

Traduzione in italiano del brevetto europeo n. 3 122 426 avente titolo "METODO DI CURA DEL CANCRO DELLA MAMMELLA MEDIANTE L'UTILIZZO DI MODULATORI SELETTIVI DEL RECETTORE DEGLI ESTROGENI".

5           **DICHIARAZIONE DI INTERESSE GOVERNATIVO**

[0002] Questa invenzione è stata fatta con il sostegno del Governo, con riferimento R37DK048807 assegnato dai National Institutes of Health. Il Governo ha alcuni diritti nell'invenzione.

**AMBITO TECNICO**

10           [0003] La presente invenzione si riferisce a un composto per l'utilizzo nella cura di un cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni in un soggetto, dove il cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni e dove detto composto è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM).

15           **BASI**

[0004] Il recettore degli estrogeni (ER) è un fattore di trascrizione dipendente dal ligando la cui espressione conferisce alle cellule obiettivo la capacità di rispondere agli estrogeni. In assenza di un ligando attivatore, ER risiede nella cellula in forma inattiva all'interno di un grande complesso proteico inibitore. In seguito al legame del ligando, tuttavia, il recettore subisce un cambiamento conformazionale attivante che ne determina il rilascio dal complesso proteico inibitore, la spontanea dimezzazione e la successiva interazione con gli enhancer situati all'interno dei geni obiettivo. A seconda del contesto dei promotori del recettore legato e dei cofattori che sono reclutati verso il recettore in

20



una particolare cellula, esso può regolare positivamente o negativamente la trascrizione del gene obiettivo. Quindi, lo stesso complesso ER-ligando può avere attività molto diverse in cellule diverse, un'osservazione che spiega come gli estrogeni, generalmente considerati ormoni riproduttivi, esibiscono attività nelle ossa, nel sistema cardiovascolare e nel cervello che non sono correlate alla funzione riproduttiva.

5 [0005] Sebbene i determinanti molecolari dell'azione di ER differiscano notevolmente tra le cellule obiettivo, si è previsto che lo sfruttamento di questa complessità produrrà sostanze farmaceutiche con attività selettive per processo o tessuto. La prima prova a sostegno di questa ipotesi è venuta da studi che hanno sondato le attività farmacologiche dello "antiestrogeno" tamoxifene. Identificato come antagonista di ER ad alta affinità e sviluppato come cura per il cancro della mammella ER-positivo, è diventato ben presto evidente che, sebbene il tamoxifene potesse opporsi all'azione degli estrogeni nella mammella, esso esibiva un'attività di agonista nelle ossa, nell'utero e nel sistema cardiovascolare. In considerazione di questo spettro di attività, il tamoxifene è stato riclassificato come modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM).

15 [0006] Il cancro della mammella rimane il cancro più comunemente diagnosticato tra le donne e una delle principali cause di mortalità per cancro. Sebbene le terapie mirate, come il SERM tamoxifene e gli inibitori dell'aromatasi, siano inizialmente efficaci nella cura dei tumori positivi al recettore degli estrogeni alfa (ESR1), la resistenza de novo e acquisita rimane un ostacolo a risposte cliniche durature, in particolare nel contesto della malattia avanzata. ESR1 è un obiettivo terapeutico nei cancri della mammella che sono resistenti agli interventi endocrini di prima e seconda linea, una scoperta che ha sollecitato lo sviluppo (a) di SERM con un meccanismo distinto da quello del tamoxifene e (b) di degradatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERD), antagonisti competitivi la cui interazione con ESR1 induce la sua degradazione dipendente dal proteasoma. Il fulvestrant, un SERD, si è dimostrato efficace come terapia di prima e di seconda linea nel cancro della mammella avanzato;



tuttavia, le proprietà farmaceutiche di questo farmaco possono risultare limitanti per la dose nei tumori della mammella recidivi/resistenti che recano mutazioni di ESR1 note per ridurre la potenza dei SERD. L'efficacia clinica del fulvestrant, un degradatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERD) che innesca la degradazione del recettore, ha confermato che ESR1 rimane spesso coinvolto nei cancri resistenti alla terapia endocrina.

[0007] L'aumento dell'incidenza di metastasi cerebrali da carcinoma mammario (BCBM) rappresenta una sfida emergente nella cura delle pazienti con cancro della mammella in fase avanzata. Il crescente successo delle migliori cure della malattia sistemica ha permesso la manifestazione di BCBM che in precedenza non avrebbero avuto un impatto sulla morbilità e sulla mortalità associate al cancro della mammella. L'ambiente privilegiato del cervello, mantenuto dalla barriera emato-encefalica relativamente non porosa, rappresenta un ostacolo significativo alla possibilità di colpire con successo le BCBM, determinando il ricorso alla chirurgia Gamma Knife e/o alla radioterapia dell'intero cervello nel tentativo di ridurre o asportare le lesioni cerebrali. Bisogna soppesare attentamente i benefici di questi trattamenti con il deficit neurologico che ne consegue.

[0008] Sebbene si siano compiuti notevoli progressi nella capacità di colpire l'asse di segnalazione degli estrogeni per la cura del cancro della mammella e dell'osteoporosi, purtroppo non si sono ancora compiuti progressi analoghi nello sviluppo di cure sicure ed efficaci per le patologie del climaterio o i disturbi vasomotori che sono associati alla privazione degli estrogeni. Esiste un notevole interesse per lo sviluppo di nuovi SERM che possano essere utilizzati per curare i sintomi vasomotori, ma che non esibiscano attività mitogene nella mammella o nell'utero.

[0009] Sebbene il tamoxifene e gli inibitori dell'aromatasi si siano dimostrati efficaci nella cura del cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni (ER+), l'incidenza della resistenza rimane significativa, in particolare nel contesto del cancro della mammella avanzato/metastatico. Re-



centemente è emersa una classe aggiuntiva di terapie mirate al recettore degli estrogeni, i degradatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERD). Questi agenti si sono dimostrati efficaci nei modelli preclinici di cancro della mammella che sono resistenti al tamoxifene o agli inibitori dell'aromatasi, conducendo alla loro valutazione in sperimentazioni cliniche. Tuttavia, anche questi agenti non superano facilmente la barriera emato-encefalica, suggerendo che saranno inefficaci nel colpire le BCBM. Sarebbe utile disporre di altre opzioni di cura in grado di penetrare la barriera emato-encefalica e/o di mirare selettivamente alle attività specifiche dei tessuti che rispondono all'attivazione di ER.

WO 2009/137104 A1 divulga una terapia combinata per il cancro della mammella che comprende un agente antiestrogenico. La caratterizzazione delle proprietà dei farmacofori dei nuovi sottoregolatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERD) è divulgata in Karen J. Kieser et al., 2010, *J. Med. Chem.*, 53: 3320–3329.

## SOMMARIO

[0010] L'oggetto dell'invenzione è come esposto nelle rivendicazioni allegate. I riferimenti a metodi di cura nei successivi paragrafi di questa descrizione devono interpretarsi come riferimenti ai composti, alle composizioni farmaceutiche e ai medicinali della presente invenzione per l'utilizzo in un metodo per la cura del corpo umano (o animale) mediante terapia.

[0011] Un aspetto dell'invenzione si riferisce a un composto di (R)-6-{2-{etil[4-(2-etilamminoeetil)benzil]ammino}-4-metossifenil}-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-olo per l'utilizzo nella cura di un cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni in un soggetto, dove il cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni e dove il composto è somministrato in una quantità efficace compresa tra circa 200 mg/giorno e circa 500 mg/giorno.



[0012] Le forme di realizzazione preferite sono esposte nelle sotto-rivendicazioni.

[0015] Il cancro può essere resistente de novo al modulatore del recettore degli estrogeni. La resistenza al modulatore del recettore degli estrogeni può essere acquisita. Il modulatore del recettore degli estrogeni può essere un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM). Il SERM  
5 può essere tamoxifene, idoxifene, raloxifene o ICI 182,780. Il composto può essere somministrato mediante somministrazione orale, somministrazione endovenosa, iniezione intradermica, iniezione intramuscolare o iniezione sottocutanea. Il composto per l'utilizzo secondo la rivendicazione 1 può inoltre comprendere la somministrazione di una quantità efficace di almeno un composto selezionato nel gruppo costituito da un inibitore di chinasi ciclina-dipendente 4 e 6 (inibitore di CDK4/6), un  
10 antiestrogeno, un ligando del recettore dell'acido retinoico o del recettore X dei retinoidi, un antiprogesterinico, un antiandrogeno, vitamina D o un suo metabolita, un inibitore di farnesil transferasi, un agonista di PPAR $\alpha$  o gamma e un inibitore di MAP chinasi.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

15 [0016] La Figura 1 mostra che la cura con (R)-6-(2-{etil[4-(2-etilamminoetil)benzil]ammino}-4-metossifenil)-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-olo ("RAD1901") determina una riduzione dipendente dalla dose dell'espressione e dell'attività di ER. La Figura 1A mostra che si sono trattate cellule di cancro della mammella MCF7 4 ore, come indicato, prima della rilevazione mediante Western blot di ER e del controllo di caricamento citocheratina (CK) 18. La Figura 1B mostra che si sono trattati topi ovarietomizzati recanti tumori MCF7 xenotrapiantati giornalmente con RAD1901 ("RAD") o tamoxifene  
20 ("Tam") nel contesto di un trattamento estrogenico continuato.

[0017] La Figura 2 mostra il meccanismo mediante il quale RAD1901 sottoregola l'espressione



di ER. La Figura 2A mostra l'espressione proteica di ER $\alpha$  in estratti cellulari interi pretrattati con inibitori di trascrizione o di traduzione prima del trattamento con RAD1901, analizzata mediante immunoblot. La Figura 2B mostra l'espressione di mRNA di ER $\alpha$  in cellule trattate in modo simile.

5 [0018] La Figura 3 mostra l'interazione tra ER e peptidi specifici per conformazione in un sistema a doppio ibrido di mammifero.

[0019] La Figura 4 mostra che RAD1901 esibisce una regolazione agonista/antagonista dipendente dalla dose della transattivazione da parte di ER di geni obiettivo.

[0020] Le Figure 5A–5F mostrano che RAD1901 inibiva l'attività di ESR1 in vitro e in vivo.

10 [0021] Le Figure 6A–6D mostrano che RAD1901 sottoregolava l'espressione di ESR1 attraverso la degradazione del recettore.

[0022] Le Figure 7A–7C mostrano che gli effetti di RAD1901 sulle cellule di cancro della mammella BT483 erano simili a quelli osservati nelle cellule MCF7.

[0023] Le Figure 8A–8C mostrano che la farmacologia in vivo di RAD1901 era influenzata dall'attività del SERD.

15 [0024] Le Figure 9A–9E mostrano che RAD1901 esibiva una stimolazione della crescita dipendente dalla dose dei tumori MCF7 xenotrapiantati.

[0025] Le Figure 10A–10E mostrano che RAD1901 esercitava un'attività bifasica di agonista/antagonista su ESR1 in modo dipendente dalla dose.

20 [0026] La Figura 11 mostra la variazione relativa dell'espressione di geni obiettivo di ESR1 e altri geni obiettivo che rispondevano agli agonisti, principalmente a SERM o a SERM e agli agonisti.

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA

[0027] La presente divulgazione fornisce un metodo di cura di un soggetto affetto da cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni che è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni, come un cancro della mammella resistente al tamoxifene. Il metodo prevede la somministrazione al soggetto di un SERM, ossia RAD1901. RAD1901 è un ibrido SERM/SERD che esibisce una farmacologia complessa e unica in modelli di cancro della mammella e ha un'attività di agonista/antagonista dipendente dalla dose mostrata in modo selettivo per tessuto. RAD1901 esibisce le attività farmacologiche desiderate ed esibisce una significativa penetrazione nel cervello quando valutato in donne in postmenopausa, in particolare una risposta unica alla dose, con le dosi inferiori del farmaco più efficaci nell'alleviare le vampate di calore. RAD1901 induce vampate di calore nelle donne sane in postmenopausa in modo dipendente dalla dose, quindi RAD1901 può inibire efficacemente l'azione del recettore degli estrogeni nel cervello.

[0028] Il ricambio di ER $\alpha$  aumentava significativamente in seguito al legame con RAD1901, un'attività che è più pronunciata a concentrazioni più alte del farmaco (Figura 1). Questo farmaco esibisce alcune delle caratteristiche che sono generalmente attribuite ai degradatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERD). Quindi, alle dosi inferiori, RAD1901 esibisce una parziale attività di agonista, ossia attività di SERM, che consente di alleviare le vampate di calore, ma l'attività di SERD del composto domina quando il recettore è esposto a concentrazioni più alte. La presente divulgazione descrive in vitro il meccanismo con il quale RAD1901 influenza l'espressione di ER e studia il possibile risultato di questa azione in vivo.

[0029] Come esemplificato in seguito, RAD1901 ha inaspettatamente la capacità di degradare il recettore degli estrogeni. Studi in vitro e in vivo hanno poi dimostrato che l'attività di antagonista di questo ligando è correlata alla degradazione del recettore degli estrogeni in modo dipendente dalla



dose. RAD1901 inibisce anche la crescita dipendente dagli estrogeni di tumori xenotrapiantati di cancro della mammella e si può utilizzare per curare il cancro della mammella, come il cancro della mammella resistente al tamoxifene.

[0030] RAD1901 è unico tra i SERM e i SERD in quanto questo farmaco si accumula nel cervello, un ambiente in cui la penetrazione dei SERM è storicamente considerata piuttosto bassa. Si è scoperto che l'attività del recettore degli estrogeni è importante nella crescita dei tumori resistenti agli inibitori dell'aromatasi e/o al tamoxifene e si è mostrato che la cura con i SERD ha un beneficio clinico. Anche se la rivelazione che RAD1901 esibisce attività di SERD suggerisce certamente una potenziale utilità nella cura dei tumori della mammella ER+ in progressione, cosa che non era stata apprezzata prima della presente divulgazione, l'indirizzamento dell'attività di ER alla cura dei cancri del cervello ER+ rappresenta una nuova frontiera per l'utilizzo sia dei SERM sia dei SERD, in quanto RAD1901 rappresenta il primo SERM/SERD che può penetrare sufficientemente nel cervello per esibire un'efficacia. Poiché le BCBM sono generalmente diagnosticate tardi nella progressione della malattia del cancro della mammella metastatico ER+, in genere le pazienti sono già state trattate con terapie endocrine (ossia tamoxifene o inibitori dell'aromatasi). Quindi, anche se i SERM come il tamoxifene hanno una bassa penetrazione nel cervello e hanno esibito un'efficacia in casi aneddotici di BCBM che sono dettagliati nella letteratura, l'attività di SERD di RAD1901 diventa la chiave per il potenziale terapeutico di questo composto per la cura delle BCBM, in quanto si è scoperto che i SERD sono efficaci nei cancri della mammella che sono resistenti alla terapia con i SERM o gli inibitori dell'aromatasi.

## 1. Definizioni

[0031] I termini "comprende", "include", "avente", "ha", "può", "contiene" e le varianti di questi, come qui utilizzati, intendono essere espressioni, termini o parole transitori aperti che non precludono la possibilità di atti o strutture aggiuntivi. Le forme singolari "un", "uno", "il" e simili includono i riferimenti plurali salvo nei casi in cui il contesto indichi chiaramente altrimenti. La presente divulgazione contempla anche altre forme di realizzazione "che comprendono", "sono costituite da" e "sono costituite essenzialmente da" le forme di realizzazione o gli elementi qui presentati, siano essi esplicitamente esposti o meno.

[0032] Per l'indicazione degli intervalli numerici nel presente documento, è esplicitamente contemplato ciascun numero interposto al loro interno con lo stesso grado di precisione. Per esempio, per l'intervallo 6–9, sono contemplati oltre a 6 e 9 i numeri 7 e 8 e, per l'intervallo 6.0–7.0, sono esplicitamente contemplati i numeri 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 e 7.0.

[0033] Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici qui utilizzati hanno lo stesso significato comunemente compreso da un ordinario esperto del settore. In caso di conflitto, avrà il controllo il presente documento, con l'inclusione delle definizioni. Sono descritti in seguito i metodi e i materiali preferiti, sebbene si possano utilizzare metodi e materiali simili o equivalenti a quelli qui descritti nella pratica o nel test della presente invenzione. I materiali, i metodi e gli esempi qui divulgati sono solamente illustrativi e non intendono porre limitazioni.

[0034] Il termine "somministrazione", come qui utilizzato, si riferisce alla fornitura, alla messa in contatto e/o al rilascio del SERM mediante qualsiasi via adeguata per raggiungere l'effetto desiderato. Si possono somministrare questi agenti a un soggetto in molti modi, con l'inclusione, senza limitazione, delle vie orale, oculare, nasale, endovenosa, topica, come aerosol, supposta, etc., e si possono utilizzare in combinazione.



[0035] "Inibitore dell'aromatasi", come qui utilizzato, si riferisce a un composto che ha come obiettivo l'aromatasi, che è un enzima coinvolto nella biosintesi degli estrogeni. Gli inibitori dell'aromatasi possono bloccare la produzione degli estrogeni o bloccare l'azione degli estrogeni sui recettori.

5 [0036] "Barriera emato-encefalica" o "BEE", come qui utilizzata, si riferisce a una barriera con permeabilità altamente selettiva che separa il sangue in circolazione dal fluido extracellulare del cervello nel sistema nervoso centrale. La barriera emato-encefalica può evitare che certi farmaci entrino nel tessuto cerebrale ed un fattore limitante nel rilascio di molti agenti somministrati a livello periferico per il sistema nervoso centrale.

10 [0037] "Cancro della mammella", come qui utilizzato, si riferisce a un tipo di cancro che ha origine e si sviluppa nella mammella. "Cancro della mammella metastatico" si riferisce a un cancro della mammella che si diffonde al di fuori della mammella nei linfonodi, nelle ossa o in altre aree.

[0038] "Metastasi cerebrali da carcinoma mammario" e "BCBM", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un cancro della mammella che ha prodotto metastasi nel cervello. Le BCBM  
15 possono verificarsi in una percentuale fino al 10–15% delle pazienti con cancro della mammella. Le BCBM possono progredire rapidamente e possono produrre complicanze potenzialmente letali, come l'aumento della pressione intracranica, l'erniazione del cervello e convulsioni. La radioterapia è un trattamento della BCBM in quanto arresta rapidamente la progressione del tumore e può indurre una risposta nella maggior parte delle pazienti.

20 [0039] "Cancro", come qui utilizzato, si riferisce alla crescita incontrollata e sovraregolata di cellule anomale nel corpo. Le cellule cancerose sono chiamate anche cellule maligne. Il cancro può invadere le parti vicine del corpo e può anche diffondersi a parti più distanti del corpo attraverso il sistema linfatico o il flusso sanguigno. I cancri includono carcinoma corticosurrenale, cancro anale,



cancro della vescica, tumore del cervello, cancro della mammella, tumore carcinoide, cancro gastrointestinale, carcinoma di origine primaria sconosciuta, cancro della cervice, cancro del colon, cancro endometriale, cancro esofageo, cancro del dotto biliare extraepatico, tumori della famiglia di Ewing (PNET), tumore extracranico delle cellule germinali, cancro dell'occhio con melanoma intraoculare, cancro della cistifellea, cancro gastrico (dello stomaco), tumore extragonadico delle cellule germinali, tumore trofoblastico gestazionale, cancro della testa e del collo, cancro ipofaringeo, carcinoma delle cellule delle isole pancreatiche, cancro del rene (cancro delle cellule renali), cancro laringeo, leucemia linfoblastica acuta, leucemia, leucemia mieloide acuta, leucemia linfatica cronica, leucemia mieloide cronica, tricoleucemia, cancro della cavità orale e labiale, cancro del fegato, cancro polmonare non a piccole cellule, cancro polmonare a piccole cellule, linfoma correlato ad AIDS, linfoma del sistema nervoso centrale (primario), linfoma cutaneo a cellule T, linfoma da malattia di Hodgkin, linfoma da malattia non Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma a cellule di Merkel, cancro metastatico squamoso del collo con sede primaria occulta, mieloma multiplo e altri neoplasmi delle cellule plasmatiche, micosi fungoide, sindrome mielodisplastica, disturbi mieloproliferativi, cancro rinofaringeo, neuroblastoma, cancro orale, cancro orofaringeo, osteosarcoma, cancro epiteliale ovarico, tumore ovarico delle cellule germinali, cancro del pancreas, cancro del pancreas endocrino, carcinoma delle cellule delle isole pancreatiche, cancro del seno paranasale e della cavità nasale, cancro della paratiroide, cancro del pene, cancro pituitario, neoplasma delle cellule plasmatiche, cancro della prostata, rhabdomyosarcoma, cancro rettale, cancro delle cellule renali (cancro del rene), cancro delle cellule transizionali della pelvi renale e dell'uretere, cancro della ghiandola salivare, sindrome di Sézary, cancro della pelle, cancro dell'intestino tenue, sarcoma dei tessuti molli, cancro del testicolo, timoma maligno, cancro della tiroide, cancro uretrale, cancro uterino, cancro insolito dell'infanzia, cancro vaginale, cancro della vulva e tumore di Wilms.



[0040] Il termine "dosaggio efficace", come qui utilizzato, indica un dosaggio di un farmaco efficace per i periodi di tempo necessari per ottenere il risultato terapeutico desiderato. Un dosaggio efficace può essere determinato da un esperto del settore e può variare a seconda di fattori come lo stato della malattia, l'età, il sesso e il peso dell'individuo, e della capacità del farmaco di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. Questo termine, come qui utilizzato, può anche riferirsi a una quantità efficace per comportare un effetto desiderato in vivo in un animale, un mammifero, o un essere umano, come la riduzione e/o l'inibizione della funzione del recettore degli estrogeni. Si può somministrare una quantità terapeuticamente efficace in una o più somministrazioni (p. es. si può dare l'agente come cura preventiva o in modo terapeutico in qualsiasi fase della progressione della malattia, prima o dopo i sintomi e simili), applicazioni o dosaggi e non si intende limitarsi a una particolare formulazione, combinazione o via di somministrazione. Rientra nell'ambito della presente divulgazione il fatto che si può somministrare il SERM in diversi momenti durante il corso della cura del soggetto. I tempi di somministrazione e i dosaggi utilizzati dipenderanno da diversi fattori, come l'obiettivo della cura (p. es. cura rispetto a prevenzione), la condizione del soggetto, etc. e possono essere prontamente determinati da un esperto del settore.

[0041] "Cancro dipendente dagli estrogeni" o "cancro positivo al recettore degli estrogeni", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un tumore che contiene cellule positive al recettore degli estrogeni (ER), ossia cellule che hanno recettori per gli estrogeni e rispondono alla presenza di estrogeni con un aumento della proliferazione. I cancri dipendenti dagli estrogeni possono includere cancro della mammella, cancro ovarico o cancro endometriale. Il "cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni" è un tipo di cancro della mammella che è sensibile agli estrogeni.

[0042] "Recettore degli estrogeni" o "ER", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a



un recettore che è attivato dall'ormone estrogeno ed è un membro della famiglia degli ormoni nucleari dei recettori intracellulari. Esistono due diverse isoforme del recettore degli estrogeni, denominate  $\alpha$  (indicata anche come "ERa") e  $\beta$  (indicata anche come "ERb"). I geni ERa ed ERb sono codificati rispettivamente dai geni ESR1 ed ESR2. I recettori degli estrogeni attivati da ormoni formano dimeri e possono formare omodimeri o eterodimeri. Entrambi gli ER sono ampiamente espressi in diversi tipi di tessuti.

[0043] "Sottoregolatori del recettore degli estrogeni", come qui utilizzato, si riferisce a un farmaco o un composto che si lega a un recettore degli estrogeni e ne sottoregola l'espressione.

[0044] "Cancro della mammella negativo al recettore degli estrogeni" o "cancro della mammella indipendente dagli estrogeni", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un tumore che non contiene cellule positive al recettore degli estrogeni, ossia cellule che sono prive di recettori degli estrogeni, e che non dipende dalla presenza di estrogeni per la proliferazione in corso.

[0045] "Farmaco che interviene su HER2" o "inibitore di HER2", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un composto che ha come obiettivo il recettore del fattore di crescita dell'epidermide 2 (HER2). HER2 è un membro della famiglia dei recettori del fattore di crescita dell'epidermide ed è coinvolto nello sviluppo e nella progressione di certi tipi aggressivi di cancro della mammella, come il cancro della mammella dipendente dagli estrogeni. Un inibitore di HER2 può essere una tirosin-chinasi o un anticorpo monoclonale.

[0046] "Cancro metastatico", come qui utilizzato, si riferisce a un cancro che si è diffuso dalla parte del corpo in cui è partito (il sito primario) ad altre parti del corpo.

[0047] "Cancro positivo al recettore del progesterone", come qui utilizzato, si riferisce a un tumore che contiene cellule positive al recettore del progesterone (PR+), ossia cellule che hanno recet-



tori del progesterone e rispondono alla presenza del progesterone con un aumento della proliferazione.

[0048] "Degradatori selettivi del recettore degli estrogeni" o "SERD", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un composto che interagisce con un ER e induce un cambiamento conformazionale che comporta la degradazione del recettore.

[0049] "Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni" o "SERM", come qui utilizzati indifferentemente, si riferiscono a un composto che interagisce con un ER le cui relative attività di agonista/antagonista si manifestano in modo selettivo per le cellule. La prevenzione del legame degli estrogeni al recettore degli estrogeni può comportare una diminuzione della proliferazione delle cellule cancerose dipendenti dagli estrogeni.

[0050] I termini "soggetto", "paziente" o "soggetto per il metodo", come qui utilizzati indifferentemente, indicano qualsiasi vertebrato, con l'inclusione, senza limitazione, di un mammifero (p. es. vacca, maiale, cammello, lama, cavallo, capra, coniglio, pecora, criceto, cavia, gatto, cane, ratto e topo, un primate non umano (per esempio una scimmia, come una scimmia cynomolgus o un macaco rhesus, uno scimpanzé, etc.) e un essere umano). In alcune forme di realizzazione, il soggetto può essere umano o non umano. In alcune forme di realizzazione, il soggetto può essere un soggetto umano a rischio di sviluppare il cancro o già affetto da cancro.

[0051] "Cancro della mammella resistente al tamoxifene", come qui utilizzato, si riferisce a un cancro della mammella che non risponde alla cura con tamoxifene.

[0052] "Curare", "cura" o "trattamento" sono ciascuno qui utilizzati indifferentemente per descrivere l'inversione, l'alleviamento o l'inibizione della progressione di una malattia o di uno o più sintomi di questa malattia, a cui si applicano questi termini. A seconda delle condizioni del soggetto, il termine si riferisce anche alla prevenzione di una malattia e include la prevenzione dell'insorgenza di



una malattia, o la prevenzione dei sintomi associati a una malattia. Si può eseguire una cura in modo acuto o cronico. Il termine si riferisce anche alla riduzione della gravità di una malattia o dei sintomi associati a questa malattia prima della sofferenza della malattia. Questa prevenzione o riduzione della gravità di una malattia prima della sofferenza si riferisce alla somministrazione del SERM a un  
5 soggetto che al momento della somministrazione non soffre della malattia. "Prevenzione" si riferisce anche alla prevenzione della recidiva di una malattia o di uno o più sintomi associati a questa malattia. "Cura" e "in modo terapeutico" si riferiscono all'atto del curare, dove "curare" è come definito in precedenza.

## 10 **2. Metodi di cura del cancro con un SERM**

[0053] La presente invenzione è diretta a un composto per l'utilizzo secondo la rivendicazione  
1.

[0054] Esempi di altri SERM sono descritti nel Brevetto US n. 7,612,114, nel Brevetto US n. 7,960,412, nel Brevetto US n. 8,399,520, nella Pubblicazione di brevetto US n. 2009-0325930 e nella  
15 Pubblicazione di brevetto US n. 2006-0116364. Si può somministrare una quantità efficace del composto.

### **(a) Dosaggi**

[0055] In generale, il dosaggio del SERM somministrato varierà in funzione di fattori come  
20 l'età, il peso, l'altezza, il sesso, la condizione medica generale e l'anamnesi medica precedente del paziente. Si possono adattare i regimi di dosaggio per fornire la risposta desiderata ottimale (p. es. una risposta terapeutica o di profilassi). Per esempio, si può somministrare un singolo bolo, si possono



somministrare diverse dosi suddivise nel tempo o si può ridurre o aumentare proporzionalmente la dose come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. È specialmente vantaggioso formulare composizioni parenterali in forma di unità di dosaggio per facilitare la somministrazione e l'uniformità del dosaggio. La forma in unità di dosaggio, come qui utilizzata, si riferisce a unità fisicamente  
5 distinte adattate come dosaggi unitari per i soggetti mammiferi da testare; dove ciascuna unità contiene una quantità predeterminata di composto attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il vettore farmaceutico richiesto. La specifica per le forme in unità di dosaggio della presente invenzione è dettata e direttamente dipendente (a) dalle caratteristiche uniche del composto attivo e dal particolare effetto terapeutico o di profilassi da raggiungere e (b) dalle  
10 limitazioni intrinseche alla lavorazione di questo composto attivo per il trattamento della sensibilità negli individui.

[0056]

[0057] Il SERM è somministrato a una paziente in una quantità compresa tra circa 200 mg/giorno e circa 500 mg/giorno (p. es. 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310,  
15 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 o 500 mg/giorno), con l'inclusione di qualsiasi regime di somministrazione giornaliera a dose singola o multipla che rientra all'interno di quell'intervallo di dose totale giornaliera. Inoltre, un ordinario esperto del settore saprà anche come adattare o modificare variabili come il dosaggio, la posologia e le vie di somministrazione, come opportuno per un dato soggetto.

20 [0058] Inoltre, la dose del SERM può essere determinata da un esperto del settore e può variare a seconda di fattori come lo stato della malattia, l'età, il sesso e il peso dell'individuo, e della capacità del SERM di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. La dose è anche una dose in cui gli effetti tossici o dannosi, se presenti, del SERM sono controbilanciati dagli effetti terapeuticamente benefici. Si deve inoltre comprendere che, per qualsiasi particolare soggetto, si dovrebbero adattare



specifici regimi di dosaggio nel tempo a seconda della necessità dell'individuo e del giudizio professionale della persona che somministra o supervisiona la somministrazione delle composizioni.

#### **b) RAD1901**

- 5 [0059] Il SERM è RAD1901. Si veda la figura 5A. RAD1901 è un modulatore di ESR1 che agisce con una debole attività di agonista parziale alle dosi più basse del composto e come antagonista a dosi più alte. Sebbene RAD1901 possa curare efficacemente i sintomi vasomotori, la sua farmacologia è complessa. RAD1901 è unico tra i SERM in quanto esibisce un'attività di agonista/antagonista complessa e correlata alla dose. Il trattamento di cellule di cancro della mammella positive a ER con
- 10 RAD1901 in cellule MCF7 e BT483 ha determinato una marcata sottoregolazione dell'espressione del recettore dipendente dalla dose. RAD1901 è un SERM unico in quanto risulta avere un'attività di agonista/antagonista relativa nel cervello, che è determinata dalla dose. A basse dosi RAD1901 si comporta come un SERM, in quanto esibisce attività estrogenica. Ad alte dosi RAD1901 può agire come SERD, invertendo la risposta.
- 15 [0060] Sebbene la capacità di colpire l'asse di segnalazione degli estrogeni si sia dimostrata efficace nella cura del cancro della mammella e dell'osteoporosi, è necessario implementare una terapia sicura che attenui la vasomotricità. Sebbene si stia cercando di rispondere a questa esigenza medica non soddisfatta utilizzando complessi estrogenici specifici per tessuto (TSEC) che combinano estrogeni e SERM con l'intento di inibire l'azione degli estrogeni solo in alcuni tessuti (ossia mam-
- 20 mella e utero), i dati clinici preliminari suggeriscono che RAD1901 può raggiungere lo stesso obiettivo medico senza esporre la paziente agli estrogeni. L'evidente sottoregolazione dipendente dalla dose di ER da parte di RAD1901 suggerisce che, a una dose terapeutica (bassa), RAD1901 potrebbe mediare un certo livello di attività di agonista, mentre una dose più alta provoca un'attività di SERM più estesa



e un bloccaggio efficace della trasduzione del segnale degli estrogeni, esacerbando in questo modo i sintomi vasomotori.

[0061] Il legame di RAD1901 consente la presentazione di superfici di interazione proteina-proteina all'interno della regione cerniera (struttura flessibile che collega i domini di legame del DNA e dell'ormone) di ESR1 che sono coinvolte nell'attività di trascrizione. L'identificazione dei co-regolatori che interagiscono con queste superfici su ESR1 consente una definizione della loro importanza nella farmacologia di RAD1901. Con l'aumento dell'occupazione del recettore, questo diventa obiettivo di degradazione, determinando un'inibizione quantitativa della trasduzione del segnale di ESR1. Questo profilo farmacologico assomiglia a quello di un agonista classico, come il 17 $\beta$ -estradiolo, in cui il segnale dell'agonista è interrotto dalla degradazione del recettore dipendente dal proteasoma. Le azioni farmacologiche di RAD1901 rappresentano un disaccoppiamento dalla degradazione dell'attivazione della trascrizione dipendente da ESR1. Alle dosi adeguate, l'attività di SERD manifestata da RAD1901 può tradursi in un'utile attività clinica nel cancro della mammella.

[0062] Come qui divulgato, RAD1901 inibiva l'attivazione di ESR1 da parte degli estrogeni in vitro e in vivo, inibiva la proliferazione delle cellule di cancro della mammella dipendente dagli estrogeni e la crescita dei tumori xenotrapiantati e mediava la sottoregolazione dipendente dalla dose della proteina ESR1. Si è dimostrato che le dosi di RAD1901 che erano insufficienti a indurre la degradazione di ESR1 provocavano l'attivazione dei geni obiettivo di ESR1 e la stimolazione della crescita dei tumori xenotrapiantati. Si può utilizzare RAD1901 come terapia mirata per la cura delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario.

[0063] In alcune forme di realizzazione, una dose bassa di RAD1901 può essere compresa tra circa 0 mg/kg e circa 25 mg/kg, tra circa 0 mg/kg e circa 20 mg/kg, tra circa 0 mg/kg e circa 15 mg/kg, tra circa 0 mg/kg e circa 10 mg/kg, tra circa 0 mg/kg e circa 5 mg/kg, tra circa 1 mg/kg e circa 25 mg/kg, tra circa 1 mg/kg e circa 20 mg/kg, tra circa 1 mg/kg e circa 15 mg/kg, tra circa 1 mg/kg e circa



10 mg/kg, tra circa 1 mg/kg e circa 5 mg/kg, tra circa 2 mg/kg e circa 25 mg/kg, tra circa 2 mg/kg e  
circa 20 mg/kg, tra circa 2 mg/kg e circa 15 mg/kg, tra circa 2 mg/kg e circa 10 mg/kg, tra circa 2  
mg/kg e circa 5 mg/kg, tra circa 3 mg/kg e circa 25 mg/kg, tra circa 3 mg/kg e circa 20 mg/kg, tra circa  
3 mg/kg e circa 15 mg/kg, tra circa 3 mg/kg e circa 10 mg/kg, tra circa 3 mg/kg e circa 5 mg/kg, tra  
5 circa 4 mg/kg e circa 25 mg/kg, tra circa 4 mg/kg e circa 20 mg/kg, tra circa 4 mg/kg e circa 15 mg/kg,  
tra circa 4 mg/kg e circa 10 mg/kg, tra circa 4 mg/kg e circa 5 mg/kg, tra circa 5 mg/kg e circa 25  
mg/kg, tra circa 5 mg/kg e circa 20 mg/kg, tra circa 5 mg/kg e circa 15 mg/kg, tra circa 5 mg/kg e circa  
10 mg/kg, tra circa 5 mg/kg e circa 7.5 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, una dose bassa di  
RAD1901 può essere minore di circa 25 mg/kg, circa 24 mg/kg, circa 23 mg/kg, circa 22 mg/kg, circa  
10 21 mg/kg, circa 20 mg/kg, circa 19 mg/kg, circa 18 mg/kg, circa 17 mg/kg, circa 16 mg/kg, circa 15  
mg/kg, circa 14 mg/kg, circa 13 mg/kg, circa 12 mg/kg, circa 11 mg/kg, circa 10 mg/kg, circa 9 mg/kg,  
circa 8 mg/kg, circa 7 mg/kg, circa 6 mg/kg, circa 5 mg/kg, circa 4 mg/kg, circa 3 mg/kg, circa 2 mg/kg,  
o circa 1 mg/kg.

[0065] RAD1901 è somministrato a una paziente in una quantità compresa tra circa 200  
15 mg/giorno e circa 500 mg/giorno (p. es. 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310,  
320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 o 500  
mg/giorno), con l'inclusione di qualsiasi regime di somministrazione giornaliera a dose singola o mul-  
tipla che rientra all'interno di quell'intervallo di dose totale giornaliera. Inoltre, un ordinario esperto  
del settore saprà anche come adattare o modificare variabili come il dosaggio, la posologia e le vie di  
20 somministrazione, come opportuno per un dato soggetto.

### **3. Metodi di cura di un cancro che è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni**

[0084] I metodi descritti in precedenza sono utilizzati per curare un cancro che è resistente a



un modulatore del recettore degli estrogeni. La resistenza al modulatore del recettore degli estrogeni può essere acquisita. Il modulatore del recettore degli estrogeni può essere un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM). Il SERM può essere tamoxifene, idoxifene, raloxifene o ICI 182,780. Il cancro è cancro della mammella. Il cancro può essere cancro della mammella resistente al tamoxifene.

[0085] Poiché è probabile che le pazienti con diagnosi di BCBM abbiano già avuto una progressione in seguito alle terapie endocrine, si può utilizzare RAD1901 nei tumori della mammella resistenti al tamoxifene e/o agli inibitori dell'aromatasi. RAD1901 può essere utile nel contesto delle BCBM quando combinato con una o più terapie aggiuntive che garantiscano l'inibizione della crescita delle metastasi periferiche.

#### **4. Meccanismi di rilascio**

[0086] Si può formulare il SERM perché sia compatibile con la sua via di somministrazione prevista. Gli esempi di vie di somministrazione includono, senza limitazione, le somministrazioni parenterale, p. es. endovenosa, intradermica, sottocutanea, orale, intranasale (p. es. per inalazione), transdermica (p. es. topica), transmucosale e rettale. In una specifica forma di realizzazione, il SERM è formulato secondo procedure abituali come una composizione farmaceutica adattata per la somministrazione endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, orale, intranasale o topica agli esseri umani. Tipicamente, le composizioni per la somministrazione endovenosa sono soluzioni in tampone acquoso isotonic sterile. Ove necessario, la composizione può anche includere un agente solubilizzante e un anestetico locale come la lignocaina per alleviare il dolore nel sito dell'iniezione.

[0087] Sono noti e si possono utilizzare diversi sistemi di rilascio per somministrare uno o più SERM o la combinazione di uno o più SERM e un agente di profilassi o un agente terapeutico utili per



la prevenzione, la gestione, la cura o il miglioramento di un disturbo o di uno o più sintomi di questo, p. es. l'incapsulamento in liposomi, microparticelle, microcapsule, l'endocitosi mediata da recettori (si veda p. es. Wu e Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429–4432), etc. I metodi di somministrazione di un agente di profilassi o terapeutico del SERM includono, senza limitazione, la somministrazione parenterale (p. es. intradermica, intramuscolare, intraperitoneale, endovenosa e sottocutanea), la somministrazione epidurale, la somministrazione intratumorale e la somministrazione mucosale (p. es. le vie intranasale e orale).

#### **5. Cure combinate**

10 [0088] I metodi descritti in precedenza possono includere una cura combinata del composto citato nella rivendicazione 1 con altri farmaci e/o altre terapie per il cancro convenzionali, come una terapia ormonale.

#### **(a) Farmaci combinati**

15 [0089] I metodi possono inoltre includere la somministrazione di una quantità efficace di almeno un composto di un inibitore di chinasi ciclina-dipendente 4 e 6 (inibitore di CDK4/6), un antiestrogeno, un ligando del recettore dell'acido retinoico o del recettore X dei retinoidi, un antiprogestivo, un antiandrogeno, vitamina D o un suo metabolita, un inibitore di farnesil transferasi, un agonista di PPAR $\alpha$  o gamma e un inibitore di MAP chinasi.

20



## **(b) Terapie per il cancro convenzionali**

[0090] Le terapie per il cancro convenzionali possono includere intervento chirurgico, radioterapia, chemioterapia, terapia ormonale e terapia mirata. Gli esempi di intervento chirurgico includono la craniotomia aperta con escissione massimale, che può essere seguita da radioterapia. Gli  
5 esempi di radioterapia includono irradiazione dell'intero cervello, radioterapia frazionata e radiocirurgia, come la radiocirurgia stereotassica, p. es. la radiocirurgia Gamma Knife. Gli esempi di chemioterapia includono antracicline, come doxorubicina (Adriamicina, Doxil), epirubicina (Ellence) e daunorubicina (Cerubidina, DaunoXome), capecitabina (Xeloda), carboplatino (Paraplatin), cisplatino, ciclofosfamide (Cytosan), eribulina (Halaven), fluorouracile (chiamato anche 5-fluorouracile o 5-FU;  
10 Aduvici), gemcitabina (Gemzar), ixabepilone (Ixempra), metotrexato (Ametopterina, Mexate, Folex), mitoxantrone (Novantrone), mutamicina (Mitomicina), taxani, come paclitaxel (Tassolo, Abraxane) e docetaxel (Taxotere), tiotepa (Thioplex), vincristina (Oncovin, Vincasar PES, Vincex) e vinorelbina (Navelbina). Gli esempi di terapia mirata includono trastuzumab (Herceptin), lapatinib (Tykerb), bevacizumab (Avastin), pertuzumab (Perjeta) ed everolimus (Afinitor).

15

### **i. Terapia endocrina (terapia ormonale)**

[0091] La terapia endocrina, nota anche come terapia ormonale, terapia con ormoni e cura con ormoni, è una cura che aggiunge, blocca o rimuove ormoni. Per esempio, si possono dare ormoni per regolare bassi livelli ormonali. Si possono anche dare ormoni sintetici o altri farmaci per bloccare gli  
20 ormoni naturali dell'organismo per rallentare o arrestare la crescita di alcuni cancri (come i cancri della prostata e della mammella). La terapia endocrina può anche includere un intervento chirurgico per rimuovere la ghiandola che produce un determinato ormone.



[0092] Gli esempi di terapia ormonale includono modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERM), come tamoxifene, raloxifene, endoxifene, toremifene, lasofoxifene, pipendoxifene, bazedoxifene e ospemifene, inibitori dell'aromatasi, come anastrozolo, letrozolo, exemestano, formestano, fadrozolo, amminoglutetimide e testolattone, un farmaco che interviene su HER2, come un  
5 inibitore di HER2, come Herceptin (trastuzumab), pertuzumab e lapatinib, e sottoregolatori del recettore degli estrogeni, come fulvestrant (ICI 182,780).

#### **6. Soggetto o soggetto per il metodo**

[0093] I metodi descritti in precedenza sono diretti alla cura di un soggetto con un SERM. Il  
10 soggetto curato con i metodi descritti in precedenza può essere un soggetto o una paziente affetti o a rischio di essere affetti da un cancro del cervello positivo al recettore degli estrogeni, come le BCBM, o da un cancro che è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni, come il cancro della mammella resistente al tamoxifene. Il soggetto può avere una diagnosi o essere identificato come affetto o a rischio di cancro utilizzando metodi e saggi noti, come una biopsia. Si può curare il  
15 soggetto con un SERM da solo o in combinazione con un altro farmaco e/o una terapia per il cancro convenzionale, come descritto in precedenza. Si può curare il soggetto con il SERM come terapia neoadiuvante o successiva a un intervento chirurgico. La presente invenzione ha molteplici aspetti, illustrati dai seguenti esempi non limitativi.

#### **20 7. Esempi**

[0094] Si può comprendere meglio quanto precede facendo riferimento ai seguenti esempi, che sono presentati a scopo illustrativo e non intendono limitare l'ambito dell'invenzione.

## ESEMPIO 1

### Analisi in vitro della degradazione di ER

[0095] 48 ore prima del trattamento, si sono poste cellule MCF7 in piastre in mezzi DMEM/F12  
5 privi di rosso fenolo integrati con siero fetale bovino trattato con carbone vegetale all'8%, amminoacidi non essenziali e piruvato di sodio. Dopo 20 ore di trattamento con i ligandi indicati, ossia estradiolo ("E2"; Sigma-Aldrich), antiestrogeno ICI 182,780 ("ICI"; Sigma-Aldrich) e 4-idrossitamoxifene ("4OHT"; Sigma-Aldrich) (0–1  $\mu$ M), si sono lavate le cellule e si sono lisate in tampone di lisi RIPA (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, 1% IGEPAL, 0.02% SDS, 0.5% deossicolato di sodio, EDTA 1 mM). Si sono  
10 risolti 50  $\mu$ g di lisato depurato mediante SDS-PAGE e si sono analizzati mediante immunoblot per la rilevazione di ER $\alpha$  o citocheratina 18 (controllo di caricamento), come illustrato nella Figura 1A.

## ESEMPIO 2

### Analisi in vivo di RAD1901 in tumori MCF7 xenotrapiantati

15 [0096] Si sono ovariectomizzati 90 topi Nu/Nu femmina in totale e contemporaneamente si è loro impiantato sottocute un pellet di estrogeni (Innovative Research of America) che rilasciava 0.72 mg di estradiolo (E2) in 60 giorni. 2 giorni dopo, si è inserito per via sottocutanea nella ghiandola  
20 mammaria assiale un frammento approssimativamente di 6 mm<sup>3</sup> di un tumore MCF7 xenotrapiantato (isolato da topi nu/nu trattati con estrogeni e appena soppressi). Si sono monitorati la crescita del tumore (mediante misurazione con calibro) e il peso corporeo dell'animale 3 volte la settimana fino a quando il volume del tumore ha raggiunto  $\sim$ 0.2 cm<sup>3</sup>. Si sono randomizzati i topi (n  $\sim$ 10) nei gruppi seguenti: controllo degli estrogeni (veicolo olio di mais), E2 + RAD1901 (20 mg/kg; Radius

Health Inc.), E2 + Tamoxifene (20 mg/kg; Sigma-Aldrich). Si sono formulati i trattamenti in olio di mais sterile e si sono somministrati giornalmente tramite iniezione sottocutanea. Dopo 3 settimane di trattamento, si sono soppressi gli animali e si sono conservati il siero e i tessuti per l'analisi. La Figura 1B illustra il volume del tumore analizzato utilizzando una curva di interpolazione non lineare e un calcolo di crescita esponenziale (Graphpad Prism), seguiti da ANOVA a due vie e analisi di Bonferroni.

### ESEMPIO 3

#### Meccanismo mediante il quale RAD1901 sottoregola l'espressione di ER

[0097] Sebbene i livelli ridotti di ER in seguito al trattamento con RAD1901 comportino la degradazione del recettore, si è determinato se il farmaco influenza l'attività di trascrizione del gene che codifica ER (Figura 2). Si sono pretrattate cellule MCF7 con veicolo (Veh) o inibitori di traduzione (cicloesammide, CHX, 10 µg/ml), del proteasoma (MG132, 30 µM) o di trascrizione (actinomomicina D, Actin. D, 100 ng/ml) per 2 ore, prima di 6 ore di trattamento con RAD1901 (0.1 o 1 µM), o ICI 182,780 (ICI) o raloxifene (Ral) 0.1 µM. La Figura 2A mostra che si è analizzata l'espressione proteica di ERα in estratti cellulari interi mediante immunoblot, come nell'Esempio 1. La Figura 2B mostra che si sono lavate le cellule trattate, come indicato, in PBS prima della lisi. Si sono eseguiti l'isolamento dello RNA (BioRad) e la trascrizione inversa (iScript; BioRad) secondo le istruzioni del produttore del kit. Si è effettuata una qRT-PCR del cDNA utilizzando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) secondo le istruzioni del kit e si è eseguita utilizzando il sistema ottico iCycler con il software associato (Bio-Rad). Si è calcolata l'abbondanza di mRNA utilizzando il metodo  $\Delta\Delta C_T$  per normalizzare l'espressione di mRNA di ERα al gene costitutivo 36B4 rilevato in modo simile.



#### ESEMPIO 4

##### Cambiamenti conformazionali indotti in ER come conseguenza del legame di RAD1901

[0098] Si è preventivamente identificata una serie di peptidi brevi la cui capacità di interagire con ER $\alpha$  è influenzata dalla natura del ligando legato (si vedano Chang et al., 2003, *Methods Enzymol.*, 364: 118–42; Huang et al., 2002, *Mol. Endocrinol.*, 16(8): 1778–92; Connor et al., 2001, *Cancer Res.*, 61(7): 2917–22; Chang et al., 1999, *Mol. Cell. Biol.*, 19(12): 8226–39; e Norris et al., 1999, *Science*, 285(5428): 744–6). Si può misurare l'interazione di queste "sonde conformazionali" in vitro o all'interno di cellule intatte e questo consente la definizione dei cambiamenti conformazionali indotti dal ligando nel recettore. Questo è significativo, in quanto le differenze nella conformazione del recettore facilitano il coinvolgimento di diverse proteine co-regolatrici, determinando attività farmacologiche diverse. L'applicazione di questa tecnologia ha condotto a determinare che il loro impatto sulla struttura del recettore è una caratteristica distintiva dei ligandi di ER.

[0099] La Figura 3 mostra che RAD1901 induce una conformazione unica di ER $\alpha$ , come mostrato nell'interazione tra ER e peptidi specifici per conformazione in un sistema a doppio ibrido di mammifero. Si sono trasfettati pozzetti triplicati di cellule SKBR3 (lipofectina secondo le istruzioni del produttore) con plasmidi che esprimono ER $\alpha$  fuso con VP16 insieme a Gal4DBD da solo (controllo) o fuso con i peptidi che interagiscono con ER indicati sull'asse orizzontale. Si sono poi trattate le cellule con RAD1901 (1 nM – 1  $\mu$ M) o il ligando di ER indicato (100 nM). Si è rilevata l'interazione di ER $\alpha$  con i costrutti peptidici Gal4DBD attraverso l'attivazione di un costrutto reporter di luciferasi che risponde a Gal4 e si è normalizzata all'attività di  $\beta$ -galattosidasi rilevata generata da un vettore di espressione costitutivo co-trasfettato. Le classi di ligandi riconosciute da ciascuna sonda sono indicate sotto il grafico.

## ESEMPIO 5

### **RAD1901 possiede un potenziale di agonista e/o antagonista dipendente dalla dose**

[00100] Le complesse attività farmacologiche esibite da RAD1901 suggeriscono che esso esibirà un profilo di espressione genica unico nelle cellule obiettivo. Una recente e approfondita analisi di microarray ha identificato sottoinsiemi "sentinella" di geni che rispondono a ER, che possono distinguere tra agonisti di ER, SERM e SERD. Per esempio, alcuni di questi rispondono solo al SERM tamoxifene, mentre altri mostrano una risposta graduale a SERM con potenziale variabile di agonista/antagonista e altri ancora sono repressi da agonisti o SERM e sono indotti solo dai SERD. RAD1901 esibisce una regolazione agonista/antagonista dipendente dalla dose della transattivazione da parte di ER di geni obiettivo (Figura 4). Si sono trattate cellule di cancro della mammella MCF7 per 24 ore con RAD1901 (0–1  $\mu$ M) in presenza o in assenza di 17 $\beta$ -estradiolo (1 nM). Si sono condotti l'isolamento dello RNA e l'analisi dell'espressione dei geni obiettivo proteina gradiente anteriore 2 (AGR2) e KCNK6 come nell'Esempio 3.

15

## ESEMPIO 6

### **Materiali e metodi**

[00101] **Reagenti.** I ligandi di ESR1 acquistati includono 17 $\beta$ -estradiolo (Sigma), ICI 162,780 (Tocris), tamoxifene (Sigma), raloxifene (Tocris) e 4-idrossitamoxifene (Sigma). Lo (R)-6-(2-(N-(4-(2-(etilammino)etil)benzil)-N-etilammino)-4-metossifenil)-5, 6,7,8-tetraidronaftalen-2-olo dicloridrato è stato fornito da Radius Pharmaceuticals. Si sono sintetizzati bazedoxifene e GW7604 come descritto in precedenza (Miller et al., 2001, *J. Med. Chem.*, 44(11): 1654–1657; Brevetto degli Stati Uniti US 5681835). Si sono disciolti i ligandi in etanolo o DMSO.

[00102] **Coltura cellulare.** Si sono mantenute le linee cellulari MCF7 e SKBR3 rispettivamente nei mezzi DMEM/F12 o RPMI (Invitrogen), integrati con siero fetale bovino all'8% (FBS, Gemini), aminoacidi non essenziali (Invitrogen) e piruvato di sodio (Invitrogen). Salvo diversa indicazione, per gli esperimenti si sono poste le cellule in piastre in mezzi privi di rosso fenolo e integrati con FBS trattato con carbone vegetale all'8% (CFS, Gemini). Si sono mantenute le cellule LTED MCF7 e si sono poste per gli esperimenti in piastre in mezzi DMEM/F12 privi di rosso fenolo integrati con CFS all'8% che era stato trattato con carbone vegetale due volte. 48 ore dopo averle poste nelle piastre, si sono trattate le cellule con i ligandi di ESR1 come indicato e si sono raccolte per l'analisi immunoblot o PCR quantitativa in tempo reale 24 ore dopo il trattamento. Si sono autenticate le linee cellulari mediante analisi STR eseguita da ATCC nel 2013.

[00103] **Analisi immunoblot.** Si è analizzata l'espressione proteica come descritto (Wittmann et al., 2007, *Cancer Res.*, 67(19): 9549–9560) utilizzando anticorpi acquistati da Sigma-Aldrich, A5441 ( $\beta$ -actina), e Santa Cruz Biotechnology, sc-6259 (citocheratina 18), sc-20680 (lamina-A), sc-5546 ( $\alpha$ -tubulina) e sc-8005 (ESR1).

[00104] **Isolamento dello RNA e PCR quantitativa in tempo reale.** Si sono eseguiti l'isolamento dello RNA e l'analisi come descritto (Wardell et al., 2001, *Biochem. Pharmacol.*, 82(2): 122–130). Si è calcolata l'abbondanza di mRNA utilizzando il metodo  $\Delta\Delta C_T$  (Wardell et al., 2001, *Biochem. Pharmacol.*, 82(2): 122–130). Le sequenze dei primer sono disponibili su richiesta.

[00105] **Saggi di proliferazione.** Si sono eseguiti saggi che valutavano gli effetti di SERD e SERM sulla proliferazione cellulare come descritto (Wardell et al., 2013, *Clin. Cancer Res.*, 19(9): 2420–2431).

[00106] **Trasfezioni.** Si è eseguita l'analisi a doppio ibrido di mammifero di VP16-ESR1 con sonde peptidiche selettive per conformazione essenzialmente come descritto in precedenza (Wardell



et al., 2012, *Mol. Endocrinol.*, 26(7): 1235–1248).

[00107] **Studi in vivo.** Si sono seguite tutte le linee guida internazionali, nazionali e/o istituzionali per la cura e l'utilizzo degli animali. Tutte le procedure eseguite negli studi che hanno coinvolto animali erano conformi agli standard etici dello Institutional Animal Care and Use Committee della  
5 Duke University.

[00108] Analisi del peso umido uterino: Si sono trattati giornalmente topi C57B1/6 femmina (Charles River) ovariectomizzati (10 giorni prima) (n = 5) per 3 giorni con veicolo o benzoato di estradiolo (10 µg/kg s.c.) così come con veicolo, raloxifene (10 mg/kg s.c.) o RAD1901 (0.1–100 mg/kg s.c.). Si sono disciolti i ligandi in olio di mais (Spectrum Chemicals). Il giorno 4, si sono soppressi i topi  
10 e si sono tratti i tessuti per l'analisi. Si è calcolato il peso umido uterino come rapporto tra il peso dell'utero in seguito alla rimozione e il peso corporeo post-mortem.

[00109] Analisi dei tumori xenotrapiantati: Si sono avviati tumori MCF7 stimolati da estrogeni nella ghiandola mammaria assiale di topi NU/NU femmina di 6 settimane (colonia interna) ovariectomizzati e trattati con estrogeni (0.72 mg di pellet in 60 giorni s.c., Innovative Research of America)  
15 mediante trasferimento seriale e si sono misurati come descritto (Wardell et al., 2013, *Clin. Cancer Res.*, 19(9): 2420–2431). Figura 5: Al raggiungimento di un volume del tumore di ~0.1 cm<sup>3</sup>, si sono randomizzati i topi (n = 9–10) in trattamenti giornalieri con veicolo, RAD1901 (20 mg/kg) o tamoxifene (20 mg/kg). Figura 9: Al raggiungimento di un volume del tumore di ~0.1 cm<sup>3</sup>, si è rimosso chirurgicamente il pellet di estrogeni e si sono randomizzati i topi (n = 6–10) in trattamenti giornalieri  
20 con veicolo o RAD1901 (0.3–10 mg/kg). Si sono formulati i trattamenti come in precedenza. Si sono processati e analizzati i tessuti animali come descritto (Wardell et al., 2013, *Clin. Cancer Res.*, 19(9): 2420–2431).

## ESEMPIO 7

### RAD1901 inibisce l'attività di ESR1 in vitro e in vivo

[00110] Si è valutata la capacità di RAD1901 (Figura 5A) di modulare l'attività di trascrizione dipendente da 17- $\beta$  estradiolo (E2) del recettore alfa umano degli estrogeni (ESR1) e del recettore beta umano degli estrogeni (ESR2) in cellule SKBR3 trasfettate transitoriamente utilizzando un gene reporter sintetico. La Figura 5A mostra la struttura chimica del SERM RAD1901. Per la Figura 5B, si sono poste cellule SKBR3 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con FBS trattato con carbone vegetale (CFS) 24 ore prima della trasfezione con un reporter di ERE-luciferasi insieme con vettori di espressione di ESR1 o ESR2. 24 ore dopo la trasfezione, si sono trattate le cellule con E2 (10 nM) insieme con RAD1901 ( $10^{-10}$ – $10^{-6}$  M) per 24 ore prima della raccolta e dell'analisi dell'attività di luciferasi normalizzata al controllo di  $\beta$ -galattosidasi co-trasfettata. Per la Figura 5C, si sono poste cellule MCF7 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con CFS 48 ore prima del trattamento con E2  $10^{-9}$  M insieme con ICI 182,780 (ICI), RAD1901 (RAD), GW7604 o 4-idrossitamoxifene (4OHT) ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) per 24 ore. Si sono valutati i livelli di mRNA del gene obiettivo di ESR1 fattore trifoglio 1 (TFF1) utilizzando la RT qPCR in seguito all'isolamento dello RNA. Si è normalizzata l'espressione di mRNA al gene costitutivo 36B4 rilevato in modo simile e i livelli di espressione sono presentati come variazione, in numero di volte, rispetto al controllo trattato con il veicolo. Per la Figura 5D, si sono poste cellule MCF7 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con CFS 24 ore prima del trattamento e si sono trattate con E2  $10^{-9}$  M così come con i ligandi indicati ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) nei giorni 1, 4 e 6 di un saggio di proliferazione di 8 giorni. Si è misurato il contenuto di DNA mediante valutazione della fluorescenza come surrogato per la proliferazione cellulare. Si è calcolato l'incremento relativo della fluorescenza del DNA normalizzando ai valori di base rilevati in una piastra duplicata di cellule che si sono raccolte il giorno 1 prima del trattamento iniziale. I dati sono rappresentativi di almeno 3 esperimenti indipendenti. Per le Figure 5E–5F, si sono impiantati tumori derivati da cellule MCF7 in topi

nu/nu ovariectomizzati e trattati con estrogeni. Quando il volume del tumore ha raggiunto  $\sim 0.1 \text{ cm}^3$ , si sono randomizzati gli animali ( $n = 9-10$ ) per far loro ricevere giornalmente il trattamento con veicolo, tamoxifene (Tam, 20 mg/kg s.c.) o RAD1901 (RAD) (20 mg/kg s.c.). Per la Figura 5E, è presentato il volume del tumore medio  $\pm$  err. standard per giorno di trattamento. Si è indicata la significatività (ANOVA a 2 vie dei valori corrispondenti seguita da confronto di Bonferroni) rispetto al controllo del veicolo (\*  $p < 0.0001$ ). Per la Figura 5F, si è analizzata l'espressione dei geni obiettivo di ESR1 nei tumori essenzialmente come in (C).

[00111] In questa analisi si è determinato che, sebbene RAD1901 inibisse efficacemente l'attivazione dipendente da E2 di un reporter di ERE-luciferasi con ognuna delle due isoforme, esso era un inibitore più potente di ESR1 (100 volte) (Figura 5B). Analogamente, si è dimostrato, nelle cellule di cancro della mammella MCF7, che RAD1901 inibiva (a) l'induzione della trascrizione del gene obiettivo e (b) la stimolazione della proliferazione cellulare dipendenti da E2 con un'efficacia e una potenza simili a quelle dei SERM 4-idrossitamoxifene (4OHT) e raloxifene (Ralox) e dei SERD ICI 182,780 (ICI, fulvestrant) e GW7604 (Figure 5C-5D). Per valutare l'attività di RAD1901 in vivo, si è condotto uno studio sui tumori xenotrapiantati in topi immunocompromessi trattati con estrogeni utilizzando il ben caratterizzato modello cellulare MCF7 dipendente da ESR-1. In questo studio, si è osservato che RAD1901 (20 mg/kg) inibiva la crescita stimolata da E2 dei tumori con un'efficacia simile al tamoxifene (20 mg/kg). Si è anche mostrato che RAD1901 e tamoxifene sopprimevano l'espressione dei geni obiettivo di ESR1 PGR e FHL1 allo stesso grado nei tumori trattati, un risultato che conferma il coinvolgimento dell'obiettivo (Figure 5E-5F).

## ESEMPIO 8

### **RAD1901 esibisce le proprietà farmacologiche di un degradatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERD)**

[00112] RAD1901 non solo agiva come antagonista di ESR1, ma anche sottoregolava l'espressione di questo recettore. L'espressione di ESR1 era sottoregolata in modo significativo in cellule MCF7 trattate con RAD1901. Per la Figura 6A, si sono trattate cellule MCF7 per 24 ore con ICI ( $10^{-13}$ – $10^{-7}$  M) o RAD1901 (RAD) ( $10^{-11}$ – $10^{-5}$  M). Si è rilevata mediante immunoblot (in alto) l'espressione di ESR1 e del controllo di caricamento citocheratina 18 (CK18, Figura 7A) in estratti cellulari interi. Si sono quantificati i livelli di ESR1 rispetto a CK18 mediante densitometria utilizzando Adobe Photoshop (in basso). Per la Figura 6B, si sono poste cellule MCF7 in piastre come nella Figura 5B prima di un pretrattamento di 1 ora con veicolo o MG132 (10 µg/ml), seguito da 6 ore di trattamento con veicolo  $10^{-7}$  M, ICI, Ral o RAD1901 (RAD) ( $10^{-8}$  o  $10^{-6}$  M). Si è rilevata l'espressione di ESR1 come nella Figura 6A. Per le Figure 6C–6D, si sono poste cellule LTED MCF7 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con FBS che era stato trattato con fattori di crescita per due volte utilizzando carbone vegetale. Per la Figura 6C, dopo 48 ore, si sono trattate le cellule per 24 ore con E2 ( $10^{-7}$  M) o SERD ( $10^{-6}$  M) e si è analizzato ESR1 come nella Figura 6A. Per la Figura 6D, si sono trattate cellule LTED MCF7 con ICI o RAD1901 (RAD) ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) nei giorni 1, 4 e 6 di un saggio di proliferazione di 8 giorni e si sono analizzate come nella Figura 5.

[00113] Per la Figura 7A, si è rilevato il controllo di caricamento citocheratina 18 (CK18) per i campioni illustrati nella Figura 6A. Per la Figura 7B, si sono poste cellule BT483 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con CFS 48 ore prima del trattamento con E2  $10^{-9}$  M insieme con ICI 182,780 (ICI), RAD1901 (RAD), GW7604 o 4-idrossitamoxifene (4OHT) ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) per 24 ore. Si sono valutati i livelli di mRNA del gene obiettivo di ESR1 fattore trifoglio 1 (TFF1) utilizzando la RT qPCR in seguito all'isolamento dello RNA. Si è normalizzata l'espressione di mRNA al gene costitutivo

36B4 rilevato in modo simile e i livelli di espressione sono presentati come variazione, in numero di volte, rispetto al controllo trattato con il veicolo. Per la Figura 7C, si sono trattate cellule BT483 per 24 ore con ICI ( $10^{-13}$ – $10^{-7}$  M) o RAD1901 (RAD) ( $10^{-11}$ – $10^{-5}$  M). Si è rilevata mediante immunoblot (a destra) l'espressione di ESR1 e del controllo di caricamento citocheratina 18 in estratti cellulari interi.

5 Si sono quantificati i livelli di ESR1 rispetto a CK18 mediante densitometria utilizzando Adobe Photoshop (a sinistra). Per la Figura 7D, si sono poste cellule BT483 in piastre in mezzi privi di rosso fenolo integrati con CFS 24 ore prima del trattamento e si sono trattate con  $E2$   $10^{-9}$  M così come con i ligandi indicati ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M) nei giorni 1, 4 e 6 di un saggio di proliferazione di 8 giorni. Si è misurato il contenuto di DNA mediante valutazione della fluorescenza come surrogato per la proliferazione cellulare.

10 Si è calcolato l'incremento relativo della fluorescenza del DNA normalizzando ai valori di base rilevati in una piastra duplicata di cellule che si sono raccolte il giorno 1 prima del trattamento iniziale. I dati sono rappresentativi di almeno 3 esperimenti indipendenti.

[00114] La sottoregolazione di ESR1 da parte di RAD1901 era un contributo significativo alla sua efficacia come antagonista (Figura 6A). RAD1901 non aveva effetto sull'espressione di mRNA di ESR1 (non mostrato). Tuttavia, come osservato nelle cellule trattate con ICI, la sottoregolazione di ESR1 da parte di RAD1901 era completamente bloccata dal pretrattamento delle cellule con l'inibitore del proteasoma MG132 (Figura 6B). Si sono ottenuti risultati simili nella linea cellulare di cancro della mammella BT483 (Figure 7B–7D). A titolo comparativo, si sono valutati i livelli di espressione di ESR1 in cellule trattate con tamoxifene, che stabilizza l'espressione di ESR1, e con i SERD bazedoxifene (BZA), GW7604 e ICI. Questi studi rivelavano che il grado di sottoregolazione di ESR1 da parte di RAD1901 era simile a quello raggiunto da BZA nelle stesse condizioni (Figura 6C).

15

20

[00115] Per valutare la potenziale significatività di questa attività di SERD, si è valutata l'attività di RAD1901 in cellule LTED MCF7, un modello accettato di resistenza all'aromatasi in cui i composti

con la sola attività di antagonista di ER, come il tamoxifene, erano minimamente efficaci (non mostrato). In questo saggio, si è dimostrato che, come ICI e BZA, RAD1901 sottoregolava l'espressione di ESR1 e inibiva la proliferazione cellulare (Figura 6D). Quindi, considerando la sua attività di antagonista in diversi modelli di cancro della mammella e la sua capacità di sottoregolare ESR1, era appropriato classificare RAD1901 come SERD.

## ESEMPIO 9

### **RAD1901 esibisce attività di SERD dipendente dalla dose in vivo**

[00116] L'osservazione che RAD1901 esibiva le proprietà farmacologiche di un SERD era inaspettata, dato che era stato (a) identificato in selezioni di composti che manifestano attività di agonista di ESR1 nello SNC e (b) valutato in studi clinici come trattamento potenziale dei sintomi vasomotori (vampate di calore) associati alla menopausa, un'indicazione per la quale solo gli estrogeni si sono dimostrati efficaci. Tuttavia, i risultati delle sperimentazioni cliniche sulle vampate di calore hanno rivelato che RAD1901 esibiva una farmacologia complessa. Alla dose testata più bassa è risultato in grado di sopprimere efficacemente le vampate di calore, ma era inefficace alle dosi testate più alte. Questa farmacologia a forma di U rovesciata suggeriva che, a basse dosi, questo composto potesse avere un'attività di agonista favorevole, ma a dosi più alte domina la capacità di RAD1901 di indurre il ricambio di ESR1. Si è eseguita una serie di studi per esplorare le conseguenze funzionali della complessa attività farmacologica di RAD1901 in vivo.

[00117] Come prima fase, si è valutato l'impatto di RAD1901 sul peso umido uterino nei topi. Per questo studio, si sono somministrate dosi crescenti di RAD1901 giornalmente a topi C57B1/6 ovariectomizzati che ricevevano il veicolo da solo o E2 (10 µg/kg; una dose sostitutiva fisiologica). Si è

incluso un gruppo di topi che riceveva 10 mg/kg di raloxifene a scopo comparativo e come riferimento. Si sono trattati topi C57B1/6 ovariectomizzati (n = 5) giornalmente per 3 giorni con (Figura 8A) veicolo o (Figura 8B) estradiolo (10 µg/kg) insieme con il veicolo, Ralox (10 mg/kg) o RAD1901 (RAD) (0.3–100 mg/kg). Al momento dell'eutanasia, si sono misurati il peso corporeo e il peso umido  
5 uterino prima della crioconservazione dell'utero. Quando somministrato come agente singolo, si è osservato un aumento statisticamente significativo del peso uterino negli animali che ricevevano la dose più bassa di RAD1901 (0.3 mg/kg). Per la Figura 8C, si è analizzata l'espressione di ESR1 e β-actina in estratti ottenuti da tessuti uterini polverizzati mediante immunoblot come nella Figura 5 (a sinistra). Si è quantificata l'espressione di ESR1 rispetto alla β-actina come nella Figura 6 (a destra). Si  
10 è determinata una significativa sottoregolazione (\* p < 0.05) di ESR1 mediante ANOVA seguita da confronto di Bonferroni.

[00118] A dosi di 1 mg/kg e superiori, i pesi umidi uterini degli animali trattati erano indistinguibili da quelli degli animali trattati con il veicolo (Figura 8A). Inoltre, si è dimostrato che la somministrazione di RAD1901 inibiva l'aumento del peso umido uterino dipendente da E2 (Figura 8B), un'attività che coincideva con la sottoregolazione dell'espressione di ESR1 dipendente dalla dose (Figura  
15 8C). In particolare, non si è osservata alcuna diminuzione dell'espressione di ESR1 negli animali trattati con 0.3 mg/kg, la dose alla quale si è osservata l'attività di agonista di RAD1901 nel saggio del peso umido uterino (Figura 8C). Come osservato nella sperimentazione clinica per le vampate di calore, RAD1901 esibiva una complessa farmacologia bifasica che si manifesta come attività di antago-  
20 nista alle dosi più alte.



## ESEMPIO 10

### **RAD1901 esibisce attività bifasica rispetto alla crescita tumorale dipendente da ESR1**

[00119] Come mostrato in precedenza, RAD1901 ad alte dosi (20 mg/kg) inibiva la crescita di tumori derivati da cellule MCF7 dipendenti da ESR1 nei topi. Tuttavia, l'osservazione che il peso umido uterino aumentava nei topi trattati con dosi di RAD1901 che erano inferiori a quelle necessarie per ottenere il ricambio di ESR1 evidenziava la necessità di esaminare se fosse manifesta una farmacologia bifasica simile nei tumori della mammella. Per valutare ulteriormente la farmacologia di RAD1901, si è condotto un secondo studio su tumori xenotrapiantati, in cui si sono costituiti tumori MCF7 sotto stimolazione estrogenica. Per la Figura 9A, si sono avviati tumori MCF7 xenotrapiantati in topi nu/nu femmina ovariectomizzati, come nella Figura 5. Si sono rimossi chirurgicamente i pellet di estrogeni quando i tumori hanno raggiunto un volume di  $\sim 0.1 \text{ cm}^3$  e gli animali ( $n = 6-10$ ) hanno poi ricevuto un trattamento giornaliero con veicolo o RAD1901 (RAD) (0.3–10 mg/kg s.c.). È presentato il volume del tumore medio  $\pm$  err. standard per giorno di trattamento. Si è indicata la significatività rispetto al veicolo (ANOVA a 2 vie dei valori corrispondenti seguita da confronto di Bonferroni) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0005$ ). Per la Figura 9B, sono presentati graficamente il peso umido uterino alla soppressione (misurato come nella Figura 8) e la variazione % del volume del tumore (rispetto alle dimensioni alla randomizzazione) calcolata utilizzando la misurazione finale registrata per i topi nella Figura 9A. Per le Figure 9C–9D, si è analizzata l'espressione dei geni obiettivo di ESR1 nei tumori essenzialmente come nella Figura 5. Si sono inclusi per confronto i campioni di soli estrogeni della Figura 5D. Per la Figura 9E, si sono analizzati i livelli di ESR1 nei tessuti tumorali come nella Figura 8 e si sono normalizzati rispetto alla lamina-A, rilevata in modo simile. Si è determinata una significativa sottoregolazione (\*  $p < 0.05$ ) mediante ANOVA seguita da confronto di Bonferroni.

[00120] Quando i tumori hanno raggiunto un volume di  $\sim 0.1 \text{ cm}^3$ , si sono interrotti gli estrogeni e si sono randomizzati gli animali al trattamento con veicolo o RAD1901 (0.3, 1, 3 o 10 mg/kg).

Come osservato nel saggio del peso uterino, RAD1901 esibiva una risposta bifasica, in quanto negli animali trattati con 1 o 3 mg/kg di RAD1901 si osservava una significativa stimolazione della crescita tumorale, che non risultava alla dose più alta (Figura 9A). Sebbene certamente inferiore a quello osservato in seguito alla stimolazione con E2 (Figura 5E), l'aumento del volume tumorale nei gruppi da 1 e 3 mg/kg era significativo e di entità simile a quello degli agonisti parziali di ESR1. È interessante notare che una valutazione delle dimensioni finali del tumore e del peso umido uterino di questi animali alla soppressione rivelava che la farmacologia di RAD1901 era influenzata sia dalla dose sia dal tessuto. Nello specifico, come riportato in precedenza in un diverso ceppo di topi, la stimolazione del peso uterino era evidente nei topi trattati solo con la dose di 0.3 mg/kg di RAD1901, mentre le dimensioni del tumore aumentavano significativamente nei gruppi con 1 o 3 mg/kg di RAD1901 (Figura 9B). Mentre non si osservava l'espressione dei classici geni obiettivo di ESR1, come PGR, nei tumori dei gruppi di trattamento da 1 o 3 mg/kg (Figura 9C), si osservava l'espressione di AGR2 (Figura 9D) e di altri geni regolati da SERM associati alla resistenza al tamoxifene (non mostrato). L'analisi immunoblot degli estratti tumorali rivelava una sottoregolazione di ESR1 dipendente dalla dose da parte di RAD1901, che rifletteva la sua azione di inibitore della crescita tumorale (Figura 9E). L'insieme di questi dati evidenzia la complessa farmacologia di RAD1901 e sottolinea l'importanza di sviluppare biomarcatori che leggano l'attività di agonista parziale del farmaco e che possano essere utilizzati per l'ottimizzazione della dose negli studi clinici.

20

#### ESEMPIO 11

##### **Individuazione dei meccanismi che distinguono RAD1901 dagli altri SERD**

[00121] Si è determinato se l'attività di agonista/antagonista dipendente dalla dose di



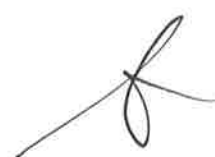
RAD1901 potesse essere osservata a livello di regolazione dei geni obiettivo. Si sono identificati specifici insiemi di geni obiettivo di ESR1 la cui espressione era regolata in modo differenziato dagli estrogeni e dai SERM e che potevano essere utilizzati per distinguere tra SERM e SERD diversi. Si è selezionato un sottoinsieme di questi geni, quelli regolati da a) agonisti (con risposta nulla o minima ai SERM), b) SERM (con risposta nulla o minima a E2), o c) agonisti o SERM, per profilare l'attività di RAD1901.

[00122] Si sono trattate cellule MCF7 per 24 ore con veicolo (Veh)  $10^{-7}$  M, ICI, 4OHT, raloxifene (Ralox), E2 ( $10^{-9}$  M) o RAD1901 ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  M). Si è analizzata l'espressione dei geni obiettivo di ESR1 che rispondono agli agonisti (Figura 10A), principalmente ai SERM (Figura 10B), o ai SERM e agli agonisti (Figura 10C), come nella Figura 5. Le variazioni relative di questi e di altri geni obiettivo progettati per valutare la risposta dipendente dalla dose a RAD1901 sono presentate nella Figura 11. Si è rilevata una regolazione significativa dei geni obiettivo (\*  $p < 0.05$ ) rispetto al controllo con veicolo mediante ANOVA a 2 vie seguita da LSD di Fisher (Graphpad Prism 6). La Figura 10D mostra l'interazione tra ESR1 e peptidi specifici per conformazione in un sistema a doppio ibrido di mammifero. Si sono trasfettati pozzetti triplicati di cellule SKBR3 con plasmidi che esprimono ESR1 fuso con VP16 insieme a Gal4DBD da solo (controllo) o Gal4DBD fuso con i peptidi che interagiscono con ESR1 indicati sull'asse orizzontale. Si sono quindi trattate le cellule con i ligandi di ESR1 indicati ( $10^{-7}$  M, salvo diversa indicazione). Si è rilevata l'interazione di ESR1 con i costrutti peptidici Gal4DBD attraverso l'attivazione di un costrutto reporter di luciferasi che risponde a Gal4 e si è normalizzata all'attività di  $\beta$ -galattosidasi rilevata espressa in modo costitutivo utilizzando un secondo vettore. La risposta normalizzata era espressa come incremento, in numero di volte, rispetto al livello di interazione rilevato tra Gal4DBD da solo ed ESR1-VP16 in assenza di ligando (Veh). Per la Figura 10E, si è valutato l'effetto dei SERM e dei SERD ( $10^{-6}$  M) sulla proliferazione delle cellule MCF7 in risposta a E2 ( $10^{-9}$  M) o insulina ( $2 \times 10^{-9}$  M), come nella Figura 5. I trattamenti statisticamente simili (ANOVA a 2 vie seguita da

confronto di Bonferroni) sono indicati con lettere. Per la Figura 11, si sono trattate cellule MCF7 per 24 ore con veicolo (Veh)  $10^{-7}$  M, ICI, 4OHT, raloxifene (Ralox), E2 ( $10^{-9}$  M) o RAD1901 ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  M). Si è analizzata l'espressione dei geni obiettivo di ESR1 che rispondono (A) agli agonisti, (B) principalmente ai SERM, o (C) ai SERM e agli agonisti, utilizzando la RT qPCR dopo l'isolamento dello RNA. Si è normalizzata l'espressione di mRNA (analisi  $\Delta\Delta C_T$ ) rispetto al gene costitutivo 36B4, rilevato in modo simile. Si sono analizzati i profili presentati in formato di dendrogramma con l'algoritmo di raggruppamento gerarchico di Ward (JMP 11) utilizzando dati standardizzati.

[00123] Riflettendo la farmacologia osservata in vivo, il modello di espressione di questi geni obiettivo esibiva una risposta bifasica a RAD1901, con un'attività di agonista osservata a dosi più basse e un'attività di antagonista più completa evidente a dosi più alte (Figure 10A–10C e Figura 11). Questi dati confermavano la farmacologia unica di RAD1901 e suggerivano che questo farmaco potesse agire con un meccanismo che era distinto da quello di altri sottoregolatori di ESR1.

[00124] La farmacologia dei ligandi di ESR1 riflette la loro influenza sulla struttura complessiva del recettore e sull'impatto che questa ha sul reclutamento dei co-regolatori. Data la distinta farmacologia esibita da RAD1901, esso potrebbe consentire a ESR1 di adottare una conformazione unica. Per analizzare il complesso ESR1-RAD1901 si è utilizzato uno strumento di profilazione conformazionale. In questo saggio, si è utilizzato un saggio a doppio ibrido modificato per valutare il legame di una serie di brevi peptidi che esaminano le superfici di interazione proteina-proteina su ESR1 che si presentavano quando erano occupate da diversi ligandi. Come mostrato nella Figura 10D, il profilo di interazione osservato in presenza di RAD1901 era completamente distinto da qualsiasi altro ligando conosciuto. Notevole è stata la capacità di RAD1901 di disimpegnare la superficie di legame del co-regolatore classico (AF2), come indicato dalla diminuzione dell'interazione con i peptidi riportati su "attività di agonista" (ASC1 e PGC1). Non si è osservata alcuna interazione con i peptidi riportati sulle



strutture di ESR1 adottate al momento del legame con tamoxifene ( $\alpha\beta\gamma$ ) o ICI ( $\beta 2$ ). C'era un'interazione significativa di all in presenza di RAD1901, un peptide riportato su una superficie di interazione criptica proteina-proteina nella regione cerniera del recettore. RAD1901 consentiva a ESR1 di assumere una conformazione unica, che era distinta da quella risultante in seguito al legame con gli agonisti, il SERM tamoxifene e altri SERD noti (Figura 10D).

[00125] Oltre agli agonisti classici, l'attività di trascrizione di ESR1 può essere indotta anche trattando le cellule con fattori di crescita come EGF, IGF1 o insulina. Sebbene i meccanismi alla base di questa attività "indipendente dal ligando" siano probabilmente complessi, questa via di attivazione alternativa contribuisce alla resistenza alla terapia endocrina nel cancro della mammella. Si è valutata la farmacologia comparativa di RAD1901 per la sua capacità di sopprimere l'attivazione di ESR1 dipendente dai fattori di crescita. In questo saggio si è determinato che, sebbene tutti i SERM e i SERD testati inibissero la proliferazione stimolata da E2, solo BZA e ICI inibivano in modo efficiente la proliferazione stimolata dall'insulina, mentre 4OHT, Ralox e RAD1901 erano senza effetto (Figura 10E). Questi risultati confermano il meccanismo d'azione unico di RAD1901. RAD1901 può essere rilasciato in combinazione con un altro farmaco che inibisce l'attivazione di ESR1 indipendente dal ligando per ottenere la massima risposta clinica.

[00126] Resta inteso che la precedente descrizione dettagliata e gli esempi allegati sono puramente illustrativi e non devono essere considerati come limitazioni all'ambito dell'invenzione, che è definito esclusivamente dalle rivendicazioni allegate.

[00127] Diversi cambiamenti e modifiche alle forme di realizzazione divulgate saranno chiari agli esperti del settore. Tali cambiamenti e modifiche, con l'inclusione, senza limitazione, di quelli relativi alle strutture chimiche, ai sostituenti, ai derivati, ai prodotti intermedi, alle sintesi, alle composizioni, alle formulazioni o ai metodi di utilizzo dell'invenzione, possono essere apportati senza allontanarsi dall'ambito di queste.



## RIVENDICAZIONI

1. Un composto di (R)-6-{2-[etil[4-(2-etilamminoetil)benzil]ammino]-4-metossifenil}-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-olo per l'utilizzo nella cura di un cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni in un soggetto, in cui il cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni è resistente a un modulatore del recettore degli estrogeni e in cui il composto è somministrato in una quantità efficace compresa tra circa 200 mg/giorno e circa 500 mg/giorno.
2. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 1, in cui il cancro della mammella positivo al recettore degli estrogeni è resistente de novo al modulatore del recettore degli estrogeni.
3. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 1, in cui la resistenza al modulatore del recettore degli estrogeni è acquisita.
4. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 1, in cui il modulatore del recettore degli estrogeni è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (Selective Estrogen Receptor Modulator, SERM).
5. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 4, in cui il SERM è tamoxifene, idoxifene, raloxifene o ICI 182,780.

6. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 1, in cui il composto è somministrato mediante somministrazione orale, somministrazione endovenosa, iniezione intradermica, iniezione intramuscolare o iniezione sottocutanea.

5 7. Il composto per l'utilizzo della rivendicazione 1, che comprende inoltre la somministrazione di una quantità efficace di almeno un composto selezionato nel gruppo costituito da un inibitore di chinasi ciclina-dipendente 4 e 6 (inibitore di CDK4/6), un antiestrogeno, un ligando del recettore dell'acido retinoico o del recettore X dei retinoidi, un antiprogestinico, un antiandrogeno, vitamina D o un suo metabolita, un inibitore di farnesil transferasi, un agonista di PPAR $\alpha$  o gamma e un inibitore di MAP chinasi.

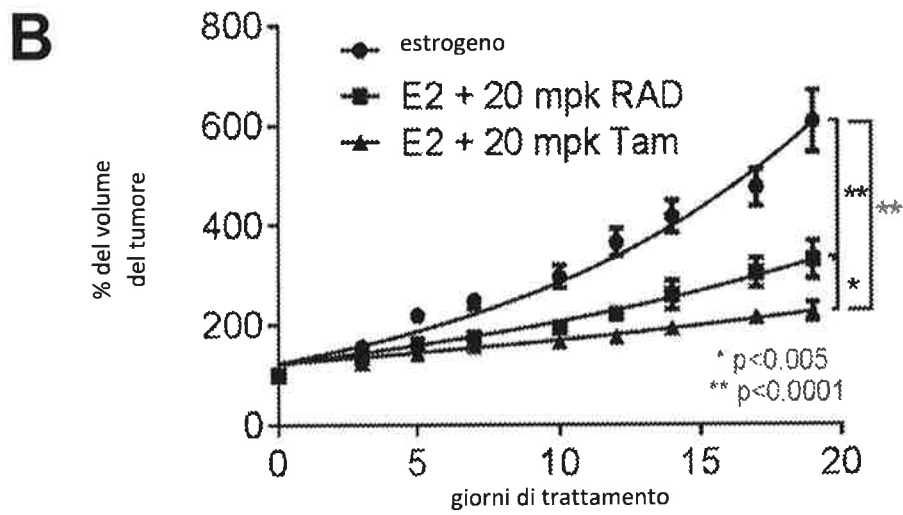
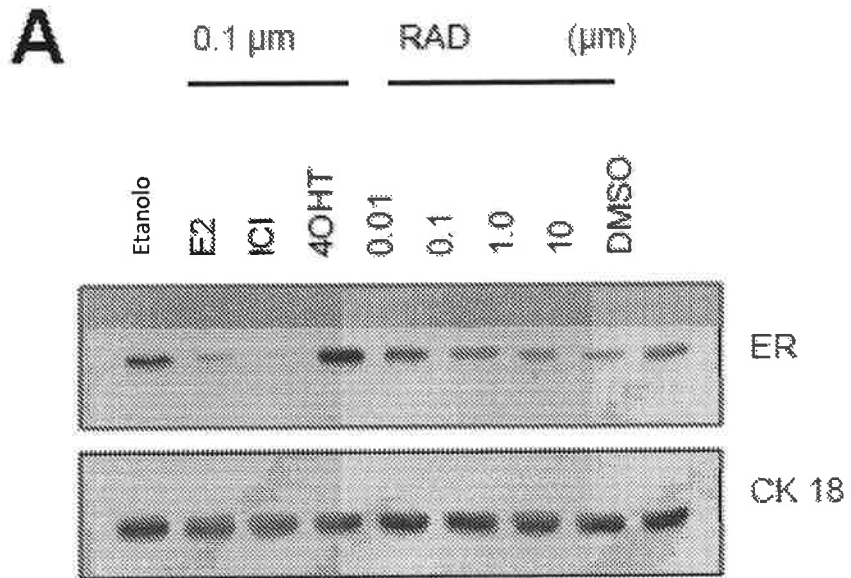
10

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the end.

15

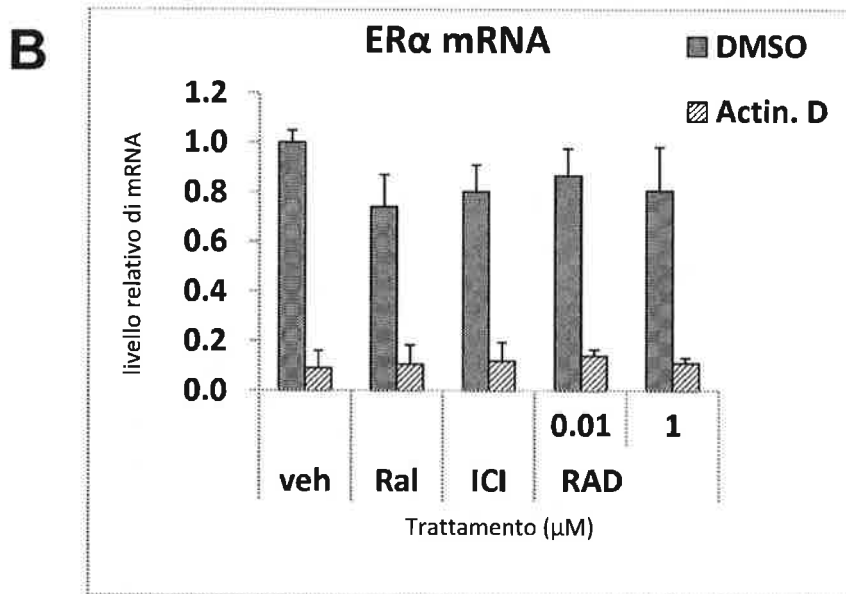
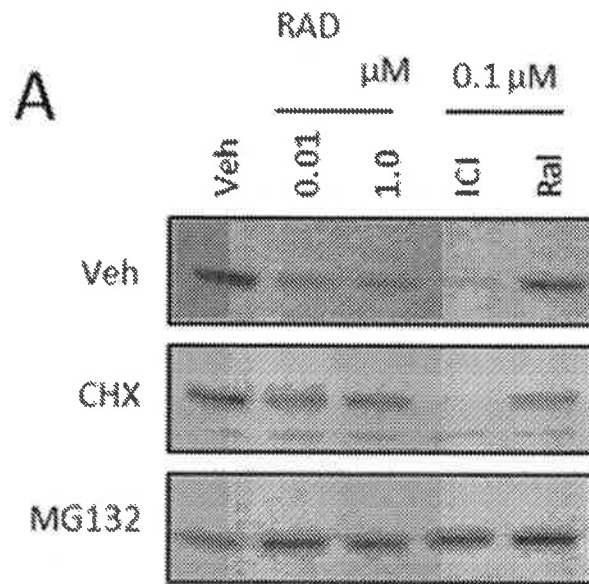
20

Figure 1A-1B



A

Figure 2A-2B



*A*

Figura 3

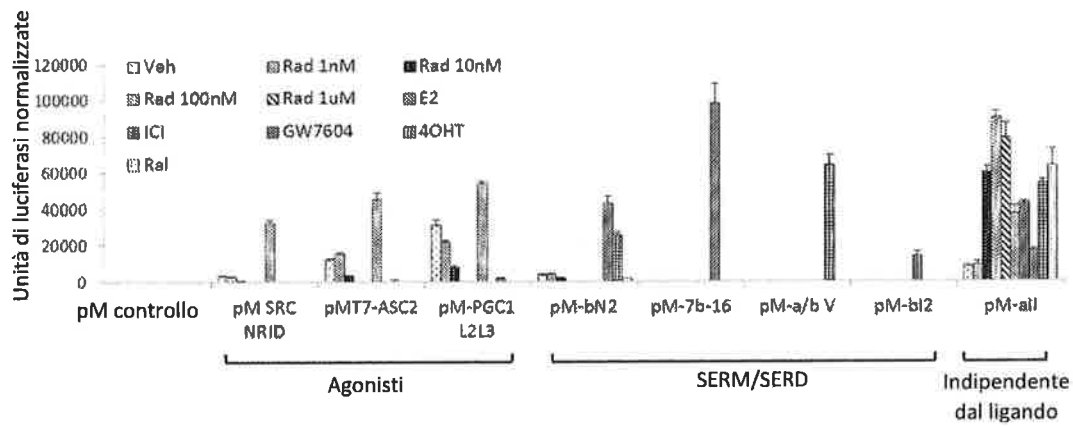
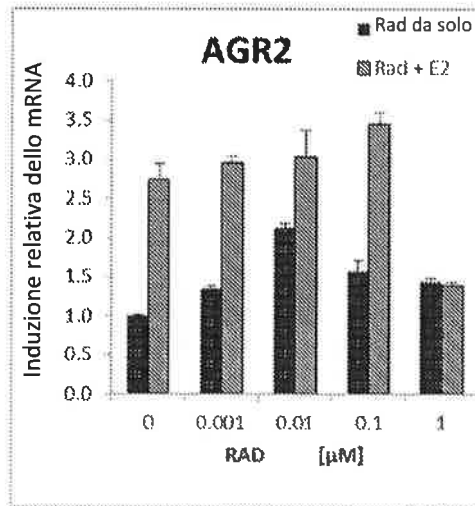


Figure 4A-4B

**A**



**B**

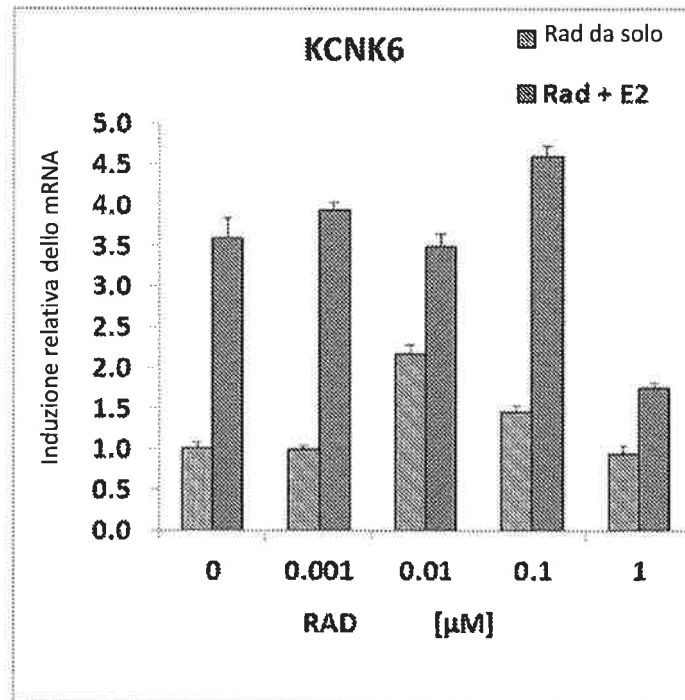


Figure 5A-5F

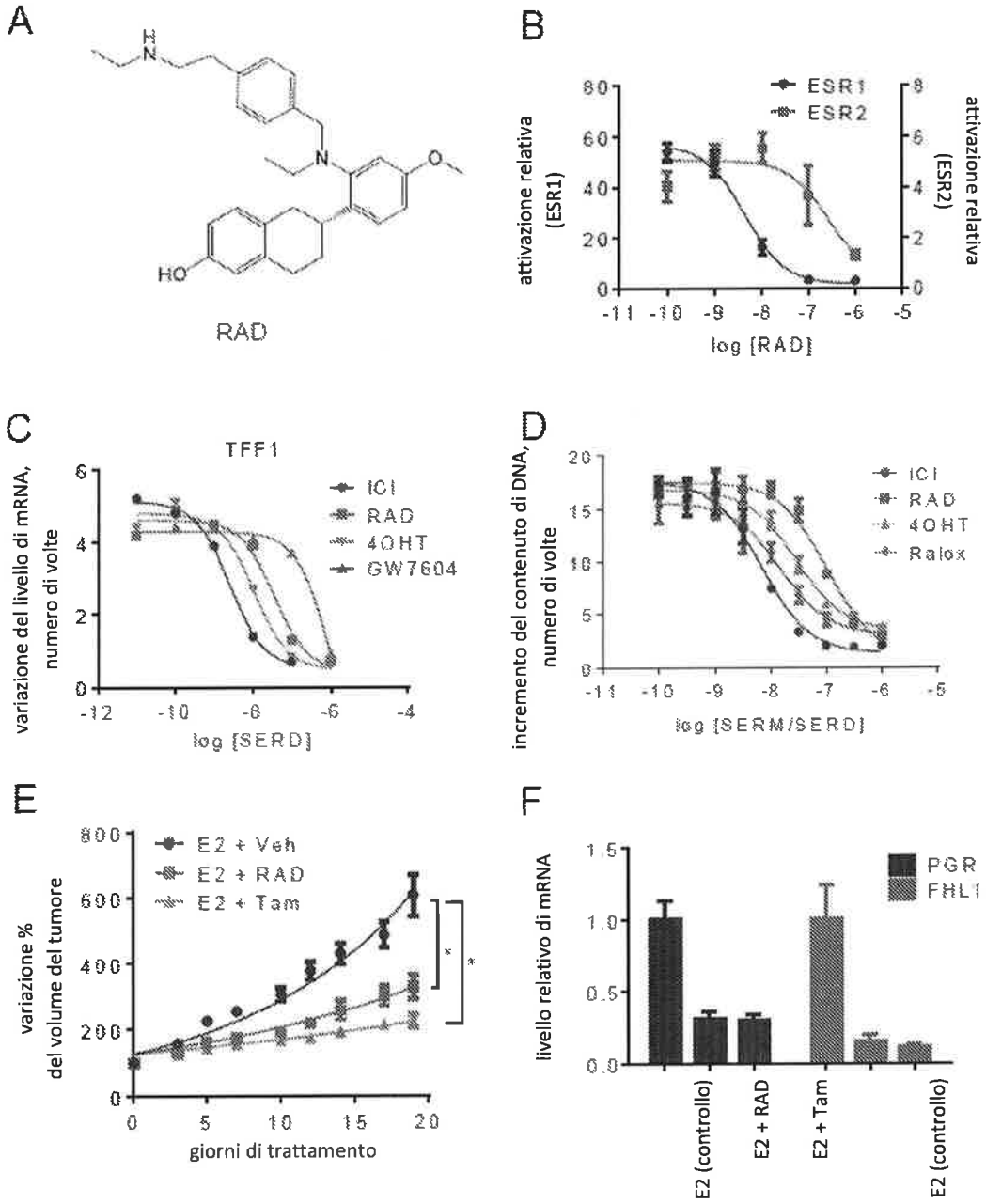
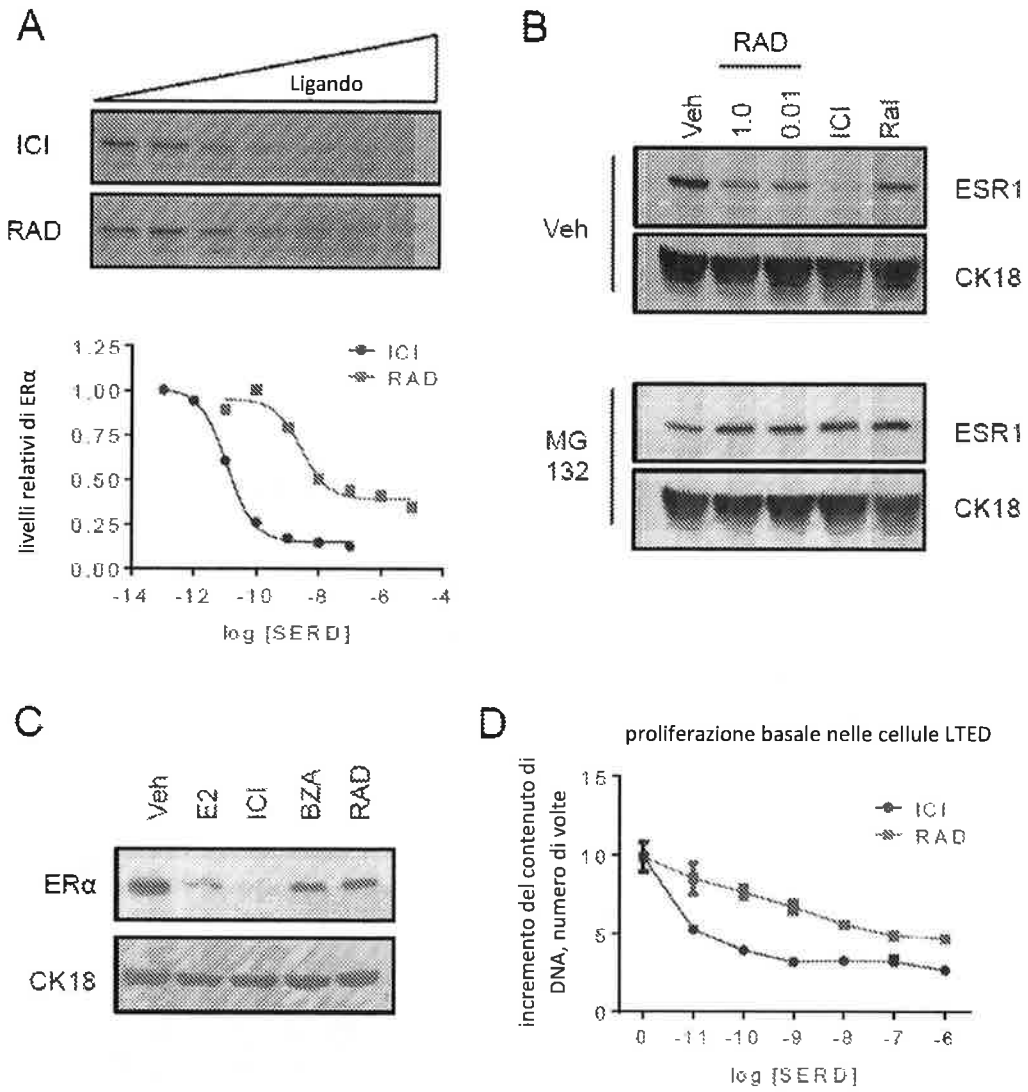


Figure 6A-6D



A

Figure 7A-7C

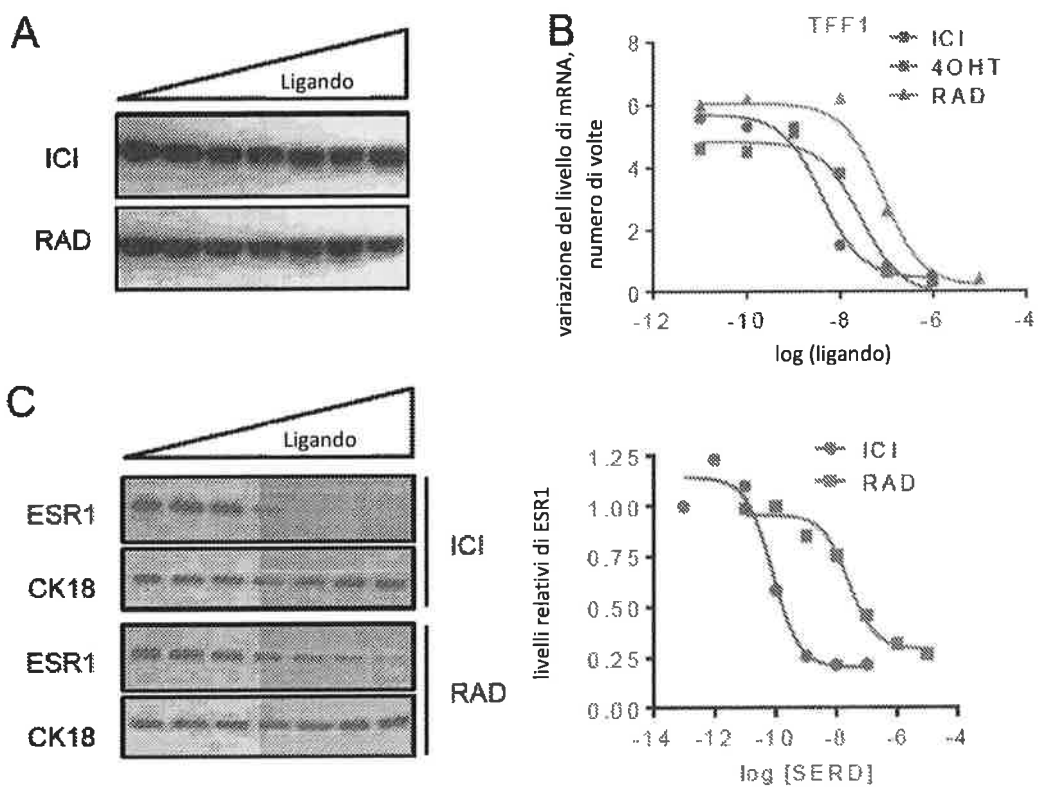


Figure 7D

D

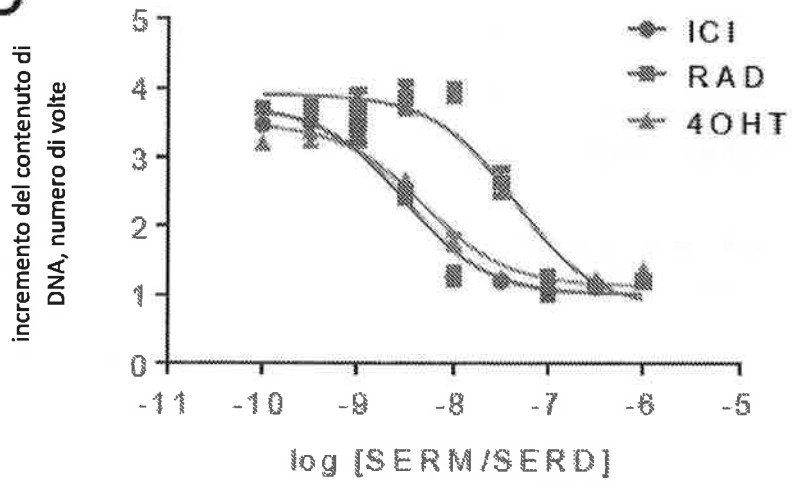
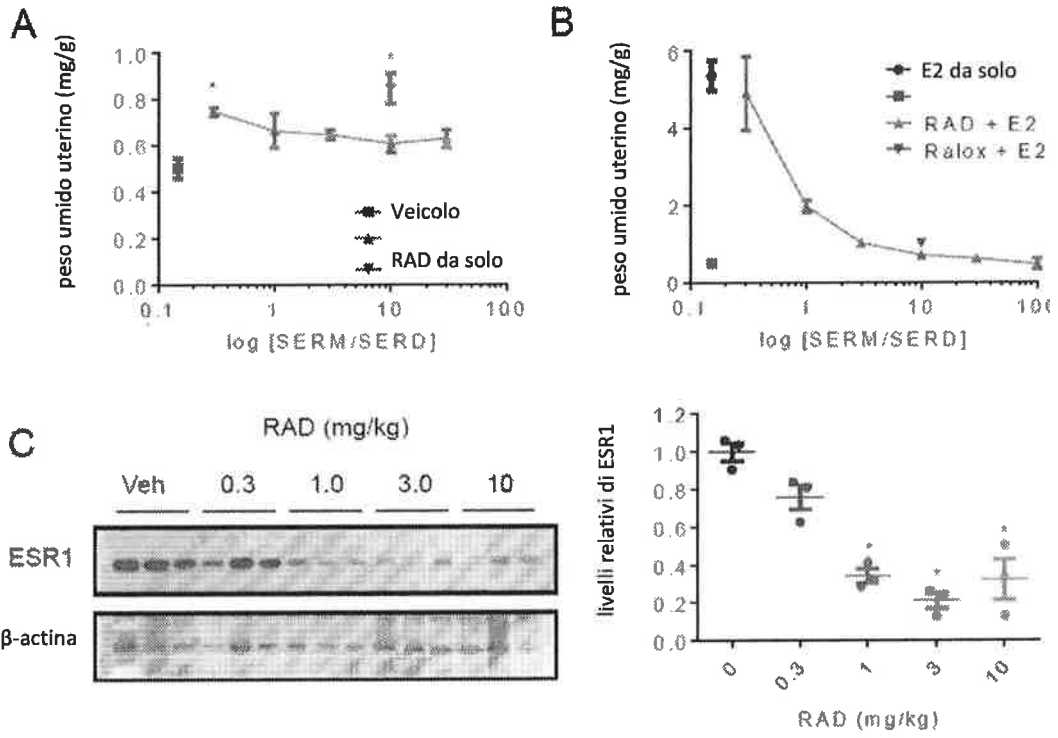


Figure 8A-8C



A

Figure 9A–9E

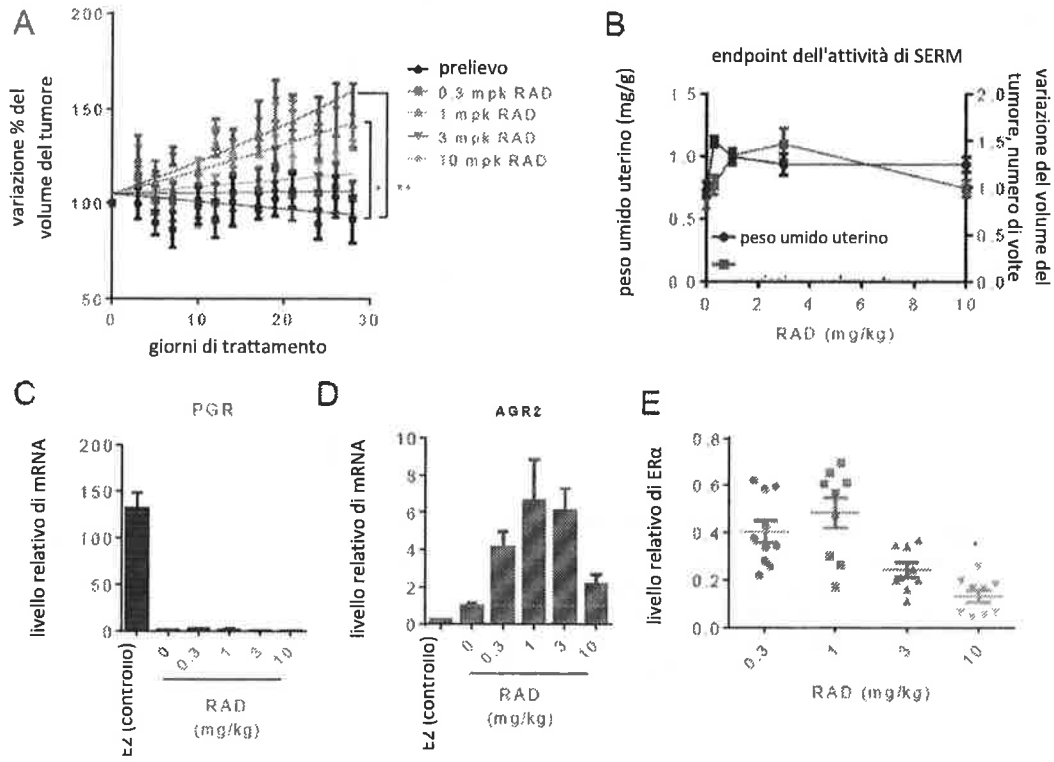


Figure 10A–10C

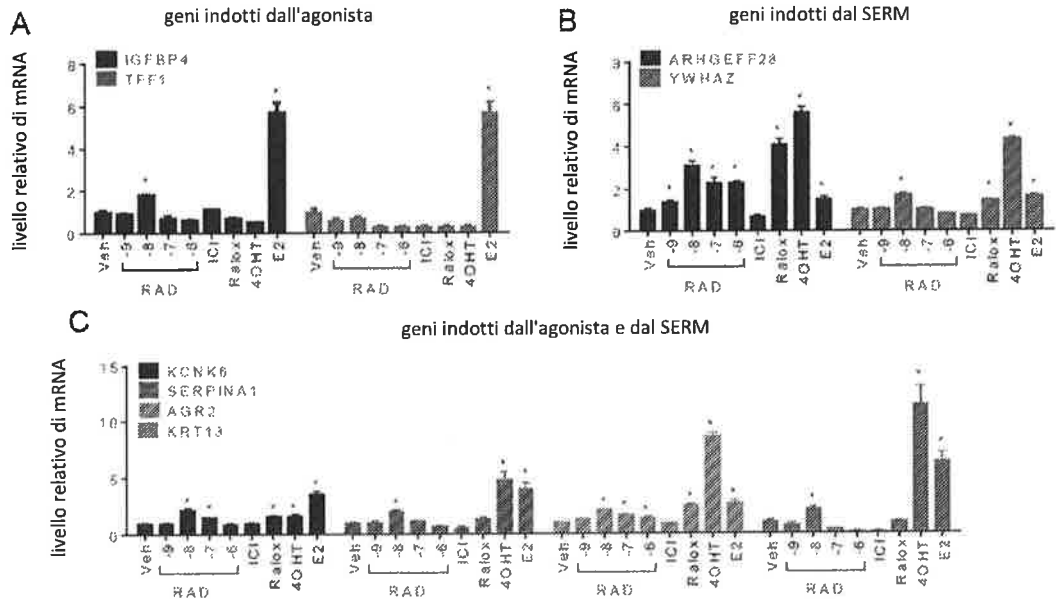


Figure 10D-10E

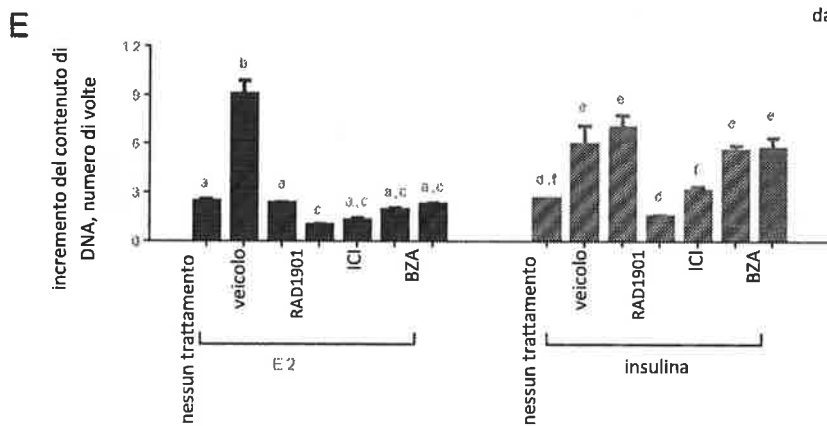
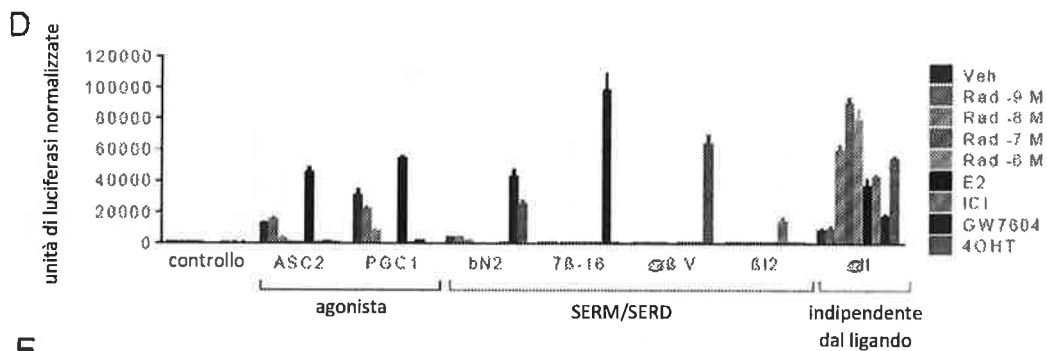


Figura 11

