado negativamente. Los cationes farmacéuticamente aceptables representativos incluyen sales metálicas tales como, por ejemplo, sales de aluminio, de calcio, de cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de zinc, así como cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina que incluyen, pero sin limitación, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, amina sustituida presente en la naturaleza, aminas cíclicas, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletildiamina, dietilamina,

2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, procaína, purinas, teobromina, tripropilamina, trometamina y trietanolamina.

En la presente memoria, el término "trifluorometilo" significa un grupo -CF₃.

- 5 En la presente memoria, en las enumeraciones de intervalos numéricos se contempla explícitamente cada número intermedio de los mismos, con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo 6-9 se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0 se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

2. Compuestos de fórmula (I-vii)

- 10 Un compuesto de fórmula (I-vii) puede incluir 3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol. Al 3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol también se le puede denominar TTC-352 o TTC-352. En la Figura 1B se muestra la estructura química del TTC-352. Un compuesto de fórmula (I-vii) puede incluir 4-((3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)oxi)fenol. Al 4-((3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)oxi)fenol también se le puede denominar monometoxil-TTC-352.

- 15 Los compuestos de fórmula (I-vii) pueden existir como una sal farmacéuticamente aceptable. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales o zwitteriones de los compuestos que sean solubles o dispersables en agua o en aceite, adecuadas para el tratamiento de trastornos sin toxicidad, irritación y respuesta alérgica indebidas, proporcionadas a una relación beneficio/riesgo razonable y eficaces para su uso previsto. Las sales se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos, o por separado haciendo reaccionar un grupo amino de los compuestos con un ácido adecuado. Por ejemplo, se puede disolver un compuesto en un disolvente adecuado tal como, pero sin limitación, metanol y agua, y tratarlo con al menos un equivalente de un ácido tal como el ácido clorhídrico. Se puede separar por precipitación la sal resultante, y aislarla por filtración y secarla bajo presión reducida. Como alternativa, se pueden eliminar bajo presión reducida el disolvente y el exceso de ácido, para proporcionar una sal. Las sales representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, isetionato, fumarato, lactato, maleato, metanosulfonato, naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, oxalato, maleato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, glutamato, para-toluenosulfonato, undecanoato, hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato y fosfato. Los grupos amino de los compuestos también pueden estar cuaternizados con cloruros, bromuros y yoduros de alquilo tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, laurilo, miristilo y estearilo.

- Las sales de adición básicas se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los presentes compuestos, por reacción de un grupo carboxilo con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico tal como litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o aluminio, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Se consideran dentro del alcance de la presente invención sales de amina cuaternaria derivadas de metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-etilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina y N,N'-dibenciletilendiamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

3. Composiciones farmacéuticas

- 40 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto (tal como un paciente, que puede ser humano o no humano).

- Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" del agente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una persona experta en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, y esta puede variar en función de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la composición para generar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella para la cual los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que la dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa más temprana de esta, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

- Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) puede ir de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 950 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 900 mg/kg, de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 850 mg/kg, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 800 mg/kg, de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 700 mg/kg, de aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 650 mg/kg, de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, de

aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 550 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 450 mg/kg, de aproximadamente 60 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, de aproximadamente 65 mg/kg a aproximadamente 350 mg/kg, de aproximadamente 70 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 80 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 85 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg y de aproximadamente 90 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

En otro ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II) puede ir de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 950 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 900 mg/kg, de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 850 mg/kg, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 800 mg/kg, de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 700 mg/kg, de aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 650 mg/kg, de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, de aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 550 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 450 mg/kg, de aproximadamente 60 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, de aproximadamente 65 mg/kg a aproximadamente 350 mg/kg, de aproximadamente 70 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 80 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 85 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg y de aproximadamente 90 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos farmacéuticamente aceptables. En la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación de cualquier tipo no tóxico, inerte, sólido, semisólido o líquido. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como, pero sin limitación, lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como, pero sin limitación, almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como, pero sin limitación, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como, pero sin limitación, manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como, pero sin limitación, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol; ésteres tales como, pero sin limitación, oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como, pero sin limitación, hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes aceptables no tóxicos tales como, por ejemplo, laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes.

4. Composición para uso en el tratamiento

Las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento de trastornos médicos relacionados con estrógeno, seleccionados del grupo consistente en cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades del sistema cardiovascular. El tratamiento comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente. El agente puede ser al menos un compuesto de fórmula (I-vii). El compuesto de fórmula (I-vii) puede ser TTC-352.

a. Trastornos relacionados con estrógeno

La composición de la presente invención puede utilizarse en métodos para tratar trastornos médicos relacionados con estrógeno, seleccionados del grupo consistente en: cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades del sistema cardiovascular. Un trastorno médico relacionado con estrógeno puede ser un trastorno médico en el cual la actividad de un receptor de estrógeno se encuentra alterada o modificada. La alteración de la actividad de un receptor de estrógeno puede incluir una regulación ascendente o una regulación descendente de la actividad del receptor de estrógeno. La alteración de la actividad de un receptor de estrógeno puede ser la misma o distinta en los órganos, tejidos y/o células de un sujeto.

Un trastorno médico relacionado con estrógeno también puede ser un trastorno médico que responda a la modulación de la actividad de un receptor de estrógeno. Tal modulación de la actividad de un receptor de estrógeno puede incluir una regulación ascendente o una regulación descendente de la actividad del receptor de estrógeno. La actividad de un receptor de estrógeno puede ser modulada o alterada por un agonista, un antagonista, un modulador selectivo de receptor de estrógeno (MSRE), un imitador selectivo de estrógeno (ISE) y/o derivados de estos. La actividad del receptor de estrógeno puede estar modulada de igual o distinta manera en diferentes órganos, tejidos y/o células de un sujeto.

Un trastorno médico relacionado con estrógeno puede ser, además, un trastorno médico causado por la acción del estrógeno y/o la falta de acción del estrógeno. Un trastorno médico relacionado con estrógeno puede ser un trastorno médico que responde o es sensible a una composición de la presente invención.

Un trastorno médico relacionado con estrógeno puede ser dependiente de hormonas o independiente de hormonas.

(1) Cáncer

5 La composición de la presente invención está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en cáncer. El cáncer puede ser un cáncer de mama, un cáncer de útero, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata y un cáncer de pulmón. En particular, el cáncer de mama puede ser un cáncer de mama resistente a tamoxifeno o un cáncer de mama triple negativo. Un cáncer de mama triple negativo puede ser un cáncer que no expresa receptor de estrógeno, receptor de progesterona ni receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico (HER-2). La expresión o sobreexpresión de PKC α puede ser indicativa de, o estar asociada con, cáncer de mama y/u otros cánceres. La PKC α puede ser un biomarcador o marcador de cáncer de mama y/u otros cánceres.

10 El tratamiento puede prevenir o reducir el riesgo de cáncer en un sujeto. El tratamiento puede causar una regresión parcial o completa del cáncer en un sujeto. El tratamiento puede causar una regresión parcial o completa de un cáncer independiente de hormonas en un sujeto. El tratamiento puede causar una regresión parcial o completa de un cáncer dependiente de hormonas en un sujeto.

15 El tratamiento puede antagonizar la acción de estrógenos en la mama y limitar las actividades mitogénicas de estrógenos en la mama, el sistema reproductivo y la próstata. El tratamiento puede provocar una regresión parcial o completa de un cáncer o tumor resistente a tamoxifeno. El tratamiento puede provocar una regresión parcial o completa de un cáncer de mama triple negativo.

(2) Inflamación

20 La composición de la presente invención también está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en inflamación. El tratamiento puede prevenir o reducir la inflamación en un sujeto que necesita tal tratamiento.

(3) Osteoporosis

25 La composición de la presente invención también está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en osteoporosis. El tratamiento puede prevenir o reducir la osteoporosis en un sujeto que necesita tal tratamiento. El tratamiento puede prevenir o reducir la pérdida de densidad mineral ósea en un sujeto. El tratamiento puede reducir o disminuir la tasa de recambio óseo o fracturas. El tratamiento puede mejorar o mantener la densidad mineral ósea en un sujeto. El tratamiento puede revertir la osteoporosis en un sujeto que necesita tal tratamiento.

(4) Atrofia vaginal

30 La composición de la presente invención también está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en atrofia vaginal. El tratamiento puede prevenir o reducir la atrofia vaginal en un sujeto que necesita tal tratamiento. El tratamiento puede revertir la atrofia vaginal en un sujeto que necesita tal tratamiento.

(5) Enfermedades del sistema cardiovascular

35 La composición de la presente invención también está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en enfermedades del sistema cardiovascular. El tratamiento puede mejorar o mantener los efectos vasodilatadores del estradiol sobre la vasculatura coronaria. El tratamiento puede disminuir o reducir los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (C-LBD). El tratamiento puede elevar los niveles de colesterol de lipoproteína de alta densidad (C-LAD). El tratamiento puede disminuir o reducir el riesgo de infarto de miocardio. El tratamiento puede prevenir o reducir el riesgo de trombosis. El tratamiento puede prevenir o reducir el riesgo de accidente cerebrovascular. El tratamiento puede prevenir o reducir el riesgo de cardiopatía coronaria.

(6) Enfermedades del sistema nervioso central

45 La composición de la presente invención también está destinada al uso en el tratamiento del trastorno médico, relacionado con estrógeno, consistente en enfermedades del sistema nervioso central. La enfermedad del sistema nervioso central puede ser la enfermedad de Alzheimer o el deterioro cognitivo leve. El tratamiento puede prevenir, reducir o revertir la enfermedad de Alzheimer o el deterioro cognitivo leve en un sujeto que necesita tal tratamiento. El tratamiento puede revertir déficits cognitivos. El tratamiento puede restaurar la cognición, la potenciación a largo plazo (PLP) y la función sináptica, y/o ser neuroprotector. El tratamiento puede promover la supervivencia neuronal y/o la neurogénesis hipocámpica.

50 b. Modos de administración

Los modos de administración de la composición de la presente invención pueden incluir comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas de gel duras y blandas, gránulos, pellas, soluciones acuosas, lipídicas, oleosas u otras, emulsiones tales como emulsiones de aceite en agua, liposomas, suspensiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires, emulsiones sólidas, dispersiones sólidas o polvos dispersables. Para preparar composiciones farmacéuticas

- destinadas a la administración oral, se puede mezclar el agente con adyuvantes y excipientes comúnmente conocidos y utilizados tales como, por ejemplo, goma arábiga, talco, almidón, azúcares (tales como, p. ej., manitosa, metilcelulosa, lactosa), gelatina, agentes tensioactivos, estearato de magnesio, disolventes acuosos o no acuosos, derivados de parafina, agentes reticulantes, dispersantes, emulsionantes, lubricantes, agentes conservantes, agentes saborizantes (p. ej., aceites etéreos), promotores de la solubilidad (p. ej., benzoato de bencilo o alcohol bencílico) o promotores de la biodisponibilidad (p. ej., emulsionantes, lubricantes, agentes conservantes, agentes saborizantes (p. ej., aceites etéreos), promotores de la solubilidad (p. ej., benzoato de bencilo o alcohol bencílico) o promotores de la biodisponibilidad (p. ej., Gelucire™). En la composición farmacéutica, el agente también puede estar disperso en una composición de micropartículas, p. ej., una composición nanoparticulada.
- Para la administración parenteral, se puede disolver o suspender el agente en un diluyente fisiológicamente aceptable tal como, p. ej., agua, tampón, aceites con o sin solubilizantes, agentes tensioactivos, dispersantes o emulsionantes. Por ejemplo, y sin limitación, como aceites se pueden emplear aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de ricino y aceite de sésamo. En términos más generales, para la administración parenteral el agente puede estar en forma de una solución o suspensión acuosa, lipídica, oleosa o de otro tipo, o incluso administrarse en forma de liposomas o nanosuspensiones.

En la presente memoria, el término "parenteral" se refiere a modos de administración que incluyen la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

6. Ejemplos

- Los tumores T47D:A18/PKC α resistentes a TAM revierten tras el tratamiento con E2 junto con el MSRE benzotiofénico raloxifeno (RAL) (11). El RAL tiene un perfil antiestrogénico favorable en el útero y ha demostrado su seguridad durante más de 15 años de uso clínico en la osteoporosis posmenopáusica y la quimioprevención del cáncer de mama. En los ejemplos que siguen se han observado los efectos *in vivo* de dos nuevos MSRE benzotiofénicos, BTC [2-(4-hidroxifenil)benzo[b]tiofen-6-ol] (Figura 1A) y TTC-352 [3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol] (Figura 1B) que, al contrario que el RAL, actúan como agonistas estrogénicos en T47D:A18, como se refleja en los ensayos de proliferación y de ERE (elemento de respuesta a estrógeno)-informador de luciferasa. Es digno de mención que estos dos MSRE fueron capaces de inducir *in vivo* la regresión de tumores por xenoinjerto T47D:A18/PKC α , resistentes a TAM e independientes de hormonas, pero ninguno de los compuestos fue capaz de sustentar el crecimiento de tumores T47D:A18/neo dependientes de hormonas y sensibles a TAM. Es importante destacar que ninguno de los MSRE provocó un aumento significativo en el peso uterino de estos ratones. Estos datos sugieren que se pueden diseñar MSRE benzotiofénicos para el tratamiento de cánceres de mama con resistencia endocrina, ya que son agentes antitumorales estrogénicos en el modelo de cáncer de mama T47D:A18/PKC α resistente a TAM, carecen de acción estrogénica significativa en el útero y no pueden sustentar el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de mama T47D:A18 sensibles a estrógeno.

Ejemplo 1

Materiales y métodos para los Ejemplos 2-7

- Reactivos. Se obtuvieron DMSO, E2 y TAM de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Se adquirió RAL (Evista®, Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN, EE. UU.) en la Farmacia del Hospital de la Universidad de Illinois en Chicago. Los reactivos para cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.). El material plástico para cultivo de tejidos se adquirió de Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: RE- α policlonal de conejo (SP1, Lab Vision, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, EE. UU.), β -actina monoclonal de ratón (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), anti-conejo Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y anti-ratón Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA).

- Condiciones de cultivo celular. Se mantuvieron líneas celulares T47D:A18/neo y T47D:A18/PKC α transfectantes estables (6) en RPMI1640 (con rojo fenol) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% que contenía G418 (500 μ g/mL). Antes del tratamiento, se cultivaron durante 3 días las líneas celulares en RPMI 1640 exento de rojo fenol, suplementado con SFB al 10% tratado con carbón revestido con dextrano 3X (medio empobrecido en E2). Las líneas celulares eran analizadas rutinariamente para detectar contaminación con micoplasma (kit para detección de micoplasma MycoAlert™, Lonza Ltd., Rockland, ME, EE. UU.). Los autores no realizaron autenticaciones de líneas celulares.

- Síntesis y biodisponibilidad oral de MSRE benzotiofénicos. La síntesis de BTC y TTC-352 ha sido descrita con anterioridad (12). Se empleó la derivatización de BTC con dansilo para elevar los límites de detección y de cuantificación para el análisis LC-MS/MS de muestras de plasma (Figuras 6 y 7). Se prepararon soluciones de trabajo de BTC y del estándar interno (3-Br-BTC) por dilución en serie de soluciones madre 1 mg/mL en acetonitrilo. Se prepararon patrones de calibración añadiendo BTC o 3-Br-BTC (20 ng/mL) a blancos de plasma de ratón, para proporcionar un intervalo de concentración final de 5-100 ng/mL (Figura 8). Tras añadir acetonitrilo frío, se mantuvieron las muestras a 4 °C durante 2 horas y se centrifugaron a 10.000 r. p. m. durante 15 minutos, y se concentraron los sobrenadantes bajo corriente de N₂. Se reconstituyeron en 0,1 mL de tampón de bicarbonato de

sodio 100 mM (pH = 10,5) los residuos resultantes, y se derivatizaron mediante la adición de 0,1 mL de cloruro de dansilo (2 mg/mL en acetona), seguido de incubación a 60 °C durante 5 minutos. Después de eliminar el disolvente, se reconstituyeron los residuos en 0,25 mL de acetonitrilo/agua (1:1, v/v) y se analizaron mediante LC-MS/MS.

5 Se administró BTC en etanol utilizando un vehículo de propilenglicol/carboximetilcelulosa (10 mg/kg p. o.) a ratones atímicos ovariectomizados de 4-6 semanas de edad (Harlan-Sprague-Dawley) (n = 3). Se recogieron muestras de sangre en tubos con EDTA a los 20 minutos, 2 horas y 6 horas tras el tratamiento. Se separó el plasma de la sangre entera por centrifugación a 4 °C. Antes del análisis, se añadió patrón interno al plasma y se extrajo 3 veces con acetonitrilo frío. La recuperación del analito se midió añadiendo cantidades conocidas de BTC a muestras de blancos de plasma. La elaboración de las muestras de plasma fue idéntica a lo descrito más arriba para la
10 determinación de la curva patrón.

El análisis LC-MS/MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 3000 (Applied Biosystems) equipado con HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se optimizó el monitoreo de reacción múltiple (MRM) para las disociaciones m/z 709 \rightarrow 171 y m/z 789 \rightarrow 171 (pérdida de 5-dimetilaminonaftaleno), con el fin de medir respectivamente dansil-BTC y dansil-Br-BTC (Figura 9). La separación
15 se realizó utilizando una columna Hypersil BDS C18 (2,1 mm \times 30 mm; 3 μ m) (Thermo Quest Corporation, MA) con un caudal de 0,3 mL/min. El disolvente de elución consistía en agua con 10% de MeOH y 0,3% de ácido fórmico (A) y MeCN con 0,3% de ácido fórmico (B). Se mantuvo inicialmente la fase móvil en 10% de B durante 5 minutos, se incrementó al 60% de B en el transcurso de 1,5 minutos y luego se incrementó al 90% de B en el transcurso de 15 minutos, eluyendo dansil-BTC y dansil-Br-BTC a 17,8 y 19,7 minutos, respectivamente (Figura 9).

20 Ensayo de crecimiento de ADN. Se mantuvieron células T47D:A18/neo y T47D:A18/PKC α durante 3 días en medio empobrecido en E2 antes de distribuir las en placas de 24 pocillos (15.000 células/pocillo). Al día siguiente se añadió medio que contenía el compuesto y se determinó el ADN total incubando las células con colorante permeante celular Hoechst 33342 y leyendo la fluorescencia con excitación a 355 nm y emisión a 460 nm, en un lector de placas Perkin Elmer Victor³ V (Waltham, MA, EE. UU.). El medio de tratamiento se cambiaba cada 2-3 días.

25 Transfección transitoria y ensayos de luciferasa. Se transfectaron transitoriamente las células mediante electroporación con 5 μ g de plásmido ERE-tk-Luc que contenía el gen informador de luciferasa controlado por un ERE triplete de vitelogenina de consenso (13) y 1 μ g de plásmido pCMV que expresaba β -galactosidasa (β -gal). Transcurridas 24 horas, se trataron las células y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se lisaron las células y se leyeron la actividad de luciferasa y las señales de β -gal mediante un luminómetro Monolight 3010 (Becton Dickinson,
30 Franklin Lakes, NJ, EE. UU.).

Ensayo de formación de colonias en matriz MATRIGEL. Se descongeló MATRIGEL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) durante una noche a 4 °C. Se revistieron placas de doce pocillos con 200 μ L de MATRIGEL por pocillo, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se suspendieron las células, a razón de 5×10^3 , en 400 μ L de RPMI 1640 exento de rojo fenol y se extendieron sobre MATRIGEL pregelificado, se dejaron incubarse a 37 °C durante
35 30 minutos y después se añadieron 360 μ L de medio de tratamiento que contenía 40 μ L de MATRIGEL. Se incubaron las placas a 37 °C durante 10 días; cada 3 días se volvía a añadir, en la parte superior del MATRIGEL, medio que contenía 10% de MATRIGEL. El día 10 se tiñeron con violeta cristal las colonias y se contó cada pocillo mediante microscopía óptica (20X).

40 Crecimiento de tumores T47D:A18/PKC α y T47D:A18/neo *in vivo*. Se establecieron tumores T47D:A18/PKC α y T47D:A18/neo como se ha descrito con anterioridad (7). Se administró E2 por medio de cápsulas silásticas (de 1,0 cm) implantadas por vía subcutánea entre las escápulas, que producían un nivel medio de E2 en suero de 379,5 pg/mL (14). Se administraron por vía oral BTC y TTC-352 a una dosis de 1,5 mg por animal, cada día durante 2 semanas, como se ha descrito con anterioridad para otros MSRE (7). Se administró RAL p. o. a una dosis de 1,5 mg por animal, cada día durante 2 semanas. Se determinó semanalmente el área transversal del tumor midiendo
45 con un pie de rey y calculándola mediante la fórmula: longitud/2 \times anchura/2 \times π . Para controlar el crecimiento tumoral se representó gráficamente el área tumoral media frente al tiempo en semanas. Se sacrificaron los ratones por inhalación de CO₂ y dislocación cervical, y se extirparon los tumores y el útero, que se despejaron de tejido conjuntivo y se pesaron inmediatamente. El Comité de cuidado y uso animal de la Universidad de Illinois en Chicago aprobó todos los procedimientos que implicaban a animales.

50 Microscopía confocal de inmunofluorescencia (IF) tumoral y análisis de colocalización. Se cortaron secciones de tumor (4 μ m) a partir de bloques de parafina y se prepararon para la tinción IF por desparafinación y rehidratación. La recuperación de antígeno se realizó incubando portaobjetos en tampón Tris-EDTA (pH = 9,0) a 90 °C y dejándolos enfriar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se bloquearon los portaobjetos con diluyente para anticuerpos (DAKO, Carpintería, CA, EE. UU.) durante 20 minutos, seguido de anticuerpo primario en proporción
55 1:100 en diluyente para anticuerpos, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron los portaobjetos con anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia en proporción 1:100 en diluyente para anticuerpos, durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol [1 μ g/mL], DAKO, Carpintería, CA, EE. UU.) durante 15 minutos. Se montaron los portaobjetos con medios de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). El análisis confocal se realizó con un microscopio Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Incorporated, North America, Thornwood, NY, EE. UU.).
60

Análisis estadístico. Se calcularon las estadísticas utilizando GraphPad Prism Version 5.0. Los análisis estadísticos utilizados fueron ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Tukey cuando era apropiado.

Ejemplo 2

5 La inhibición del crecimiento de T47D:A18/PKC α inducida por BTC y TTC-352 requiere contacto con la matriz extracelular

Los autores han publicado con anterioridad que E2 inhibe el crecimiento de tumores T47D:A18/PKC α *in vivo* e inhibe la formación de colonias en el cultivo en MATRIGEL 3D, pero no presenta efecto inhibitorio sobre el cultivo 2D. Por el contrario, la línea celular testigo T47D:A18/neo parental, de vector vacío, es estimulada en su crecimiento por E2, *in vitro* e *in vivo* (7, 15). En un esfuerzo para encontrar una alternativa potencial a E2 y expandir los datos positivos obtenidos *in vivo* con RAL (11), se seleccionaron dos MSRE benzotiofénicos de una biblioteca de MSRE, y se analizaron mediante un ensayo de crecimiento de ADN en el modelo *in vitro* 2D de los autores. Los autores han publicado con anterioridad acerca de ejemplos de esta biblioteca utilizando ensayos de desplazamiento con radioligando; ensayos con ERE-informador de luciferasa en células de cáncer de mama humano MCF-7 y activación de fosfatasa alcalina en células de cáncer de endometrio humano Ishikawa (12, 16-19). Según datos anteriores, tanto BTC como TTC-352 actuaron como agonistas estrogénicos en células T47D:A18/neo y T47D:A18/PKC α , estimulando la proliferación en cultivos 2D. Se cultivaron células en medios exentos de E2, se trataron con DMSO al 0,1% (testigo de vehículo), E2, BTC o TTC-352, y se midió el contenido de ADN como índice de proliferación. Las células T47D:A18/PKC α proliferaron en presencia de BTC y TTC-352 en todas las concentraciones probadas (1 nM, 10 nM, 100 nM) y la eficacia máxima fue similar a la observada para E2 (1 nM) *in vitro* (Figuras 1C y 1E). Curiosamente, solo las concentraciones más altas de BTC (100 nM) y de TTC-352 (100 nM) mostraron efectos sobre la proliferación de células T47D:A18/neo comparables al tratamiento con E2 (1 nM) (Figuras 1D e 1F).

E2 inhibe la formación de colonias T47D:A18/PKC α en MATRIGEL (15), recapitulando en parte el efecto inhibitorio de E2 sobre el establecimiento tumoral (7). Para determinar si BTC y TTC-352, de manera similar a E2, pueden inhibir el crecimiento de colonias T47D:A18/PKC α en cultivo 3D, se examinó la formación de colonias en MATRIGEL. Se distribuyeron en placas células en MATRIGEL exenta de rojo fenol que contenía vehículo (DMSO al 0,1%), E2 (1 nM), BTC (100 nM) o TTC-352 (100 nM) y se dejaron crecer durante 10 días. Se seleccionaron estas concentraciones en función de los efectos proliferativos en cultivos 2D. El crecimiento de colonias de T47D:A18/neo resultó estimulado por el tratamiento con E2, BTC y TTC-352 (Figura 2A), mientras que la formación de colonias de T47D:A18/PKC α resultó inhibida en presencia de E2, BTC y TTC-352 (Figura 2B). Estos resultados sugieren que BTC y TTC-352 son estrogénicos *in vitro* y, si las observaciones en el cultivo 3D son predictivas del desenlace *in vivo*, es probable que estos MSRE inhiban el crecimiento de células T47D:A18/PKC α en xenoinjertos.

Ejemplo 3

Inducción de actividad transcripcional de RE- α por BTC y TTC-352 en células de cáncer de mama

El RAL es un antagonista de estrógeno en células MCF-7 e Ishikawa, mientras que el TTC-352 es un agonista de estrógeno y el BTC es un agonista de estrógeno en células MCF-7 e Ishikawa. Aunque el BTC y el TTC-352 son agonistas estrogénicos nanomolares en células Ishikawa, cabe señalar que su potencia es tres órdenes de magnitud inferior a la de E2 (16-19). Para caracterizar por completo la actividad estrogénica de BTC y TTC-352 en células T47D:A18/neo y T47D:A18/PKC α , los autores han examinado la activación transcripcional de RE- α utilizando un constructo de elemento de respuesta a estrógeno (ERE) e informador de luciferasa. Después de la cotransfección transitoria de los plásmidos ERE-tk-luc y pCMV β -galactosidasa, se trataron las células con testigo de vehículo (DMSO al 0,1%), E2 (1 nM), BTC (1 nM, 10 nM, 100 nM) o TTC-352 (1 nM, 10 nM, 100 nM) 24 horas antes de determinar las actividades de luciferasa y β -gal. Los autores han publicado con anterioridad que la actividad basal de ERE es elevada en células T47D:A18/PKC α , en comparación con las células T47D:A18/neo parentales (6). En células T47D:A18/neo, el tratamiento con BTC y TTC-352 originó un incremento en la actividad transcripcional de RE- α a la concentración más alta, 100 nM (Figura 3A). Las células T47D:A18/PKC α fueron más sensibles que las células T47D:A18/neo a la inducción de ERE-luciferasa por BTC a 100 nM y 10 nM (Figura 3B). Estos datos sugieren que el BTC y el TTC-352 actúan como agonistas de RE *in vitro* tanto en las líneas celulares T47D:A18/neo como en las T47D:A18/PKC α , pero, en comparación con E2, el BTC parece tener una potencia y/o eficacia mejoradas en células T47D:A18/PKC α .

Ejemplo 4

Biodisponibilidad de BTC y MSRE benzotiofénicos

Se ha publicado que, en seres humanos, la biodisponibilidad absoluta de RAL administrado por vía oral es 2%, con un aclaramiento oral de 44 L/kg/h (20, 21). El desmetilazaroxifeno (DMA) es un antagonista estrogénico más potente en la mama, y mantiene acciones agonistas estrogénicas en tejidos óseos, pero también tiene una escasa biodisponibilidad (22). El arroxifeno fue diseñado como un profármaco de DMA con el fin de superar los problemas asociados con su baja biodisponibilidad (23-26). Como parte de un estudio comparativo de la actividad biológica de DMA, arroxifeno y F-DMA en ratas hembras juveniles, se evaluó su metabolismo mediante la cuantificación del fármaco remanente en el plasma transcurridos 3 días desde la administración del fármaco: no se observó DMA por

encima de los límites de detección (16, 18, 19). El BTC es el núcleo benzotiofénico tanto del DMA como del RAL, mientras que el TTC-352 presenta una similitud estructural con el F-DMA. El estudio del metabolismo comparativo de DMA y F-DMA sugiere que el BTC tendría una baja biodisponibilidad a causa de su metabolismo y aclaramiento, contrariamente al TTC-352, del que se predice que es estable (18, 19, 26, 27). Así pues, se midieron los niveles plasmáticos de BTC después de la administración oral a ratones "desnudos" atímicos ovariectomizados. Dado que el BTC se ioniza escasamente mediante ionización por electroespray para ESI-MS, se desarrolló un método de derivatización química para utilizar análisis de MRM por espectroscopía de masas en tándem. El fármaco se detectó en plasma a una concentración máxima de 40 ng/mL a los 30 minutos, y cayó hasta 10 ng/mL al cabo de 6 horas (Figura 10). Dada la observación de BTC muy por encima de los límites de detección en plasma de ratón, se decidió comparar los efectos de BTC y TTC-352 con RAL y E2 en el modelo de xenoinjerto T47D:A18/PKC α empleando administración oral.

Ejemplo 5

Efecto inhibitor del tratamiento con BTC y TTC-352 sobre xenoinjertos T47D:A18/PKC α independientes de hormonas y resistentes a TAM

Los autores han publicado recientemente que el tratamiento con RAL produce una regresión significativa de tumores T47D:A18/PKC α resistentes a TAM. Sin embargo, el RAL no produjo un efecto tan intenso como el E2 sobre la regresión tumoral, y no pudo inhibir la formación de colonias en MATRIGEL (11). A diferencia del RAL, el BTC y el TTC-352 son estrógenos en cultivo 2D y, al igual que el E2, tienen la capacidad de inhibir la formación de colonias T47D:A18/PKC α en MATRIGEL (Figura 2B). Por consiguiente, los autores examinaron a continuación si estos compuestos podrían iniciar la regresión de tumores T47D:A18/PKC α . Se inyectaron células T47D:A18/PKC α en 40 ratones atímicos, y se les dejó sin tratamiento durante siete semanas, momento en el cual el tamaño medio del tumor era $\sim 0,5$ cm 2 (100%). A las siete semanas, se dividieron aleatoriamente los ratones para, o bien continuar en la rama testigo sin tratamiento (9 ratones), o recibir implantes de una cápsula de E2 (9 ratones), RAL oral 1,5 mg/día (9 ratones), BTC oral 1,5 mg/día (9 ratones) o TTC-352 oral 1,5 mg/día (4 ratones). Después de dos semanas, todos los tratamientos habían reducido significativamente el volumen del tumor en comparación con los testigos sin tratar ($P < 0,05$). A las dos semanas, los tumores T47D:A18/PKC α tratados con BTC habían retrocedido en $\sim 88\%$, hasta un tamaño de $\sim 0,07$ cm 2 (Figura 4A). Los ratones tratados con TTC-352 también presentaron una disminución en el volumen del tumor a las dos semanas, retrocediendo en $\sim 70\%$, con un volumen tumoral medio de $\sim 0,18$ cm 2 (Figura 4A). El efecto de BTC y HP-BTC solo fue superado por el tratamiento con E2, que originó una regresión de $\sim 98\%$ a las 2 semanas. Tanto el BTC como el TTC-352 originaron una disminución en el volumen del tumor T47D:A18/PKC α que superaba la regresión exhibida por el RAL ($\sim 50\%$). Además, a diferencia del RAL, la regresión inducida por el BTC y el TTC-352 se mantuvo durante al menos cuatro semanas después del tratamiento (Figura 4A).

La regresión de tumores T47D:A18/PKC α inducida tanto por RAL como por E2 va acompañada por la salida del receptor α de estrógeno (RE- α) del núcleo (11). Los autores han publicado con anterioridad acerca de la posible participación de un receptor de estrógeno (RE) extranuclear en la regresión tumoral inducida por E2 (11, 15). Aquí, los autores muestran que cuando los tumores tratados con BTC y TTC-352 están retrocediendo, hay una salida de RE- α desde el núcleo (Figura 4B), lo que sugiere que el mecanismo subyacente de regresión por MSRE benzotiofénicos puede ser similar al de E2 y RAL, e involucrar RE- α extranuclear. Juntos, estos resultados sugieren que el BTC y el TTC-352, al igual que el E2, provocan la regresión de tumor T47D:A18/PKC α a través de un mecanismo que posiblemente involucre RE- α extranuclear.

Ejemplo 6

Efecto de BTC y TTC-352 sobre xenoinjertos T47D:A18/neo dependientes de hormonas

La línea celular de cáncer de mama T47D:A18/neo dependiente de hormonas, RE-positivo, testigo de vector vacío, requiere E2 para crecer *in vitro* e *in vivo* (6, 7). Dado que el tratamiento con BTC y TTC-352 origina el crecimiento de células T47D:A18/neo en cultivo 2D (Figuras 1C e 1E) y en MATRIGEL 3D (Figura 2A), los autores intentaron después determinar si BTC y TTC-352 podrían sustentar el crecimiento de tumores T47D:A18/neo *in vivo*. Se inyectaron bilateralmente células T47D:A18/neo en las almohadillas de grasa mamaria de 20 ratones atímicos, y se les dividió en seis grupos de tratamiento (3 testigos sin tratamiento, 3 con cápsula de E2, 3 con TAM oral 1,5 mg/día, 3 con RAL oral 1,5 mg/día, 4 con BTC oral 1,5 mg/día o 4 con TTC-352 oral 1,5 mg/día). Transcurridas siete semanas de tratamiento, los ratones tratados con E2, como se esperaba, albergaban tumores T47D:A18/neo que alcanzaban un tamaño promedio de $\sim 0,35$ cm 2 (100%), los tumores tratados con BTC y con TTC-352 habían crecido hasta un tamaño promedio de $\sim 0,04$ cm 2 y $\sim 0,1$ cm 2 , respectivamente (Figura 5A). Aunque a concentraciones más altas, el BTC y el TTC-352 (Figuras 1C e 1E) estimularon el crecimiento de células T47D:A18/neo *in vitro*, pero ninguno de los compuestos fue capaz de estimular significativamente el crecimiento de tumores por xenoinjerto T47D:A18/neo *in vivo*. Curiosamente, la dosis capaz de provocar una regresión intensa de los tumores T47D:A18/PKC α no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de tumores T47D:A18/neo *in vivo*. Además, no se observó ninguna pérdida de peso significativa durante el período de tratamiento de siete semanas (Figura 5B).

Ejemplo 7

BTC y TTC-352 no tienen efecto sobre el peso uterino de ratones atímicos

El E2 tiene un efecto proliferativo sobre el endometrio, que origina un aumento en el peso uterino. El TAM tiene un efecto estrogénico sobre el crecimiento endometrial, que conduce a un riesgo acrecentado de desarrollar cáncer de endometrio (28). En ratas ovariectomizadas el RAL, a una dosis mínimamente eficaz, no incrementó el peso uterino, en contraste con el E2 y el TAM, y a dosis de hasta 10 mg/kg/día no incrementó el grosor de las células epiteliales luminales (29-32). Conscientes de las acciones agonistas estrogénicas del BTC y el TTC-352 en células Ishikawa, los autores buscaron comparar los efectos de BTC y TTC-352 sobre el peso uterino con los del RAL, TAM y E2. Después de 7 semanas de tratamiento, se extirparon los úteros de ratones ovariectomizados en 5A, y se determinaron los pesos. Curiosamente, no hubo un aumento significativo en el peso uterino de ratones tratados con BTC o TTC-352 (Figura 5C). Los significativos efectos proliferativos asociados tanto con el TAM como con el E2 estaban ausentes en el BTC y el TTC-352, lo que sugiere que estos MSRE manifiestan un perfil de seguridad mejorado en comparación con el TAM y el E2.

Ejemplo 8

Resumen de los ejemplos 2-7

La resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama, ya sea *de novo* o adquirida, es un obstáculo clínico importante. El uso de 17 β -estradiol (E2) o un estrógeno alternativo ha resurgido como una opción potencial de tratamiento después del uso exhaustivo de moduladores selectivos de receptor de estrógeno (MSRE), antiestrógenos e inhibidores de aromataasa. Se ha demostrado que la expresión de la proteína cinasa C-alfa (PKC α) es un predictor del desenlace de la enfermedad para pacientes en terapia endocrina, y puede predecir la respuesta positiva a un tratamiento estrogénico. Los autores han publicado con anterioridad que la sobreexpresión ectópica de PKC α en células de cáncer de mama T47D:A18 conduce *in vivo* a un fenotipo independiente de hormonas, resistente a tamoxifeno (TAM) e inhibido por E2, recapitulando observaciones hechas en la clínica. En la presente memoria, utilizando el modelo de T47D:A18/PKC α clínicamente relevante de los autores, estos mismos han investigado nuevos MSRE benzotiofénicos para el tratamiento del cáncer de mama resistente a TAM. El tratamiento con estos MSRE ha originado una regresión significativa de tumores T47D:A18/PKC α después de dos semanas de tratamiento, acompañada de la translocación de RE- α a sitios extranucleares. Es importante destacar que el tratamiento con moduladores MSRE no ha producido crecimiento de tumores T47D:A18/neo parentales dependientes de E2, lo que sugiere que estos MSRE no actúan *in vivo* como agonistas estrogénicos en células parentales dependientes de hormonas. Además, el tratamiento con moduladores MSRE no ha estimulado el aumento de peso uterino. Estos datos sugieren que el desarrollo adicional de MSRE dirigidos contra el cáncer de mama resistente a TAM es una estrategia terapéutica factible.

Ejemplo 9

Discusión de los ejemplos 2-7

La resistencia a terapias endocrinas es un obstáculo importante dentro del entorno clínico. En la actualidad existe una falta de opciones terapéuticas eficaces para mujeres que ya no responden a enfoques convencionales de terapia endocrina. Los hallazgos de los autores, y los de otros, sugieren que la expresión de PKC α es un marcador predictivo del desenlace de la enfermedad para pacientes en terapia endocrina (3-5). Además, su expresión puede predecir una respuesta positiva a E2 o a un compuesto similar a E2 (7). El E2 tiene eficacia clínica (9, 10, 33, 34) pero, debido a sus efectos secundarios desfavorables, ya no se emplea para el tratamiento. En el presente estudio, los autores han buscado identificar posibles opciones terapéuticas alternativas para los cánceres de mama resistentes a TAM, en especial aquellos que sobreexpresan PKC α .

Los autores han evaluado diversos análogos benzotiofénicos y, en función de su actividad estrogénica *in vitro*, han elegido para su posterior estudio dos análogos, BTC y TTC-352. Tanto en células T47D:A18/neo como en células T47D:A18/PKC α , el tratamiento con BTC y TTC-352 ha conducido *in vitro* a una proliferación acrecentada y a la activación de ERE (Figuras 1 y 3). Aunque el E2 inducía *in vivo* el crecimiento de tumores T47D:A18/neo parentales dependientes de hormonas, sensibles a TAM, ni el BTC ni el TTC-352 pudieron sustentar el crecimiento de tumores T47D:A18/neo (Figura 5A). Curiosamente, los tumores T47D:A18/PKC α resistentes a TAM, de los que se había demostrado con anterioridad la regresión con el tratamiento con E2 (7), también experimentan regresión cuando son tratados con BTC o TTC-352 (Figura 4A). De manera análoga al E2, la regresión también va acompañada de la salida de RE- α desde el núcleo a sitios extranucleares (Figura 4B), lo que sugiere un papel potencial del RE- α extranuclear en la regresión tumoral inducida por BTC y TTC-352. Las respuestas no genómicas a RE- α extranuclear están generalmente asociadas con una respuesta proliferativa a través de la activación de diversas cascadas de señalización (35-38). Los autores han demostrado con anterioridad que, a medida que los tumores T47D:A18/PKC α experimentan regresión en presencia de E2, se produce una regulación descendente de la vía AKT (15), así como la salida de RE- α desde el núcleo a sitios extranucleares (11), lo que sugiere que el RE- α extranuclear puede tener un nuevo papel antiproliferativo en la regresión de tumores T47D:A18/PKC α inducida por moduladores MSRE. Resulta interesante postular un mecanismo en el cual el RE- α extranuclear está asociado directa o indirectamente con PKC α , lo que lleva a su inactivación cuando los tumores T47D:A18/PKC α experimentan regresión. Estas posibilidades están siendo exploradas en la actualidad en el laboratorio de los autores.

Sin embargo, a diferencia del E2, ni el tratamiento con BTC ni el tratamiento con TTC-352 han producido aumento en el peso uterino de los ratones (Figura 5C), lo que indica que BTC y TTC-352, a diferencia del E2, pueden tener una especificidad tisular mejorada.

5 La translocación de RE- α desde el núcleo al citoplasma es una característica común de tratamientos que provocan regresión de tumores T47D:A18/PKC α , pero no de aquellos que son ineficaces, es decir, el TAM (11). Resulta interesante la similitud con los antiandrógenos de diariltiohidantoína (p. ej., MDV3100, ARN509, RD162) que provocan una translocación similar del receptor de andrógeno (RA) en células de cáncer de próstata, en particular por que esta característica se ve como una ventaja clínica sobre antiandrógenos más antiguos (39, 40). Se prevé que el MDV3100 reciba en breve la aprobación para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a la castración.
10 El mecanismo mediante el cual estos antiandrógenos provocan la translocación no ha sido definido y, por lo que se refiere a los MSRE benzotiofénicos, podría incluir la estabilización de complejos receptores citoplasmáticos o la desestabilización de complejos receptores nucleares.

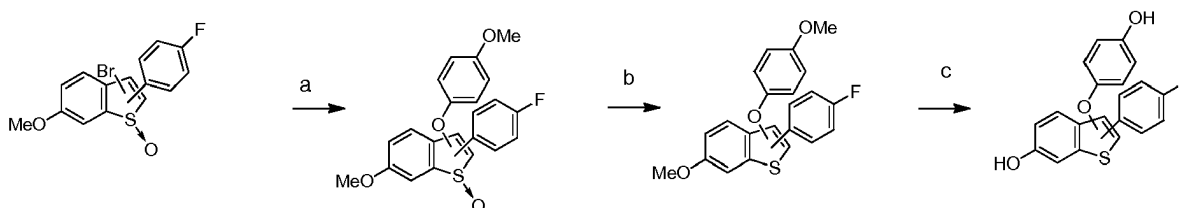
15 Resulta fascinante que moduladores MSRE relacionados estructuralmente, que muestran de manera variada la actividad antagonista clásica a RE- α (RAL), o la actividad agonista clásica (BTC, TTC-352), den lugar a las mismas acciones de regresión tumoral en xenoinjertos T47D:A18/PKC α , aunque se aprecia el fracaso en que la regresión inducida por RAL persista después de la retirada del fármaco. El hecho de que los agonistas estrogénicos BTC y TTC-352 no estimulasen el crecimiento de xenoinjertos T47D:A18/neo sensibles a estrógeno o de tejidos uterinos se justifica de la manera más simple por la potencia relativamente baja de estos agonistas, lo que indica nuevamente la participación de una vía que no es simplemente la clásica, mediada por RE- α , en xenoinjertos T47D:A18/PKC α .

20 Recientemente ha resurgido el uso de E2 o de un compuesto similar a E2 como una posible estrategia de tratamiento para pacientes que padecen cánceres de mama resistentes a terapia endocrina (41-44). Los ensayos clínicos han demostrado la eficacia del E2 en este escenario (33, 34). De hecho, un estudio de seguimiento a largo plazo ha indicado una ventaja de supervivencia para pacientes tratados con el estrógeno sintético DES, en comparación con pacientes tratados con TAM (45). La base para el uso clínico de estrógenos está respaldada por una serie de modelos preclínicos de laboratorio (7, 8, 46-52). Shim y sus colegas han demostrado que células MCF-7 privadas de E2 a largo plazo forman tumores que son inhibidos por E2 (52). Células MCF-7 resistentes a RAL experimentan apoptosis después de la exposición a E2 (48). El trasplante en serie de tumores MCF-7 estimulados por TAM durante 5 años también ha conducido a un fenotipo inhibidor de E2 (8), así como a la sobreexpresión de PKC α (7). La capacidad de predecir la respuesta de un paciente a la terapia, antes del tratamiento, sería una opción clínica muy atractiva. Los pacientes que presentan tumores que sobreexpresan PKC α se beneficiarían probablemente de una terapia similar a la terapia con E2, de la cual actualmente existen pocas opciones.

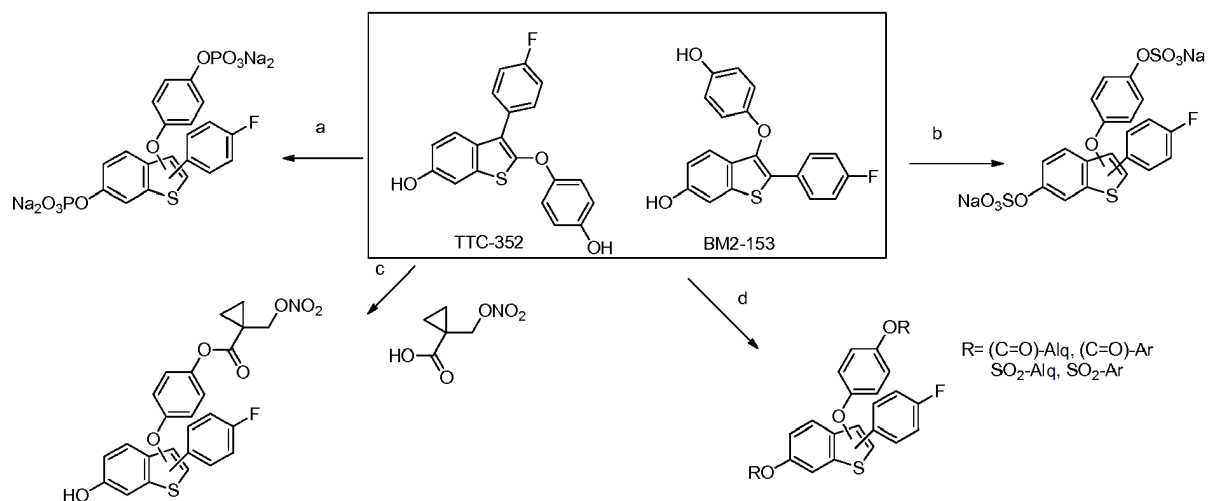
Los resultados del presente estudio respaldan el uso de un MSRE de segunda línea con efectos estrogénicos selectivos sobre la mama, para uso en pacientes que ya no responden a la terapia endocrina convencional y cuyos tumores sobreexpresan PKC α . Los autores han descrito dos nuevos MSRE benzotiofénicos que provocan regresión tumoral en el modelo T47D:A18/PKC α resistente a TAM, al tiempo que presentan un efecto escaso sobre el crecimiento de tumores T47D:A18/neo parentales dependientes de hormonas. Dado que la presencia de PKC α ha determinado una respuesta estrogénica mejorada al BTC y al TTC-352, así como un fenotipo de regresión tumoral, estos compuestos pueden tener un valor clínico potencial en un escenario de resistencia a TAM. Es importante destacar que el tratamiento con BTC y TTC-352 ha tenido efectos mínimos sobre la proliferación *in vivo* dentro del útero de ratones, lo que sugiere que los efectos estrogénicos de estos agentes son específicos para la mama. Tanto el BTC como el TTC-352 son posibles alternativas al tratamiento con E2, y representan sondas químicas y compuestos prometedores para una mayor optimización, con vistas a nuevas opciones de tratamiento en la gestión del cáncer de mama con resistencia endocrina.

45 Ejemplo 10

Síntesis de profármacos de TTC-352 y BM2-153



Reactivos y condiciones: (a) 4-metoxifenol, NaH, DMF; (b) LiAlH₄, THF, 0 °C; (c) BBr₃, DCM, 0 °C



Reactivos y condiciones: (a) $POCl_3$, NaOH, H_2O ; (b) i. NaHDMS, THF, clorosulfato de isobutilo;

ii. NaI, acetona; (c) EDCI, DIPEA, DMAP; (d) $RCOCl$ o $R-SO_2Cl$, TEA, DCM

5 Acetato de 4-((6-acetoxi-2-(4-fluorofenil)benzo[b]tiofen-3-il)oxi)fenilo (diacetato de BM2-153). Se añadió cloruro de acetilo (0,312 mmol), en una porción, a una solución agitada de 2-(4-fluorofenil)-3-(4-hidroxi-fenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol (BM2-153, 50 mg, 0,142 mmol) y trietilamina (0,355 mmol) en diclorometano anhidro (1 mL) a 0 °C. Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura ambiente y después se inactivó con H_2O (1 mL). Se eliminaron en vacío los volátiles y se distribuyó el residuo resultante entre H_2O y acetato de etilo. Se aisló la capa orgánica, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se cromatógrafió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (hexanos:acetato de etilo, 1:1) para proporcionar 61 mg (98%) del compuesto deseado, en forma de un sólido blanco. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,73 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz), 7,57 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 7,41 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7,12-6,95 (m, 7H), 2,35 (s, 3H), 2,29 (s, 3H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 169,54, 169,48, 154,89, 148,47, 145,57, 139,80, 136,05, 131,54, 129,58, 129,50, 128,91, 122,71, 122,24, 119,29, 116,15, 116,05, 115,83, 115,59, 21,11, 21,03.

15 Isobutirato de 2-(4-fluorofenil)-3-(4-(isobutiriloxi)fenoxi)benzo[b]tiofen-6-ilo (diisobutirato de BM2-153). Se añadió cloruro de isobutirilo (0,312 mmol), en una porción, a una solución agitada de 2-(4-fluorofenil)-3-(4-hidroxi-fenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol (BM2-153, 50 mg, 0,142 mmol) y trietilamina (0,355 mmol) en diclorometano anhidro (1 mL) a 0 °C. Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura ambiente y después se inactivó con H_2O (1 mL). Se eliminaron en vacío los volátiles y se distribuyó el residuo resultante entre H_2O y acetato de etilo. Se aisló la capa orgánica, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se cromatógrafió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (hexanos:acetato de etilo, 4:1) para proporcionar 56 mg (80%) del compuesto deseado, en forma de un sólido blanco. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,73 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz), 7,57 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,40 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,10-6,94 (m, 7H), 2,89-2,75 (m, 2H), 1,37-1,34 (m, 6H), 1,32-1,29 (m, 6H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 175,31, 175,25, 154,45, 148,33, 145,38, 139,47, 135,68, 131,05, 129,30, 129,19, 129,11, 128,36, 122,27, 121,81, 118,88, 115,73, 115,65, 115,56, 115,44, 115,16, 33,82, 33,71, 18,54, 18,51.

30 Pivalato de 2-(4-fluorofenil)-3-(4-(pivaloiloxi)fenoxi)benzo[b]tiofen-6-ilo (dipivalato de BM2-153). Se añadió cloruro de pivaloilo (0,312 mmol), en una porción, a una solución agitada de 2-(4-fluorofenil)-3-(4-hidroxi-fenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol (BM2-153, 50 mg, 0,142 mmol) y trietilamina (0,355 mmol) en diclorometano anhidro (1 mL) a 0 °C. Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura ambiente y después se inactivó con H_2O (1 mL). Se eliminaron en vacío los volátiles y se distribuyó el residuo resultante entre H_2O y acetato de etilo. Se aisló la capa orgánica, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se cromatógrafió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (hexanos:acetato de etilo, 14:1) para proporcionar 65 mg (88%) del compuesto deseado, en forma de un sólido blanco. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,73 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz), 7,55 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,40 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,08 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz), 6,99 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, 2 Hz), 6,97-6,94 (m, 4H), 1,40 (s, 9H), 1,35 (s, 9H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 177,17, 177,11, 154,79, 148,93, 145,95, 136,05, 131,37, 129,55, 129,47, 128,66, 122,69, 122,61, 122,15, 119,23, 116,08, 116,02, 115,80, 115,52, 39,15, 39,00, 27,22, 27,12, 27,09.

Ejemplo 11

El tratamiento con TTC-352 (es decir, el TTC-352) origina la regresión de tumores por xenoinjerto resistentes a TAM sin los efectos secundarios asociados con otros tratamientos

40 Según las observaciones clínicas, los xenoinjertos T47D-Tam1 y T47D/PKC α son ambos resistentes a TAM, y el tratamiento con E_2 inhibe su crecimiento (Figuras 11B y C). Curiosamente, el modulador selectivo de receptor de

estrógeno (MSRE) de nueva generación, raloxifeno, provocó regresión del tumor, pero la retirada del fármaco condujo a una recaída (Figura 11C). Las observaciones de que el TTC-352 (Figura 11A), estructuralmente relacionado con el raloxifeno, imita las acciones de E₂ en células T47D *in vitro*, respaldaron a TTC-352 como un posible tratamiento alternativo a E₂. Los tumores por xenoinjerto T47D-Tam1 (Figura 11B) y T47D/PKCα (Figura 11C), establecidos, tratados a diario con TTC-352 durante siete semanas mostraron una regresión tumoral comparable a la de tumores tratados con E₂, incluso después de la retirada del tratamiento (Figura 11C). El engrosamiento endometrial, causado tanto por el E₂ como por el TAM, pero no por el raloxifeno, está directamente asociado con carcinogénesis ginecológica y cáncer de útero. El tratamiento con TTC-352 no incrementó el peso uterino en ratones, lo que sugiere una estimulación hormonal insignificante en tejidos ginecológicos (Figura 11D). El TTC-352 cumple los criterios para un imitador selectivo de estrógeno (ISE), selectivo para la terapia de cáncer de mama RE+ y resistente a TAM, con seguridad acrecentada en comparación con E₂ y TAM. La PKCα está presente en un 70% de todos los tumores, incluido el cáncer de mama triple negativo, para el que no existe tratamiento eficaz, lo que indica la eficacia de la aplicación terapéutica de imitadores ISE más allá de la resistencia a TAM.

Ejemplo 12

15 Farmacocinética de imitadores ISE en ratones

Se han preparado profármacos de imitadores ISE utilizando técnicas habituales y escalables de química orgánica. Se verificará su estabilidad metabólica en el hígado humano y en incubaciones microsómicas intestinales humanas, así como en plasma, con o sin esterasa (PLE). Los ISE con alta estabilidad, mínimos metabolitos oxidativos y eficaz bioactivación enzimática para dar TTC-352 (es decir, TTC-352) se harán pasar a estudios farmacocinéticos.

20 Se administrará mediante sonda gástrica a ratones atímicos desnudos de 4 a 6 semanas de edad, ovariectomizados (OVX), TTC-352 y no más de 3 profármacos de imitador ISE, en etanol, utilizando un vehículo de propilenglicol/carboximetilcelulosa, con una dosis única de 4,4 μmol (equivalente a los 1,5 mg/día utilizados en estudios en xenoinjertos). Se tomarán muestras de sangre a los 20 minutos, 2 horas y 6 horas tras el tratamiento, utilizando EDTA como anticoagulante. Se separará el plasma de la sangre entera mediante centrifugación a 4 °C, y se analizarán las muestras inmediatamente en busca de profármaco y fármaco, utilizando LC-MS/MS.

Ejemplo 13

Eficacia de TTC-352 (es decir, profármacos de TTC-352) sobre el crecimiento de tumor por xenoinjerto, resistente a TAM

30 Se utilizarán modelos de tumor por xenoinjerto T47D-Tam1 y T47D/PKCα para evaluar la eficacia de dos tratamientos con imitadores ISE a dos dosis (4,4 μmol y 0,44 μmol/día, según los datos que se muestran en la Figura 11). Se harán crecer tumores en ratones atímicos OVX y se tratarán cuando el volumen del tumor alcance aproximadamente 0,5 cm². Se comparará la respuesta a los ISE con la del estándar de tratamiento (p. ej., tamoxifeno).

Ejemplo 14

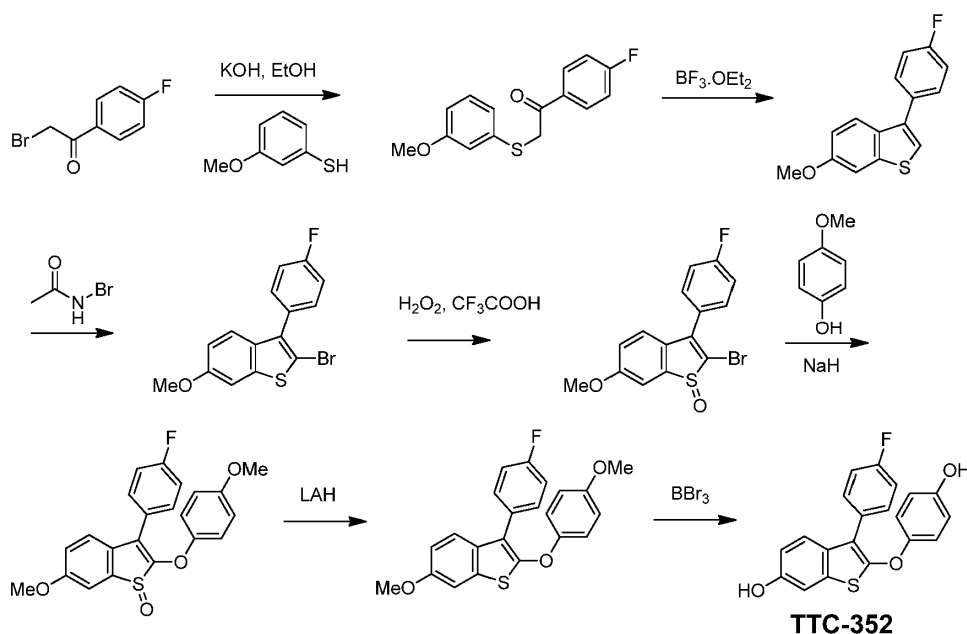
35 Confirmación del mecanismo de acción

Para los tumores tratados con imitadores ISE, se evaluarán mediante inmunohistoquímica los biomarcadores PKCα y RE. Se medirá *ex vivo* la actividad anticoagulante.

40 Se entiende que la precedente descripción detallada y los ejemplos adjuntos son meramente ilustrativos y no deben tomarse como limitaciones del alcance de la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. Serán evidentes para los expertos en la materia diversos cambios y modificaciones con respecto a las realizaciones descritas. Dichos cambios y modificaciones, que incluyen, sin limitación, los relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermedios, síntesis, composiciones, formulaciones o métodos de uso de la invención, pueden realizarse sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.

Ejemplo 15

45 Síntesis de TTC-352



El compuesto 3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol (TTC-352) se puede preparar según el esquema precedente y los siguientes ejemplos.

- 5 1-(4-Fluorofenil)-2-(3-metoxifenilsulfanil)etanona. Se añadió 3-metoxibencenotiol (1 g, 7,1 mmol), en una porción, a una solución recién preparada de 7,5 mL de etanol, 3 mL de agua y 470 mg de KOH (8,4 mmol). Se enfrió la solución a 5-10 °C. Se añadió a esta solución una solución de 2-bromo-1-(4-fluorofenil)etanona (1,54 g, 7,1 mmol) en 2,5 mL de EtOAc, a una velocidad tal que la temperatura no llegó a superar los 25 °C, y se dejó agitando la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes bajo presión reducida, y se distribuyó el residuo entre agua y acetato de etilo. Se separó la capa acuosa y se extrajo varias veces con acetato de etilo, y los extractos combinados se lavaron con porciones consecutivas de HCl al 10%, agua, NaHCO₃ saturado y agua, antes de secarlos sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras concentrar en vacío hasta un aceite, se purificó mediante cromatografía ultrarrápida [SiO₂, hexano/acetato de etilo (10:1, v/v)] el producto bruto, para proporcionar 1,4 g (74%) de producto deseado. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3,73 (s, 3H), 4,67 (s, 3H), 6,75 (m, 1H), 6,91 (m, 2H), 7,18 (t, *J*) = 8,2 Hz, 1H), 7,34 (t, *J*) = 8,9 Hz, 2H), 8,12 (q, *J*) = 8,9 Hz, 2H).
- 10 3-(4-Fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno. Bajo atmósfera de argón, se cargó un matraz con 1-(4-fluorofenil)-2-(3-metoxifenilsulfanil)etanona y BF₃·OEt₂, a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción hasta que se consumió el material de partida, según análisis por TLC. Se vertió la mezcla de reacción en NaHCO₃ saturado y agua de hielo, se agitó durante 30 minutos y se extrajo con diclorometano. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida [SiO₂, hexano/diclorometano (20:1, v/v)] el producto bruto. Se recrystalizaron las fracciones de la columna, combinadas, para obtener 50% de producto puro. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3,89 (s, 3H), 7,02 (dd, 8,9 Hz, 2,2 Hz, 1H), 7,15 (m, 3H), 7,37 (d, 2,2 Hz, 1H), 7,52 (m, 2H), 7,71 (d, 8,9 Hz, 1H). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 55,62, 105,24, 114,52, 115,50, 115,71, 120,67, 123,30, 130,09, 130,17, 131,96, 132,17, 136,62, 142,07, 157,56, 162,31.
- 15 2-Bromo-3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno. Se añadió gota a gota *N*-bromoacetamida (1,46 g, 10,5 mmol) en 10 mL de etanol a una solución de 3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno (2,58 g, 10 mmol) en 300 mL de CH₂Cl₂ y 20 mL de etanol a temperatura ambiente. Tras agitar la mezcla durante 1 hora, se eliminó en vacío el disolvente. A continuación, se trituró el residuo con etanol y se filtró para dar 3,0 g (89%) de producto deseado. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3,898 (s, 3H), 6,94 (dd, 8,9 Hz, 2,3 Hz, 1H), 7,24 (m, 3H), 7,38 (d, 8,9 Hz, 1H), 7,45 (m, 2H). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 55,27, 104,1, 109,47, 114,20, 115,14, 115,36, 122,99, 129,57, 131,23, 131,31, 132,29, 135,28, 140,61, 157,36, 162,05.
- 20 2-Bromo-3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno 1-óxido. Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (13 mL) a una solución de 2-bromo-3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno (2,4 g, 7 mmol) en 13 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Tras agitar la mezcla durante 5 minutos, se añadió gota a gota H₂O₂ (1,0 mL, 7 mmol, solución acuosa al 30%) y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió bisulfito de sodio (0,3 g) a la solución, seguido de 5 mL de agua. Se agitó vigorosamente la mezcla durante 30 minutos y después se concentró en vacío. Se distribuyó el residuo entre CH₂Cl₂ y solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL de cada uno). Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con porciones consecutivas de agua, NaHCO₃ saturado y agua, y después se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en vacío; se trituró el residuo con éter dietílico y se filtró para proporcionar 2,1 g (84%) de producto deseado.
- 25 35

3-(4-Fluorofenil)-6-metoxi-2-(4-metoxifenoxi)benzo[b]tiofeno 1-óxido. Se añadió NaH (237 mg, 9,9 mmol, dispersión al 60% en aceite mineral) a una solución de 4-metoxifenol (1,31 g, 5,9 mmol) en 25 mL de DMF anhidro, a temperatura ambiente. Tras agitar la mezcla durante 15 minutos se añadió, en pequeñas porciones, 2-bromo-3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno 1-óxido (2 g, 5,7 mmol). Tras agitar la mezcla durante 1 hora, se añadieron acetato de etilo y agua, y se lavó varias veces la capa orgánica con agua y después se secó sobre Na₂SO₄. Se trituró con hexano/acetato de etilo (10:1, v/v) el residuo, y se filtró para proporcionar 2,47 g (89%) de producto deseado.

3-(4-Fluorofenil)-6-metoxi-2-(4-metoxifenoxi)benzo[b]tiofeno. Se añadió LiAlH₄ (0,27 g, 7,2 mmol), en pequeñas porciones, a una solución de 3-(4-fluorofenil)-6-metoxi-2-(4-metoxifenoxi)benzo[b]tiofeno 1-óxido (2,37 g, 4,8 mmol) en 180 mL de THF anhidro, bajo argón y a 0 °C. Tras agitar la mezcla durante 30 minutos, se inactivó la reacción mediante la adición lenta de 4 mL de NaOH 2,0 M. Se agitó vigorosamente la mezcla durante 30 minutos y se añadió una cantidad mínima de NaOH 2,0 M para disolver las sales. Después se distribuyó la mezcla entre agua y etanol/acetato de etilo (1:9, v/v). Se separó la capa acuosa y se extrajo varias veces con etanol/acetato de etilo (1:9, v/v). Se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentraron en vacío hasta un aceite, y después se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 1,2 g (67%) de producto deseado.

3-(4-Fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofeno-6-ol (TTC-352). Se disolvió 3-(4-fluorofenil)-6-metoxi-2-(4-metoxifenoxi)benzo[b]tiofeno (1,5 g, 2,9 mmol) en 150 mL de CH₂Cl₂ anhidro, y se enfrió a 0 °C. Se añadió a esta solución BBr₃ (1,0 M en CH₂Cl₂, 11,6 mL, 11,6 mmol) seguido de agitación a 0 °C durante 4 horas. Se inactivó la reacción con NaHCO₃ saturado (100 mL), y se enfrió a 0 °C. Se separó la capa acuosa y se extrajo con metanol/acetato de etilo (5:95, v/v) (3 x 100 mL). Se combinaron los extractos orgánicos, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentraron en vacío y después se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida [SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH (8:1, v/v)] para obtener 1,1 g (75%) de producto deseado. ¹H-RMN (400 MHz, acetona-d₆) δ (ppm) 6,84 (m, 2H), 6,97 (dd, 8,9 Hz, 2,2 Hz, 1H), 7,02 (m, 2H), 7,24 (m, 2H), 7,28 (d, 2,2 Hz, 1H), 7,47 (d, 8,9 Hz, 1H), 7,61 (m, 2H). ¹³C-RMN (100 MHz, acetona-d₆) δ (ppm) 162,84, 155,94, 155,02, 153,81, 152,35, 135,21, 132,28, 132,20, 130,90, 130,32, 123,70, 120,81, 119,67, 119,66, 116,95, 116,95, 116,39, 116,17, 115,52, 109,00.

4-((3-(4-Fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofeno-2-il)oxi)fenol (monometoxil-TTC-352). Preparado según el mismo procedimiento general que el TTC-352. ¹H-RMN (400 MHz, acetona-d₆) δ = 7,62 (m, 2H), 7,52 (d, 8,9 Hz, 1H), 7,41 (d, 2,3 Hz, 1H), 7,25 (t, 8,9 Hz, 2H), 7,02 (dd, 9,0 Hz, 2,6, 3H), 6,83 (d, 9,0 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H). ¹³C-RMN (100 MHz, acetona-d₆) δ (ppm) 161,95, 157,52, 154,09, 153,58, 151,34, 134,15, 131,34, 131,26, 130,71, 129,25, 122,60, 119,70, 118,79, 118,79, 116,00, 115,91, 115,46, 115,24, 114,20, 105,89, 55,04.

7. Referencias

- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, *et al.* Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279:L429-L38.
- Mackay HJ, Twelves CJ. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocrine-Related Cancer*. 2003;10:389-96.
- Assender JW, Gee JMW, Lewis I, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RI. Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2007;60:1216-21.
- Tonetti DA, Morrow M, Kidwai N, Gupta A, Badve S. Elevated protein kinase C alpha expression may be predictive of tamoxifen treatment failure. *Br J Cancer*. 2003;88:1400-2.
- Lonne G, Cornmark L, Zahirovic I, Landberg G, Jirstrom K, Larsson C. PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Molecular Cancer*. 2010;9:76.
- Tonetti DA, Chisamore MJ, Grdina W, Schurz H, Jordan VC. Stable transfection of protein kinase C alpha cDNA in hormone-dependent breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2000;83:782-91.
- Chisamore MJ, Ahmed Y, Bentrem DJ, Jordan VC, Tonetti DA. Novel Antitumor Effect of Estradiol in Athymic Mice Injected with a T47D Breast Cancer Cell Line Overexpressing Protein Kinase Calpha. *Clinical Cancer Research*. 2001;7:3156-65.
- Yao K, Lee E-S, Bentrem DJ, England G, Schafer JIM, O'Regan RM, *et al.* Antitumor Action of Physiological Estradiol on Tamoxifen-stimulated Breast Tumors Grown in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research*. 2000;6:2028-36.
- Kennedy BJ. Massive estrogen administration in premenopausal women with metastatic breast cancer. *Cancer*. 1962;15:641-8.

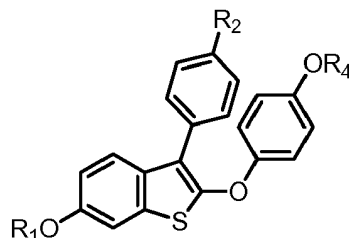
10. Ingle JN, Ahmann DL, Green SJ, Edmonson JH, Bisel HF, Kvols LK, *et al.* Randomized Clinical Trial of Diethylstilbestrol versus Tamoxifen in Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1981;304:16-21.
- 5 11. White BP, Molloy ME, Zhao H, Zhang Y, Tonetti DA. Raloxifene and estradiol-induced tumor regression in tamoxifen-resistant T47D:A18/PKC α is accompanied by ER α translocation to extranuclear sites (submitted). *Molecular Cancer Research*. 2012.
12. Abdelhamid R, Luo J, Vandevrede L, Kundu I, Michalsen B, Litosh VA, *et al.* Benzothiophene Selective Estrogen Receptor Modulators Provide Neuroprotection by a novel GPR30-dependent Mechanism. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2:256-68.
- 10 13. Catherino WH, Jordan VC. Increasing the number of tandem estrogen response elements increases the estrogenic activity of a tamoxifen analogue. *Cancer Letters*. 1995;92:39-47.
14. O'Regan RM, Cisneros A, England GM, Chatterton R, Dragan YP. Effects of the Antiestrogens Tamoxifen, Toremifene, and ICI 182,780 on Endometrial Cancer Growth. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90:1552-8.
- 15 15. Zhang Y, Zhao H, Asztalos S, Chisamore M, Sitabkhan Y, Tonetti DA. Estradiol-Induced Regression in T47D:A18/PKC α Tumors Requires the Estrogen Receptor and Interaction with the Extracellular Matrix. *Molecular Cancer Research*. 2009;7:498-510.
16. Overk CR, Peng KW, Asghodom RT, Kastrati I, Lantvit DD, Qin Z, *et al.* Structure-activity relationships for a family of benzothiophene selective estrogen receptor modulators including raloxifene and arzoxifene. *ChemMedChem*. 2007;2:1520-6.
- 20 17. Qin Z, Kastrati I, Chandrasena RE, Liu H, Yao P, Petukhov PA, *et al.* Benzothiophene selective estrogen receptor modulators with modulated oxidative activity and receptor affinity. *J Med Chem*. 2007;50:2682-92.
18. Yu B, Dietz BM, Dunlap T, Kastrati I, Lantvit DD, Overk CR, *et al.* Structural modulation of reactivity/activity in design of improved benzothiophene selective estrogen receptor modulators: induction of chemopreventive mechanisms. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:2418-28.
- 25 19. Qin Z, Kastrati I, Ashgodom RT, Lantvit DD, Overk CR, Choi Y, *et al.* Structural modulation of oxidative metabolism in design of improved benzothiophene selective estrogen receptor modulators. *Drug Metab Dispos*. 2009;37:161-9.
20. Snyder KR, Sparano N, Malinowski JM. Raloxifene hydrochloride. *Am J Health Syst Pharm*. 2000;57:1669-75; quiz 76-8.
- 30 21. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;85:23-9.
22. Palkowitz AD, Glasebrook AL, Thrasher KJ, Hauser KL, Short LL, Phillips DL, *et al.* Discovery and synthesis of [6-hydroxy-3-[4-[2-(1-piperidiny)ethoxy]phenoxy]-2-(4-hydroxyphenyl)]benzo[b]thiophene: a novel, highly potent, selective estrogen receptor modulator. *J Med Chem*. 1997;40:1407-16.
- 35 23. Suh N, Glasebrook AL, Palkowitz AD, Bryant HU, Burris LL, Starling JJ, *et al.* Arzoxifene, a new selective estrogen receptor modulator for chemoprevention of experimental breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61:8412-5.
24. Burke TW, Walker CL. Arzoxifene as therapy for endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2003;90:S40-6.
25. Buzdar A, O'Shaughnessy JA, Booser DJ, Pippen JE, Jr., Jones SE, Munster PN, *et al.* Phase II, randomized, double-blind study of two dose levels of arzoxifene in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:1007-14.
- 40 26. Liu H, Liu J, van Breemen RB, Thatcher GRJ, Bolton JL. Bioactivation of the selective estrogen receptor modulator desmethylated arzoxifene to quinoids: 4'-fluoro substitution prevents quinoid formation. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:162-73.
27. Liu H, Bolton JL, Thatcher GRJ. Chemical modification modulates estrogenic activity, oxidative reactivity, and metabolic stability in 4'-F-DMA, a new benzothiophene selective estrogen receptor modulator. *Chem Res Toxicol*. 2006;19:779-87.
- 45 28. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM, *et al.* Endometrial Cancer in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients: Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86:527-37.
- 50

29. Grese TA, Sluka JP, Bryant HU, Cullinan GJ, Glasebrook AL, Jones CD, *et al.* Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:14105-10.
- 5 30. Grese TA, Cho S, Finley DR, Godfrey AG, Jones CD, Lugar CW, 3rd, *et al.* Structure-activity relationships of selective estrogen receptor modulators: modifications to the 2-arylbenzothiophene core of raloxifene. *J Med Chem.* 1997;40:146-67.
31. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, *et al.* Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest.* 1994;93:63-9.
- 10 32. Fuchs-Young R, Glasebrook AL, Short LL, Draper MW, Rippey MK, Cole HW, *et al.* Raloxifene is a tissue-selective agonist/antagonist that functions through the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;761:355-60.
33. Ellis MJ, Gao F, Dehdashti F, Jeffe DB, Marcom PK, Carey LA, *et al.* Lower-Dose vs High-Dose Oral Estradiol Therapy of Hormone Receptor-Positive, Aromatase Inhibitor-Resistant Advanced Breast Cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 2009;302:774-80.
- 15 34. Lønning PE, Taylor PD, Anker G, Iddon J, Wie L, Jørgensen L-M, *et al.* High-dose estrogen treatment in postmenopausal breast cancer patients heavily exposed to endocrine therapy. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2001;67:111-6.
35. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2001;12:152-6.
- 20 36. Song RX-D, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, *et al.* Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by EROE±-Shc Association and Shc Pathway Activation. *Molecular Endocrinology.* 2002;16:116-27.
37. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, *et al.* PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 2001;20:6050-9.
38. Pietras RJ, Marquez-Garban DC. Membrane-Associated Estrogen Receptor Signaling Pathways in Human Cancers. *Clinical Cancer Research.* 2007;13:4672-6.
- 25 39. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, *et al.* Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science.* 2009;324:787-90.
40. Clegg NJ, Wongvipat J, Joseph JD, Tran C, Ouk S, Dilhas A, *et al.* ARN-509: A Novel Antiandrogen for Prostate Cancer Treatment. *Cancer Research.* 2012;72:1494-503.
41. Ingle J. Estrogen as therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4:133 - 6.
- 30 42. Song RXD, Santen RJ. Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis.* 2003;8:55-60.
43. Ingle JN. Sequencing of Endocrine Therapy in Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2004;10:362s-7s.
- 35 44. Jordan VC, Obiorah I, Fan P, Kim HR, Ariazi E, Cunliffe H, *et al.* The St. Gallen Prize Lecture 2011: Evolution of long-term adjuvant anti-hormone therapy: consequences and opportunities. *The Breast.* 2011;20, Supplement 3:S1-S11.
45. Peethambaram PP, Ingle JN, Suman VJ, Hartmann LC, Loprinzi CL. Randomized trial of diethylstilbestrol vs. tamoxifen in postmenopausal women with metastatic breast cancer. An updated analysis. *Breast Cancer Research and Treatment.* 1999;54:117-22.
- 40 46. Osipo C, Gajdos C, Cheng D, Jordan VC. Reversal of tamoxifen resistant breast cancer by low dose estrogen therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2005;93:249-56.
47. Osipo C, Gajdos C, Liu H, Chen B, Jordan VC. Paradoxical Action of Fulvestrant in Estradiol-Induced Regression of Tamoxifen-Stimulated Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95:1597-608.
48. Liu H, Lee E-S, Gajdos C, Pearce ST, Chen B, Osipo C, *et al.* Apoptotic Action of 17β-Estradiol in Raloxifene-Resistant MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95:1586-97.
- 45 49. Santen RJ, Song RX, Zhang Z, Yue W, Kumar R. Adaptive Hypersensitivity to Estrogen. *Clinical Cancer Research.* 2004;10:337s-45s.
50. Song RX-D, Mor G, Naftolin F, McPherson RA, Song J, Zhang Z, *et al.* Effect of Long-Term Estrogen Deprivation on Apoptotic Responses of Breast Cancer Cells to 17β-Estradiol. *Journal of the National Cancer Institute.* 2001;93:1714-23.

51. Lewis JS, Osipo C, Meeke K, Jordan VC. Estrogen-induced apoptosis in a breast cancer model resistant to long-term estrogen withdrawal. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;94:131-41.
52. Shim W-S, Conaway M, Masamura S, Yue W, Wang J-P, Kumar R, *et al.* Estradiol Hypersensitivity and Mitogen-Activated Protein Kinase Expression in Long-Term Estrogen Deprived Human Breast Cancer Cells in Vivo. *Endocrinology*. 2000;141:396-405.
53. Liu, H.; Qin, Z.; Thatcher, G. R.; Bolton, J. L. Uterine peroxidase-catalyzed formation of diquinone methides from the selective estrogen receptor modulators raloxifene and desmethylated arzoxifene. *Chem Res Toxicol* 2007, 20, 1676-84.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno en un sujeto que necesita tal tratamiento, donde el trastorno médico relacionado con estrógeno se selecciona del grupo consistente en cáncer, inflamación, osteoporosis, atrofia vaginal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades del sistema cardiovascular, y donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I-vii)



(I-vii)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

10 donde

R₁ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R₂ se selecciona del grupo consistente en halo y -OR₃;

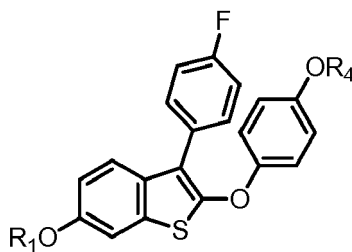
R₃ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

R₄ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, -SO₃R^{x1}, -PO₃R^{y1}R^{z1} y -C(=O)R^a;

15 R^a se selecciona en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en -OH y alquilo; y

R^{x1}, R^{y1} y R^{z1} se seleccionan en cada ocasión, de manera independiente, del grupo consistente en hidrógeno y un catión farmacéuticamente aceptable.

2. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según la reivindicación 1, donde el al menos un compuesto tiene la fórmula (I-viii),

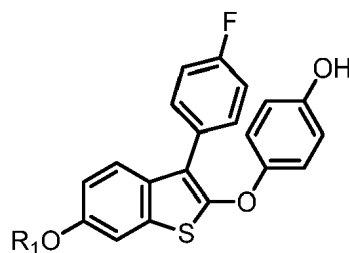


(I-viii)

20

donde R₁ y R₄ son como se han definido en la reivindicación 1.

3. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según la reivindicación 1, donde el al menos un compuesto tiene la fórmula (I-ix),

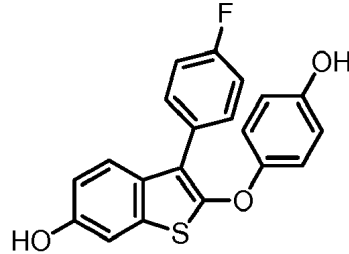


(I-ix)

25

donde R₁ es como se ha definido en la reivindicación 1.

4. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según la reivindicación 1, donde el al menos un compuesto tiene la fórmula (I-x),



5 (I-x).

5. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según la reivindicación 1, donde el al menos un compuesto se selecciona del grupo consistente en:

3-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenoxi)benzo[b]tiofen-6-ol; y

4-((3-(4-fluorofenil)-6-metoxibenzo[b]tiofen-2-il)oxi)fenol;

10 o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

6. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las enfermedades del sistema nervioso central se seleccionan del grupo consistente en enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve y el cáncer se selecciona del grupo consistente en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón.

15 7. La composición para uso en el tratamiento de un trastorno médico relacionado con estrógeno según la reivindicación 6, donde el cáncer de mama es un cáncer de mama resistente a tamoxifeno o cáncer de mama triple negativo.