

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392220** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.10.31

(51) Int. Cl. **C07D 491/052** (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.07.11

(54) **СЕЛЕКТИВНЫЕ СУПРЕССОРЫ РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА**

(31) **62/697,100**

(32) **2018.07.12**

(33) **US**

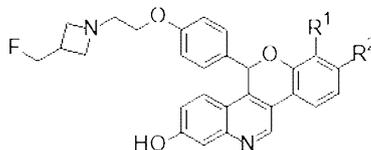
(62) **202291144; 2019.07.11**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Бастиян Джоли Энн, Коэн Джеффри
Дэниел, Рубио Алмудена, Солл Дэниел
Джон, Макмахон Дженнифер Энн (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) Описываются новые селективные супрессоры рецепторов эстрогена (ССРЭ) формулы



их фармацевтически приемлемые соли и их фармацевтические композиции, в которых или R¹, или R² независимо выбирают из Cl, F, -CF₃ или -CH₃, а другой представляет собой водород, способы их применения.

A1

202392220

202392220

A1

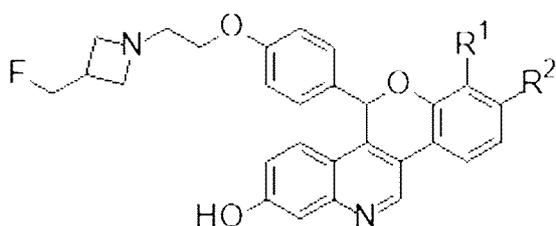
СЕЛЕКТИВНЫЕ СУПРЕССОРЫ РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Селективные супрессоры рецептора эстрогена (ССРЭ) связываются с рецептором эстрогена (РЭ) и подавляют опосредованную РЭ транскрипционную активность. Это разрушение и даунрегуляция, вызванная ССРЭ, может быть полезно при лечении нарушений пролиферации клеток, таких как рак. Некоторые примеры низкомолекулярных ССРЭ описаны в литературе (см., например, WO2005073204, WO2014205136 и WO2016097071). Однако известные ССРЭ пока не так полезны, как это необходимо для эффективного лечения рака. Например, обнаружение ССРЭ с лучшими фармакокинетическими (ФК) и фармакодинамическими (ФД) свойствами, более высокой эффективностью при клиническом применении и хорошей биодоступностью при пероральном введении было бы очень полезным при лечении рака. Чистый антагонист ССРЭ с сильным ингибированием опосредованной РЭ транскрипции был бы особенно полезен при лечении рака. Существует потребность в новых ССРЭ для лечения таких видов рака, как рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка и рак легких, а также мутации из-за возникающей резистентности. В частности, существует потребность в новых ССРЭ для лечения РЭ-позитивного рака груди, рака желудка и/или рака легких.

СУТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соединения формулы:



и их фармацевтически приемлемые соли и их фармацевтические композиции представлены в данном документе. В этой формуле или R¹, или R² независимо выбирают из Cl, F, -CF₃ или -CH₃, а другой представляет собой водород.

Также предусмотрены способы применения описанных в данном документе соединений, их фармацевтически приемлемых солей и фармацевтических композиций для лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких. Способы включают введение терапевтически эффективного

количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, нуждающемуся пациенту.

Кроме того, предлагается соединение, описанное в данном документе, и его фармацевтически приемлемые соли для применения в терапии. Описанные в данном документе соединения и их фармацевтически приемлемые соли можно использовать в лечении рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких.

Также предлагается применение описанных в данном документе соединений и их фармацевтически приемлемых солей для производства лекарственного средства для лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны новые тетрациклические соединения и их фармацевтические соли, которые действуют как ССРЭ. Недавно открытые ССРЭ, которые описаны в данном документе, обеспечивают ингибирование опосредованной РЭ транскрипции, что будет полезно при лечении таких видов рака, как рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка и рак легких, а также мутации из-за возникающей резистентности. Эти ССРЭ могут использоваться либо в качестве отдельных агентов, либо в комбинации с другими классами лекарственных средств, включая селективные модуляторы рецептора эстрогена (СМРЭ), ингибиторы ароматазы, ингибиторы CDK4, ингибиторы CDK6, ингибиторы PI3K и ингибиторы mTOR для лечения рака, позитивного по рецептору гормонов, таких как рак груди, рак желудка и/или рак легких.

Описанные в данном документе новые соединения представлены Формулой I:

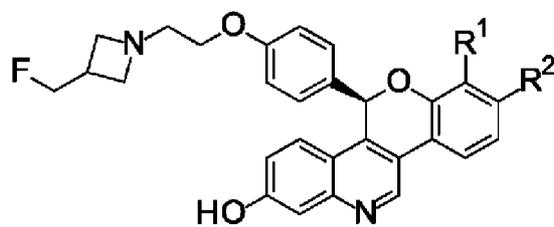


I

и их фармацевтически приемлемыми солями, где или R¹, или R² независимо выбирают из Cl, F, -CF₃ или -CH₃, а другой представляет собой водород. Специалист в данной области поймет, что соединения, описанные Формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли содержат хиральный центр, положение которого обозначено * выше.

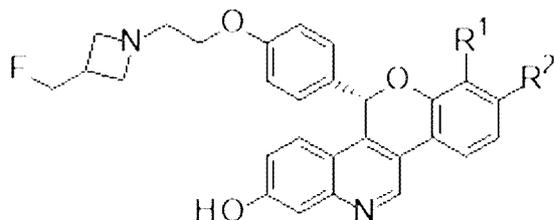
Специалист в данной области техники также поймет, что обозначения по Кану-Ингольду-Прелогу (R) или (S) для хиральных центров будут варьироваться в зависимости от схем замещения вокруг хирального центра. Хиральный центр в соединении Формулы I обеспечивает R-энантиомерную форму, представленную Формулой II:

5



II

А S-энантиомерная форма, представленная Формулой III:



III

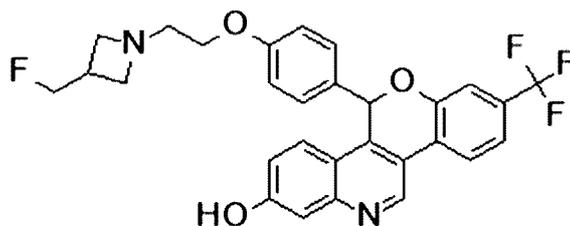
10

Все индивидуальные стереоизомеры, энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров и диастереомеров соединений Формулы I, Формулы II и Формулы III, включая рацематы, включены в объем описанных в данном документе соединений. Соединения для фармацевтического применения, которые содержат хиральные центры, часто выделены в виде отдельных энантиомеров или диастереомеров, и такие выделенные соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III включены в объем соединений, описанных в данном документе. Специалист в данной области также поймет, что соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, и их фармацевтически приемлемые соли могут быть дейтерированы (где водород может быть заменен дейтерием), и считается, что такие молекулы должны быть включены в объем описанных в данном документе соединений.

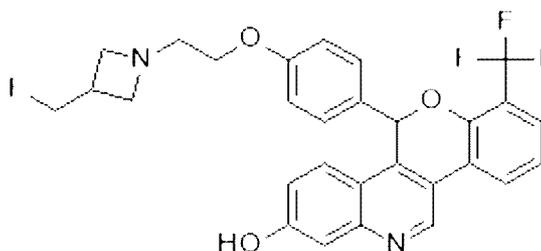
Конкретные примеры соединений Формулы I (включая номенклатурные названия IUPAC) показаны в данном документе:

25

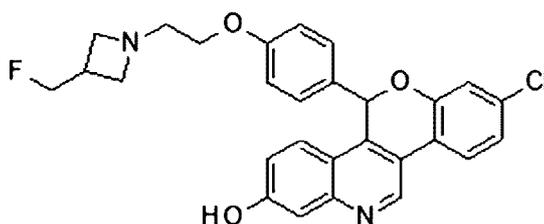
4



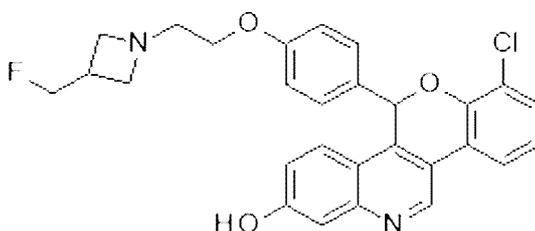
5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;



5 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;



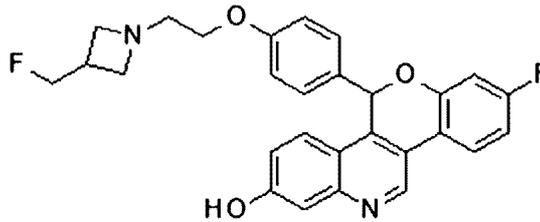
8-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;



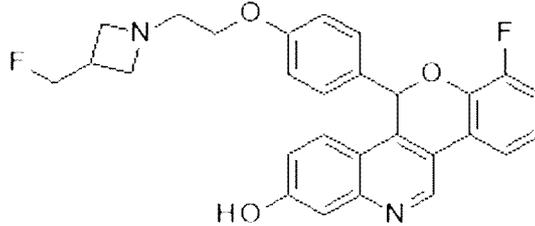
10

7-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;

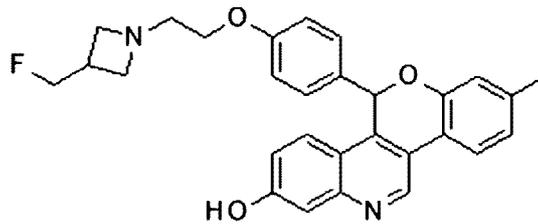
5



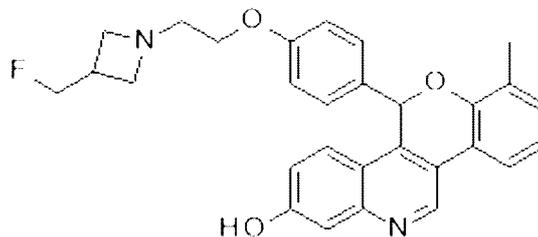
8-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;



5 7-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол;



5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол; и



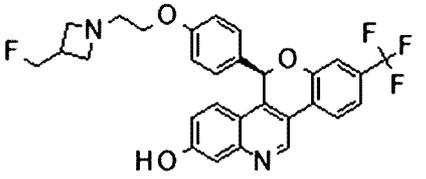
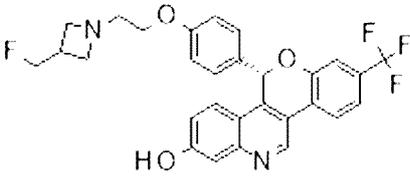
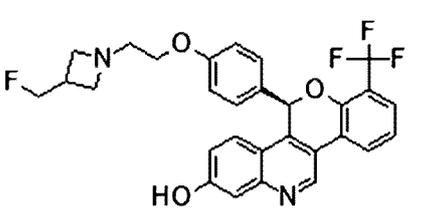
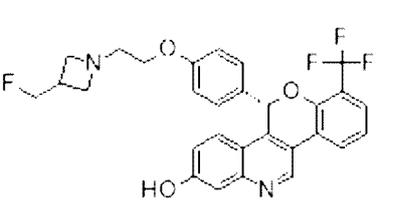
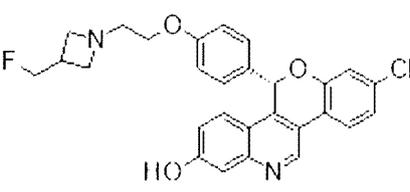
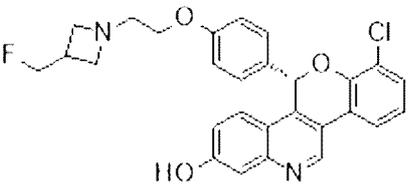
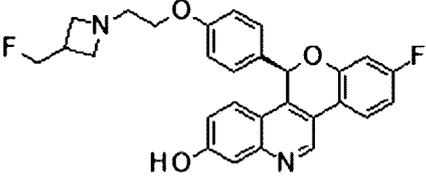
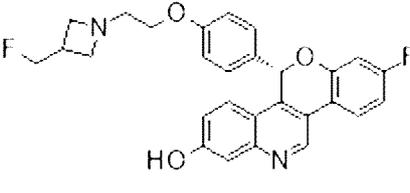
10

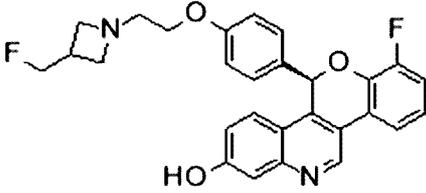
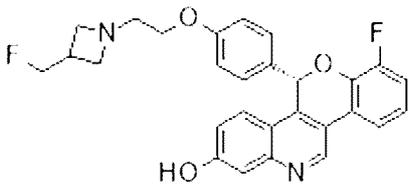
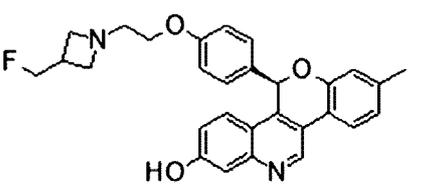
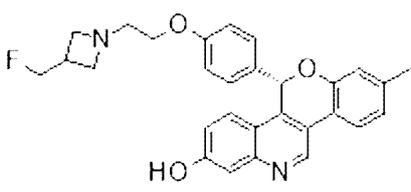
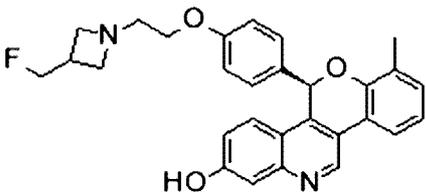
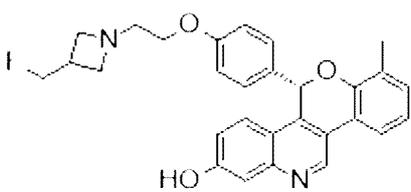
5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол.

Из-за хирального центра, указанного выше, каждый из этих конкретных примеров соединений Формулы I, показанных выше, имеет R- и S-энантиомерные формы (то есть, R-энантиомерные соединения Формулы II и S-энантиомерные соединения Формулы III), как показано в Таблице 1.

15

Таблица 1: Энантиомерные формы соединений Формулы I

| Химическое название | R-энантиомер (Формула II) | S-энантиомер (Формула III) |
|---|---|---|
| 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5H-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5H-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 8-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5H-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 7-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5H-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 8-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5H-[1]бензопирано[4,3- |  |  |

| | | |
|--|--|--|
| с]хинолин-2-ол | | |
| 7-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |
| 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  |  |

В данном документе также описаны фармацевтические композиции, включающие соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли в комбинации с фармацевтически приемлемым

5 наполнителем, носителем или разбавителем. Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых добавок. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая добавка(и)» относится к одному или нескольким носителям, разбавителям и

10 наполнителям, которые совместимы с другими добавками композиции или состава и не вредны для пациента. Соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III или их фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, вводимых различными путями, такими как перорально или внутривенно. Биодоступность часто является фактором лечения рака, и полезна возможность выбора способов введения и фармацевтических композиций для

15 контроля или оптимизации биодоступности активного ингредиента. Например, пероральная биодоступная композиция ССРЭ будет особенно полезной. Считается, что

соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III или их фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, обладают пероральной биодоступностью. Примеры фармацевтических композиций и способов их получения можно найти в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L. V. Allen Jr, Editor, 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012.

5 Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и эксципиентов включают следующее: физиологический раствор, вода, крахмал, сахара, маннит и производные силикона; связывающие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; каолин и бентонит; и полиэтиленгликоли.

10 Далее в данном документе описаны способы лечения рака. Описанные в данном документе способы включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли. Например, способ введения эффективного количества соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III,
15 описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли, может представлять собой пероральное введение. Рак может быть раком, чувствительным к эстрогену. Кроме того, раком может представлять собой рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка или рак легких. Например, рак может быть РЭ-позитивным раком груди, РЭ-позитивным раком желудка или РЭ-позитивным
20 раком легких.

В данном документе также описаны соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли для применения в терапии. Также в данном документе представлены соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их
25 фармацевтически приемлемые соли для применения при лечении рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка, или рак легких. В частности, рак может быть РЭ-позитивным раком груди, РЭ-позитивным раком желудка или РЭ-позитивным раком легких. Например, соединение Формулы I, Формулы II и Формулы III или их фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально.

30 Кроме того, соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли можно использовать в производстве лекарственного средства для лечения рака. Например, лекарство можно вводить перорально. Типы рака, для лечения которых могут быть использованы описанные в данном документе лекарственные средства, включают рак груди, рак
35 яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка или рак легких. В

частности, рак может быть РЭ-позитивным раком груди, РЭ-позитивным раком желудка или РЭ-позитивным раком легких.

Соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, и их фармацевтически приемлемые соли могут иметь клиническое применение в качестве единственного агента или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими агентами (например, противораковыми агентами) для лечения рака, такого как рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка или рак легких. При использовании в комбинации с другими терапевтическими агентами (такими как противораковые агенты) соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли можно использовать одновременно, последовательно или отдельно с другими лечебными средствами. Примеры классов лекарств, с которыми соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть скомбинированы, включают СМРЭ, ингибиторы ароматазы, ингибиторы CDK4, ингибиторы CDK6, ингибиторы PI3K и ингибиторы mTOR для лечения рака груди, позитивного по рецептору гормонов. Более конкретные примеры лекарственных средств, с которыми можно комбинировать соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли, включают абемациклиб (ингибитор CDK4/6), эверолимус (ингибитор mTOR), алпелисиб (ингибитор PIK3CA) и 8-[5-(1-гидрокси-1-метилэтил)пиридин-3-ил]-1-[(2S)-2-метоксипропил]-3-метил-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-c]хинолин-2-он (ингибитор PI3K/mTOR).

Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к количеству или дозе соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению. Предпочтительно желаемый эффект представляет собой ингибирование пролиферации опухолевых клеток, гибель опухолевых клеток или оба. Соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, дневные дозировки обычно находятся в дневном диапазоне от около 100 мг до около 2000 мг.

Используемый в данном документе термин «лечить», «лечащий» или «лечение» относится к ограничению, замедлению, остановке или реверсированию прогрессирования или тяжести существующего симптома или расстройства.

Используемый в данном документе термин «пациент» относится к человеку, который поражен определенным заболеванием, расстройством или состоянием.

Соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли можно получать различными способами, известными в данной области техники, некоторые из которых проиллюстрированы ниже на схемах и в Примерах получения и Примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать по-разному или в сочетании со стадиями из разных методик, с получением соединений Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Продукты стадий синтеза можно выделять стандартными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрацию, растирание и кристаллизацию. Указанные реагенты и исходные материалы легко доступны специалистам в данной области техники.

Промежуточные соединения и способы, используемые для синтеза соединений Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанных в данном документе, предназначены для включения в это описание. Кроме того, определенные промежуточные соединения, описанные в данном документе, могут содержать одну или несколько защитных групп. Вариабельная защитная группа может быть в каждом случае одинаковой или различной, в зависимости от конкретных условий реакции и конкретных проводимых превращений. Условия защиты и снятия защиты хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в литературе (см., например, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Отдельные изомеры, энантиомеры и диастереомеры могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанных в данном документе, такими способами, как способ селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Хотя отдельные изомеры, энантиомеры и диастереомеры могут быть отделены или разделены, как указано, их обозначения по Кану-Ингольду-Прелогу (R) или (S) для хиральных центров, возможно, еще не определены. Если обозначения по Кану-Ингольду-Прелогу (R) или (S) недоступны, используются идентификаторы «изомер 1» и «изомер 2», которые комбинируются с названием по IUPAC без обозначения стереохимии по Кану-Ингольду-Прелогу. Соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III,

обозначенные в данном документе как «изомер 1» или «изомер 2», выделены, как определено в конкретных описаниях экспериментов ниже. Независимо от того в каком порядке изомеры «1» или «2» Формулы I, Формулы II и Формулы III элюируются из колонки для хиральной хроматографии в указанных условиях, «изомер 1» элюируется из колонки первым при указанных условиях. Если хиральная хроматография инициируется на ранней стадии синтеза, то же обозначение применяется к последующим промежуточным продуктам и соединениям Формулы I, Формулы II и Формулы III.

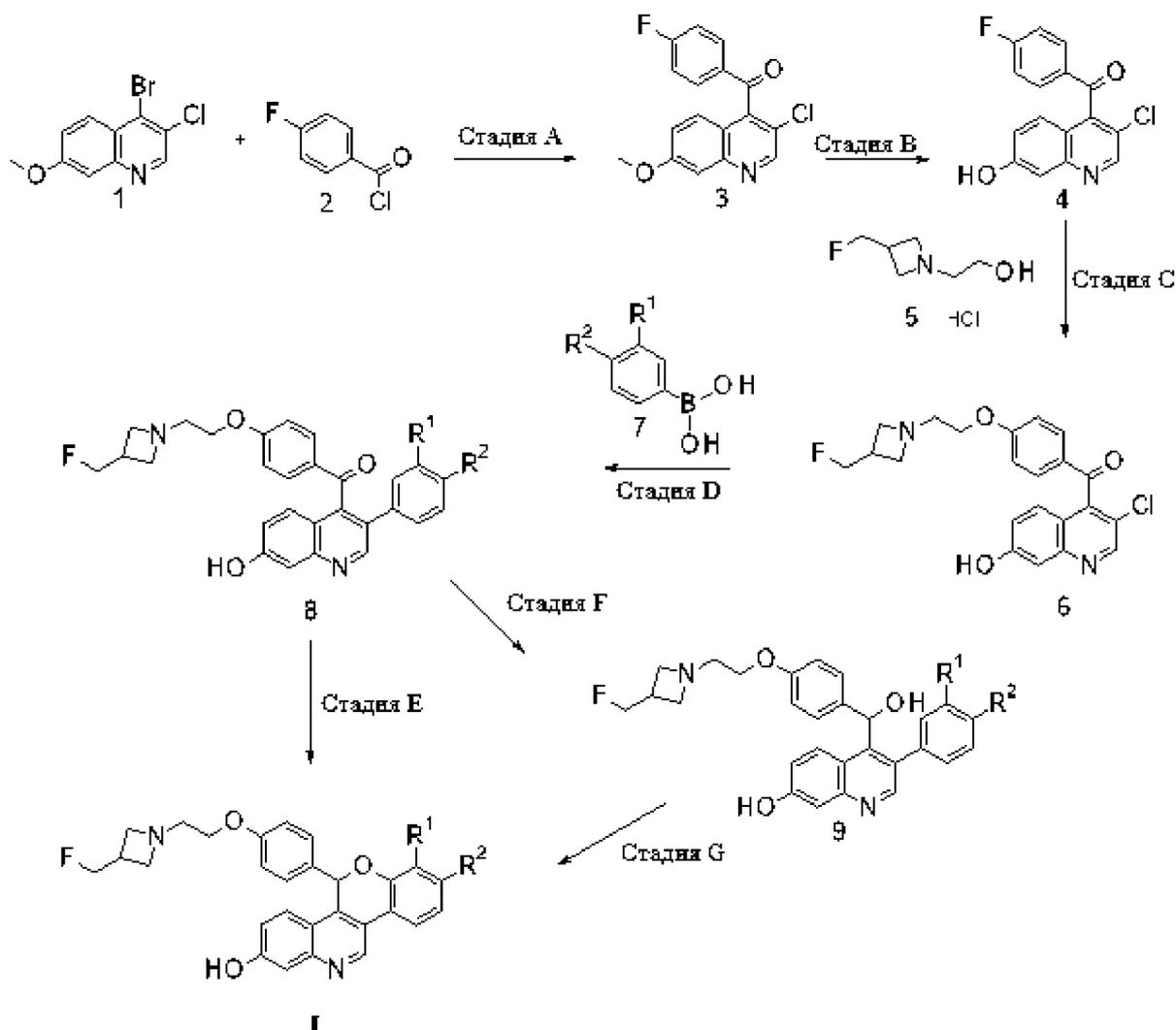
Если не указано иное, используемые в данном документе сокращения определены в соответствии с *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, No. 1, 1984. Другие сокращения определены следующим образом: «ACN» относится к ацетонитрилу; «BSA» относится к альбумину бычьей сыворотки; «cataCXium® A Pd G3» относится к [(ди(1-адамантил)бутилфосфин)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]метансульфонату палладия (II); «DCM» относится к дихлорметану или метиленхлориду; «DMA» относится к диметилацетамиду; «DMEA» относится к диметилэтиламину; «DMEM» относится к среде Игла, модифицированной Дульбекко; «DMF» относится к N,N-диметилформамиду; «DMSO» относится к диметилсульфоксиду; «ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; «кДНК» относится к комплементарной ДНК; «ДНКаза» относится к дезоксирибонуклеазе; «ДТТ» относится к дитиотреитолу; «EC₅₀» относится к концентрации агента, которая вызывает 50% ответ целевой активности по сравнению с заранее определенным позитивным контрольным соединением (абсолютное EC₅₀); «EDTA» относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; «ee» относится к энантиомерному избытку; «PЭa» относится к альфа-рецептору эстрогена; «PЭβ» относится к бета-рецептору эстрогена; «EtOAc» относится к этилацетату; «EtOH» относится к этанолу или этиловому спирту; «FBS» относится к фетальной бычьей сыворотке; «HBSS» относится к сбалансированному солевому раствору Хэнка; «HEC» относится к гидроксиэтилцеллюлозе; «HEPES» относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; «ВЭЖХ» относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; «IC₅₀» относится к концентрации агента, которая вызывает 50% максимальной ингибирующей реакции, возможной для этого агента, (относительная IC₅₀) или концентрации агента, которая вызывает 50% ингибирование активности целевого фермента по сравнению с контролем плацебо (абсолютное IC₅₀); «IPA» относится к изопропиламину; «iPrOH» относится к изопропанолу или изопропиловому спирту; «ВВ» относится к внутривенному введению; «K_i» относится к константе ингибирования; «MEK» относится к метилэтилкетону; «MeOH» относится к метиловому спирту или метанолу; «MTBE» относится к метил-*трет*-бутиловому эфиру; «PBS» относится к физиологическому раствору с фосфатным

буфером; «ПО» относится к пероральному введению; «РПа» относится к альфа-рецептору прогестерона; «QD» относится к дозировке один раз в день; «РНК» относится к рибонуклеиновой кислоте; «РНКаз» относится к рибонуклеазе; «ОТ-ПЦР» относится к полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; «ОТ-кПЦР» относится к количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; «СЖХ» относится к сверхкритической жидкостной хроматографии; «TED₅₀» относится к эффективной дозе для достижения 50% ингибирования мишени в опухолях; «ТНФ» относится к тетрагидрофурану; «t_(R)» относится ко времени удерживания; «XantPhos Pd G2» относится к хлор[(4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен)-2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладию (II); и «XPhos Pd G2» относится к хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладию (II).

Следующие способы получения и примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение.

Получение и Примеры

Схема 1



На Схеме 1 показан синтез соединений Формулы I.

- 5 На стадии А осуществляется реакция Гриньяра. Реакция Гриньяра хорошо известна в данной области как реакция образования углерод-углеродных связей. Реакция включает металлоорганическую реакцию, в которой арилмагнигалогенид, реактив Гриньяра, присоединяется к карбонильной группе, такой как хлорангидрид соединения 2, с получением соединения Стадии А. Например, 4-хлорзамещенный хинолон,
- 10 соединение 1, обрабатывают реактивом Гриньяра, таким как изопропилмагниихлорид, с образованием промежуточного продукта Гриньяра с последующим добавлением хлорангидрида, 4-фторбензоилхлорида, соединения 2, в растворителе, таком как THF. По завершении реакцию можно погасить водой с получением соединения 3.

- 15 На Стадии В арилметилловый эфир соединения 3 может быть деметилирован в различных условиях, известных специалисту в данной области, таких как обработка

трибромидом бора. Например, соединение **3** медленно обрабатывают трибромидом бора при температуре около 0 °С в растворителе, таком как DCM. Смесь перемешивают при комнатной температуре и гасят двухосновным фосфатом калия с получением соединения **4**.

5 На Стадии С, азетидиновый эфир **6** может быть образован обработкой соответствующего *n*-фторфенилкетона **4** и спиртовой соли азетидина **5** или соответствующего свободного основания подходящим основанием, например, гидридом натрия, *трет*-бутоксидом натрия или *трет*-бутоксидом калия в подходящем полярном апротонном растворителе, таком как DMF или THF, с получением эфира **6**.

10 Затем соединение **6** алкилируют соответствующей замещенной арилбороновой кислотой, соединением **7**, в реакции конденсации Сузуки с получением соединения **8** на Стадии D. Специалист в данной области поймет, что существует множество условий, которые могут быть полезны для облегчения таких реакций конденсации. Подходящие палладиевые реагенты могут включать XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, хлорид бис(трифенилфосфин)палладия (II), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) с
15 бис(трифенилфосфин)палладия (II), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) с трициклогексилфосфином, хлорид (1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен)палладия (II), тетракистрифенилфосфин палладия или ацетат палладия (II). Подходящие основания могут включать фторид калия, карбонат цезия, карбонат натрия, карбонат калия, трет-
20 бутоксид лития или трехосновный моногидрат фосфата калия. Соединение **6**, например, может реагировать с соответствующей бороновой кислотой, соединением **7**, таким как 2-
фтор-4-(трифторметил)фенилбороновая кислота в растворителе, таком как 2-метил-2-
бутанол, с основанием, таким как карбонат калия, и катализатором, таким как XPhos Pd
G2, и нагрета до около 80 °С в условиях микроволнового облучения, с получением
соединения **8**.

25 Специалист в данной области поймет, что Стадия D, реакция конденсации Сузуки, может быть завершена до образования азетидинового эфира на Стадии С.

 Специалист в данной области поймет, что на Стадии E соединение **8** можно циклизовать путем начального восстановления кетона. Это может быть выполнено с использованием восстанавливающего агента, такого как триэтилборогидрид лития, в
30 таких растворителях, как 1,4-диоксан и THF, и при температуре от около 0 °С до комнатной температуры, с получением соответствующего вторичного спирта. Этот промежуточный спирт можно использовать неочищенным и депротонировать при помощи подходящего основания, такого как карбонат цезия, гидрид натрия, *трет*-бутоксид натрия или *трет*-бутоксид калия, в растворителе, таком как THF, DMSO или DMF. Полученный
35 алкоксид может циклизоваться в арилфторид при комнатной температуре, при нагревании

до кипения или при температуре около 60 °С. Замещенный циклический эфир, образующийся при замещении фторида, затем может быть получен с образованием соединений Формулы I.

Альтернативно, кетон **8** можно восстановить до спирта и хирально очистить на Стадии F с получением хирального спирта **9**, и затем циклизовать на Стадии G, как описано выше для Стадии E, с получением соединений Формулы I.

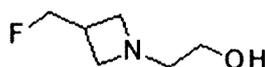
В другой альтернативной реакции кетон может быть восстановлен с использованием хирального реагента, такого как (R)-(+)- α . α -дифенил-2-пирролидинметанол вместе с триметилборатом и боран-диметилсульфидом, непосредственно с получением желаемого хирального спирта, соединения **9**, который затем можно циклизовать на Стадии G, как описано выше для стадии E, с получением соединений Формулы I.

На необязательной стадии может быть получена фармацевтически приемлемая соль соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III, как описано в данном документе, посредством взаимодействия соответствующего свободного основания Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанных в данном документе, с подходящей фармацевтически приемлемой кислотой в подходящем растворителе в стандартных условиях. Кроме того, указанные соли можно получать одновременно с удалением азотзащитных групп. Возможное образование фармацевтически приемлемых солей хорошо известно. См., например, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); и Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977). Специалистам в данной области техники будет понятно, что соединение Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанное в данном документе, может быть легко превращено и выделено в виде фармацевтически приемлемой соли. Примеры полезных солей включают, но не ограничиваются ими, соли бензолсульфоновой кислоты и соли 4-метилбензолсульфоновой кислоты. Соли 4-метилбензолсульфоновой кислоты также известны как тозилатные соли.

30

Синтез 1

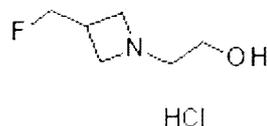
2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол



Добавляют триацетоксиборгидрид натрия (405 г, 1,91 моль) порциями в течение 15 минут к перемешиваемому раствору 3-(фторметил)азетидина гидрохлорида (160 г, 1,28 моль) в DCM (2,4 л) в атмосфере N₂ при 0 °С и перемешивают при 0 °С в течение 10 минут. Добавляют 1,4-диоксан-2,5-диол (99 г, 0,83 моль) при 0 °С, 6 порций в течение 1 часа, затем перемешивают при 0-5 °С в течение 15 минут. Позволяют реакционной смеси нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 2 часов в атмосфере N₂. Реакционную смесь охлаждают до 10-15 °С в течение 20 минут, затем нагревают до 25-30 °С и выдерживают при этой температуре в течение 2 часов. Добавляют воду (800 мл) в течение 25-30 минут при 10-15 °С, позволяют нагреться до комнатной температуры в течение 5-10 минут, и затем разделяют слои. Водный слой промывают DCM (800 мл), разделяют слои, затем охлаждают объединенные водные слои до 10-15 °С и доводят pH до 13-14, используя 50% раствор гидроксида натрия (~540 мл). Позволяют водному слою нагреться до комнатной температуры, экстрагируют DCM (4 × 800 мл), сушат сульфатом натрия (80 г), фильтруют и концентрируют досуха с получением указанного в заголовке соединения (139 г, 82%) в виде густого желтого масла. ЭС/МС (m/z): 134,1(M+H).

Синтез 2

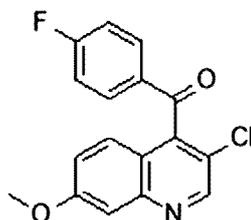
2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол гидрохлорид



Растворяют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол (529 г, 4 моль) в МТВЕ (2,6 л) и охлаждают до 0 °С. Добавляют раствор HCl/EtOH (492 мл, 30 мас.%) по каплям в течение 30 минут, затем перемешивают при 0 °С в течение 30 минут. Фильтруют твердые частицы и промывают осадок на фильтре МТВЕ (2 x 200 мл). Сушат в атмосфере N₂ в течение 8 часов с получением указанного в заголовке соединения (580 г, 86%) в виде белого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 134,0 (M+H).

Синтез 3

(3-Хлор-7-метоксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанон

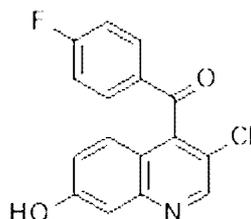


Охлаждают смесь 4-бром-3-хлор-7-метоксихинолина (70 г, 254 ммоль) в THF (1 л) до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере N_2 , что приводит к осаждению материала. Добавляют изопропилмагнийхлорид (2 М в THF, 254 мл, 509 ммоль) в течение 20 минут и перемешивают смесь в течение 1 часа. Добавляют раствор 4-фторбензоилхлорида (66 мл, 559 ммоль) в THF (140 мл) по каплям, затем позволяют раствору нагреться до комнатной температуры. Гасят реакцию насыщенным раствором NH_4Cl (300 мл) и водой (200 мл) и разделяют слои. Органический слой промывают насыщенным раствором NH_4Cl (300 мл), сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют, с получением маслянистого остатка. Сырое коричневое масло фильтруют через силикагель, элюируют смесью МТВЕ/гексаны (1:1), с получением сырого продукта в виде желтого твердого вещества (84 г). Обработывают твердое вещество 10% смесью метилацетат/гептан (800 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Фильтруют для сбора твердых частиц и запаса. Концентрируют фильтрат и очищают на силикагеле, элюируют смесью 10-40% EtOAc/гексаны, затем обрабатывают продукт 10% метилацетатом/гептаном (200 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученные твердые вещества фильтруют, объединяют с твердыми веществами от предыдущей фильтрации и сушат в вакууме в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (31 г, 38%) в виде желтого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 316,0 (M+H).

20

Синтез 4

(3-Хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанон



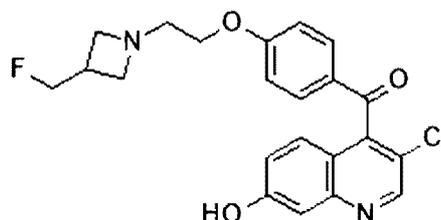
Добавляют трибромид бора (1 М в DCM, 295 мл, 295 ммоль) к смеси (3-хлор-7-метоксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанона (31 г, 98 ммоль) в DCM (217 мл) и перемешивают смесь при комнатной температуре в течение 3 дней. Медленно выливают смесь в раствор двухосновного фосфата калия (2 М в воде, 700 мл) и воды (200 мл) при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Смесь оставляют нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 1 часа. Раствор концентрируют в вакууме для удаления органических растворителей, фильтруют, собирают фильтрат и сушат фильтрат в вакууме при $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. Обработывают твердые вещества смесью DCM/гептан (1:1, 450 мл) и перемешивают в течение ночи. Собирают твердые вещества и сушат в вакууме в течение ночи с

30

получением указанного в заголовке соединения (32 г, количественный выход) в виде светло-коричневого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 302,0 (M+H).

Синтез 5

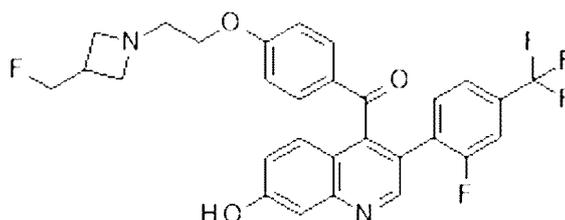
5 (3-Хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон



Добавляют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол гидрохлорид (3,90 г, 23,0 ммоль) к перемешиваемому раствору (3-хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанона (5,00 г, 15,3 ммоль) в DMF (75 мл) с последующим добавлением гидроксида натрия (60% в минеральном масле, 3,02 г, 76,8 ммоль). Перемешивают в атмосфере N₂ и нагревают до 40 °С в течение 45 минут. Гасят раствор водой и концентрируют. Разделяют остаток между 20% iPrOH/CHCl₃ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и разделяют, водный раствор экстрагируют 2 x 20% iPrOH/CHCl₃, объединяют органические экстракты, сушат объединенные органические слои над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют фильтрат с получением сырого продукта в виде темно-красного масла. Сырой материал очищают хроматографией на колонке с силикагелем, элюируют градиентом 5-10% 7 N NH₃ в MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (5,31 г, 84%) в виде желтого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 415,0 (M+H).

Синтез 6

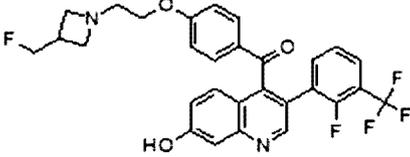
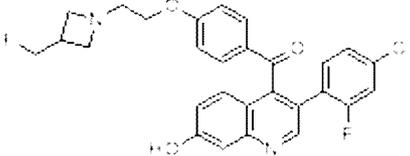
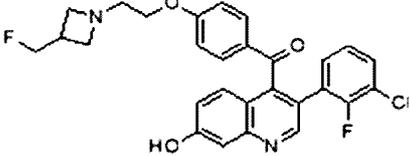
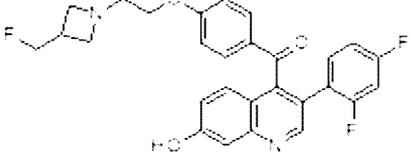
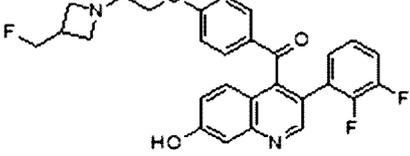
(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанон

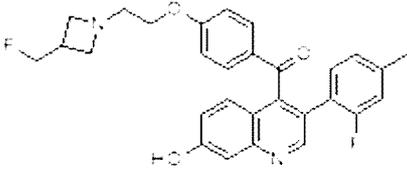
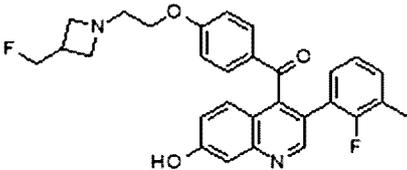


25 Дегазируют N₂ (5x) смесь (3-хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанона (200 мг, 0,48 ммоль), 2-фтор-4-

- (трифторметил)фенилбороновой кислоты (158 мг, 0,72 ммоль), карбоната калия (202 мг, 1,45 ммоль), 2-метил-2-бутанола (3 мл) и воды (1 мл) в сосуде для микроволновой обработки. Добавляют XPhos Pd G2 (12 мг, 0,015 ммоль), герметизируют и помещают в микроволновую печь при 80 °С на 2 часа. Разделяют остаток между МТВЕ и насыщенным
- 5 раствором NH₄Cl. Разделяют слои и экстрагируют водную фазу МТВЕ. Объединяют органические экстракты, сушат сульфатом магния, фильтруют и концентрируют фильтрат с получением оранжевого остатка. Сырой материал очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют 5% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (205 мг, 78%) в виде желтого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 543,2 (M+H).
- 10 Получают следующие соединения способом, по сути аналогичным способу Синтеза 6, со следующими вариантами способа, продолжительностью нагревания 1-2 часа, экстракцией МТВЕ или EtOAc и сушкой органических слоев сульфатом магния или сульфатом натрия. Очищают колоночной хроматографией на силикагеле, используя до
- 15 10% (MeOH или 7 М аммиак в MeOH) в DCM (Синтез 10: градиент 3-8% 7 М аммиак в MeOH в DCM; Синтез 9 и 11: градиент от 4 до 10% 7 М аммиак в MeOH в DCM) и/или обращенно-фазовой хроматографией при высоком рН, как указано.

Таблица 2: Соединения, полученные согласно Синтезу 6

| Синтез № | Химическое название | Структура | ЭС/МС (m/z) (M+H) |
|----------------|---|--|-------------------|
| 7 | (4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-3-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанон |  | 543,0 |
| 8 ^a | [3-(4-Хлор-2-фторфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил](4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон |  | 509,0 |
| 9 ^b | [3-(3-Хлор-2-фторфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил](4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон |  | 509,0 |
| 10 | [3-(2,4-Дифторфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил](4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон |  | 493,0 |
| 11 | [3-(2,3-Дифторфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил](4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон |  | 493,0 |

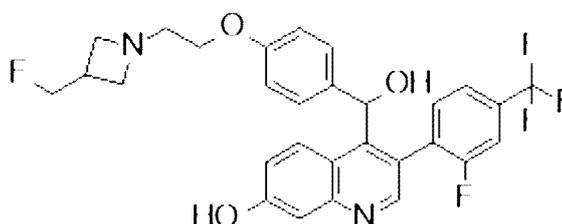
| | | | |
|----|--|--|-------|
| 12 | (4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)[3-(2-фтор-4-метилфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил]метанон |  | 489,2 |
| 13 | (4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)[3-(2-фтор-3-метилфенил)-7-гидроксихинолин-4-ил]метанон |  | 489,2 |

^a Очищают обращенно-фазовой флэш-хроматографией при высоком pH (колонка RediSep Rf GOLD® High Performance C18, элюируют 35-45% ACN в 10 мМ водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

^b После очистки на силикагеле, элюируют 4-10% 7 М аммик в MeOH в DCM, дополнительно очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией при высоком pH (колонка RediSep Rf GOLD® High Performance C18, элюируют 30-44% ACN в 10 мМ водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

Синтез 14

10 Рацемический 4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидроксиметил)-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол



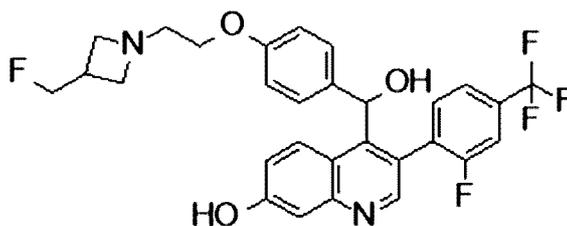
15 Добавляют (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанон (305 г, 562,2 ммоль) и THF (1,5 л) вместе в атмосфере N₂ и охлаждают раствор до 0-5 °С. По каплям добавляют триэтилборгидрид лития (1 М в THF, 1,5 л, 1,5 моль). Перемешивают при 0-5 °С в течение 1 часа. По каплям добавляют воду (300 мл) и насыщенный NH₄Cl (1 л). Смесь нагревают до комнатной температуры. Добавляют EtOAc (2 л) и собирают органический слой.

Органический слой промывают рассолом (500 мл), сушат над $MgSO_4$, фильтруют и концентрируют досуха. Остаток растворяют в смеси 95:5 ацетона и 2 М аммиака в MeOH и фильтруют через силикагель, с получением указанного в заголовке соединения (264 г, 86,2%) в виде оранжевого твердого вещества. ЭС/МС (m/z): 545,2 (M+H).

5

Синтез 15

4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидроксид)метил]-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол, Изомер 1



10 Очищают рацемический 4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидроксид)метил]-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол (354 г, 0,62 моль) хиральной хроматографией в следующих условиях: колонка Chiralpak AD-H, 150 x 50 мм, скорость потока 300 г/мин, УФ 350 нм, подвижная фаза 35% iPrOH с 0,5% DMEA/CO₂, температура колонки 40 °С с получением указанного в заголовке соединения

15 (171,4 г, 48%) первого элюируемого изомера. Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >98% ee, $t_{(R)}$ = 0,79 минуты, колонка: 4,6 × 150 мм Chiralpak AD-H, элюируют подвижной фазой 35% iPrOH с 0,5% DMEA в CO₂, скорость потока 0,6 мл/мин, УФ-детектирование 350 нм.

Альтернативный синтез 15

20 Добавляют триметилборат (65 мг, 0,62 ммоль) к раствору (R)-(+)-α,α-дифенил-2-пирролидинметанола (132 мг, 0,52 ммоль) в THF (20 мл). Смесь перемешивают в атмосфере N₂ при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляют боран-диметилсульфид (2,0 М в THF, 2,6 мл, 5,2 ммоль), а затем (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанон

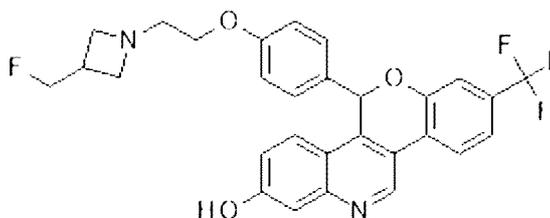
25 (1,0 г, 1,73 ммоль). Нагревают реакционную смесь в течение ночи при 45 °С. Добавляют дополнительно боран-диметилсульфид (2,0 М в THF, 2,6 мл, 5,2 ммоль) и перемешивают в течение 5 часов при 45 °С. Медленно добавляют насыщенный раствор NH₄Cl (25 мл) и выделяют органическую фазу. Повторно экстрагируют водный экстракт 20% iPrOH/CHCl₃. Органические экстракты объединяют, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и

30 упаривают, с получением промежуточного боранового комплекса (1,2 г). Растворяют одну треть промежуточного боранового комплекса (0,4 г, 0,6 ммоль) в 1,4-диоксане (4 мл) и

этаноламине (0,3 мл, 5 ммоль) и нагревают реакционную смесь до 70 °С в течение 3 часов. Гасят реакцию насыщенным раствором NH₄Cl (25 мл) и выделяют органическую фазу. Повторно экстрагируют водный экстракт 20% iPrOH/CHCl₃ (4 x 25 мл). Объединяют органические экстракты, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют досуха с
 5 получением указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества (0,33 г, 0,57 ммоль, выход 100%). ЖХ/МС (m/z): [M + H]⁺ 545. Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, 96% ее, t_(R) = 0,79 минуты, колонка: 4,6 × 150 мм Chiralpak AD-H, элюирование подвижной фазой 35% iPrOH с 0,5% DMEA в CO₂, скорость потока 0,6 мл/мин, УФ-детектирование
 10 350 нм.

ПРИМЕР 1

Рацемический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил}-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол

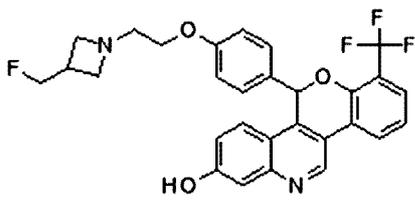
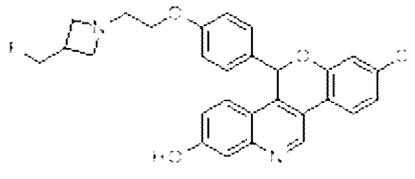


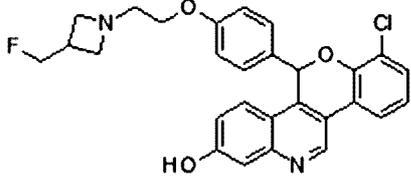
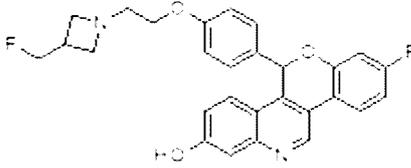
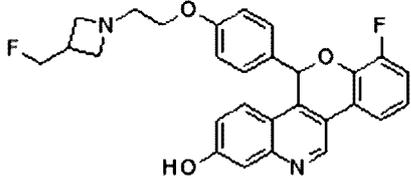
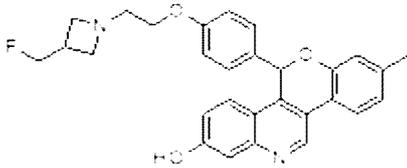
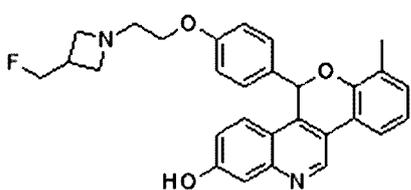
15 Охлаждают раствор (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил}{3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил} метанона (5,27 г, 9,71 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл) до 5 °С. Добавляют триэтилборгидрид лития (1 М в THF, 30,0 мл, 30,0 ммоль). Убирают охлаждающую баню и перемешивают 1,5 часа при комнатной
 20 температуре. Смесь гасят водой. Добавляют насыщенный раствор NH₄Cl и EtOAc. Разделяют слои и экстрагируют водный слой EtOAc. Органические экстракты объединяют, сушат над безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют фильтрат. Растворяют неочищенный остаток в THF (100 мл). Добавляют гидрид натрия (60% в минеральном масле, 1,94 г, 48,5 ммоль). Раствор кипятят с обратным холодильником 1,5
 25 часа. Добавляют дополнительно гидрид натрия (60% в минеральном масле, 1,94 г, 48,5 ммоль), затем кипятят с обратным холодильником еще 30 минут. Охлаждают раствор до комнатной температуры и гасят водой. Добавляют EtOAc и насыщенный раствор NH₄Cl. Разделяют слои и экстрагируют водный слой EtOAc. Органический экстракт объединяют, сушат над безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют фильтрат. Очищают остаток
 30 колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют градиентом 5-7% MeOH в DCM, с

получением указанного в заголовке соединения (3,70 г, выход 72%) в виде желтого пенистого вещества. ЭС/МС (m/z): 525,2 (M+H).

Следующие соединения получают способом, практически аналогичным способу Примера 1, со следующими вариантами методики. Для восстановления используют от 3 до 5 эквивалентов триэтилборгидрида лития со временем реакции от 30 минут до одного часа и сушат органические слои над сульфатом магния или сульфатом натрия. Неочищенный остаток используют непосредственно или очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют градиентом 0-5-7,5-10% MeOH в DCM перед циклизацией. Проводят циклизацию при нагревании с обратным холодильником в THF в течение 16 часов или в DMF, от 2 часов при комнатной температуре для Примера 2, до 2 часов при 85 °С для Примера 8. Экстрагируют DCM или EtOAc и сушат органические слои над сульфатом магния или сульфатом натрия. Очищают колоночной хроматографией на силикагеле, используя до 10% (MeOH или 7 М аммиак в MeOH) в DCM (Пример 2: градиент 0-10% MeOH в DCM; Пример 5: градиент 4-10% 7 М аммиак в MeOH в DCM; Пример 8: градиент 5-7,5% 7 М аммиак в MeOH в DCM) или при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ при высоком pH, как указано.

Таблица 3: Примеры Соединений, полученных согласно Примеру 1

| Пример № | Химическое название | Структура | ЭС/МС (m/z) (M+H) |
|----------------|--|--|-------------------|
| 2 | Рацемический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 525,2 |
| 3 ^a | Рацемический 8-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3- |  | 491,0 |

| | | | |
|----------------|--|--|-------|
| | с]хинолин-2-ол | | |
| 4 ^b | Рацемический 7-хлор- 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 491,0 |
| 5 ^c | Рацемический 8-фтор- 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 475,0 |
| 6 ^d | Рацемический 7-фтор- 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 475,0 |
| 7 ^e | Рацемический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 471,2 |
| 8 | Рацемический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол |  | 471,2 |

| | | | |
|--|---------------------------------------|--|--|
| | [1]бензопирано[4,3- с]хинолин-2-ол | | |
|--|---------------------------------------|--|--|

^a Очистка при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ с высоким pH (KINETEX® C18, 5 мкм, колонка 30 × 250 мм, элюируют 35-50% ACN в 10 mM водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

5 ^b Очистка при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ с высоким pH (KINETEX® C18, 5 мкм, колонка 30 × 250 мм, элюируют 35-43% ACN в 10 mM водном бикарбонате аммония с 5% MeOH)

10 ^c После очистки на силикагеле, элюируют 4-10% 7M аммиак в MeOH в DCM, проводят дополнительную очистку при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ при высоком pH (KINETEX® C18, 5 мкм, колонка 30 × 250 мм, элюируют 30-44% ACN в 10 mM водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

^d Очистка при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ при высоком pH (XBRIDGE® C18 5 мкм OBD, колонка 30 × 75 мм, элюируют 10-75% ACN в 10 mM водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

15 ^e Очистка при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ с высоким pH (XBRIDGE® C18 5 мкм OBD, колонка 30 × 75 мм, элюируют 10-60% ACN в 10 mM водном бикарбонате аммония с 5% MeOH).

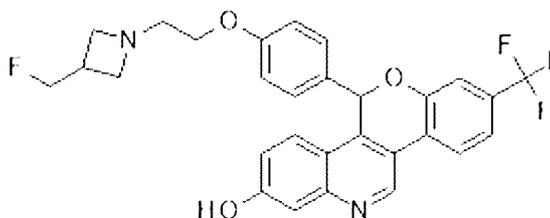
ПРИМЕР 1А

20 5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

и

ПРИМЕР 1В

5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



25 Разделяют два энантиомера 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол при помощи хиральной СЖХ в следующих условиях: колонка: LUX® Cellulose-1, 5 × 25 см; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (с 0,5% DMEA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 300

г/мин; длина волны УФ-детектирования: 270 нм с получением Примера 1А в качестве первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 525,2 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, $t_{(R)}$: 1,30 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке соединение Примера 1В, с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2). ЭС/МС (m/z): 525,2 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при помощи хиральной аналитической СЖХ, 98% ee, $t_{(R)}$: 2,03 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм.

Альтернативный синтез ПРИМЕРА 1В

Кристаллический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2
 Перемешивают 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, 4-метилбензолсульфоновую кислоту, Изомер 2 (23,8 г, 0,034 моль) в воде (250 мл) при 1000 об/мин. Добавляют NaOH (76 мкл) и перемешивают раствор в течение 2 часов. Добавляют DCM (600 мл). Разделяют смесь, сушат экстракт DCM сульфатом магния, фильтруют материал через шприцевой фильтр (0,45 мкм) и концентрируют досуха. Оставляют материал в потоке N₂ в течение выходных. Добавляют 1:1 EtOH/вода (80 мл) и перемешивают смесь ультразвуком. Собирают рыжевато-коричневое твердое вещество фильтрованием на нейлоновой мембране с получением указанного в заголовке соединения (10,47 г, 0,02 моль, 59%).

Рентгеновская порошковая дифрактометрия (РПД)

Рентгенограммы кристаллических твердых веществ получены на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенный источником CuK α и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали в диапазоне от 4 до 40 2 θ° , с шагом 0,008 2 θ° , и скоростью сканирования 0,5 секунд/шаг, и используя дивергенцию 1,0 мм, неподвижную отсеивающую решетку 6,6 мм и щель детектора 11,3 мм. Сухой порошок упаковывают в кварцевую кювету и гладкую поверхность получают при помощи предметного стекла. Дифрактограммы кристаллической формы снимали при температуре окружающей среды и относительной влажности. Положения пиков

кристаллов определяют в MDI-Jade после полного сдвига дифрактограмм на основе внутреннего стандарта NIST 675 с пиками при 8,853 и 26,774 $2\theta^\circ$. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и структура кристалла. Если присутствует влияние предпочтительной ориентации, интенсивности пиков изменяются, но характерные положения пиков полиморфа остаются неизменными. См., например, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Дополнительно, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной формы кристалла угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков могут смещаться из-за изменения температуры, при которой анализируется образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 2\theta^\circ$ учитывает эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков.

Полученный образец кристаллического 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, Изомер 2, характеризовали по рентгенограмме с использованием излучения CuK α , имеющего дифракционные пики (значения 2-тета), как описано в Таблице 3 ниже, и, в частности, имеющего пики при 19,8 в комбинации с одним или несколькими из пиков, выбранных из группы, состоящей из 6,8, 16,0 и 22,1; с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

Таблица 4: Пики рентгеновской порошковой дифрактометрии кристаллического Примера 1В

| Пик | Угол ($^\circ 2$ -тета) $\pm 0,2^\circ$ | Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика) |
|-----|--|---|
| 1 | 6,8 | 29,40 |
| 2 | 15,3 | 8,30 |
| 3 | 16,0 | 20,10 |
| 4 | 17,4 | 7,60 |
| 5 | 18,1 | 16,00 |
| 6 | 19,8 | 100,00 |
| 7 | 21,1 | 14,60 |

| | | |
|----|------|-------|
| 8 | 22,1 | 28,90 |
| 9 | 24,9 | 16,40 |
| 10 | 25,4 | 21,90 |

Альтернативный синтез ПРИМЕРА 1В

Растворяют 4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидрокси)метил]-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол, Изомер 1 (63,05 г, 104,7 ммоль) в DMSO (1,3 л) в атмосфере N₂ при комнатной температуре. Добавляют порциями карбонат цезия (108 г, 331 ммоль) в течение 5 минут. Нагревают смесь до 60 °С в течение 15 часов. Смесь охлаждают до комнатной температуры и разбавляют водой (2,1 л) и EtOAc (1,3 л). Смесь перемешивают 5 минут и разделяют. Повторно экстрагируют водный материал EtOAc (1,3 л) и перемешивают в течение 5 минут. Разделяют и объединяют органические экстракты, промывают рассолом, водой и EtOAc. Органические экстракты сушат над MgSO₄, концентрируют и сушат в вакууме в течение ночи при комнатной температуре с получением указанного в заголовке соединения в виде коричневого твердого вещества (52,69 г, 95,9%). Подтверждают энантиомерное обогащение Примера 1В при помощи хиральной аналитической СЖХ, 98,1% ee, *t*_R: 2,03 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм.

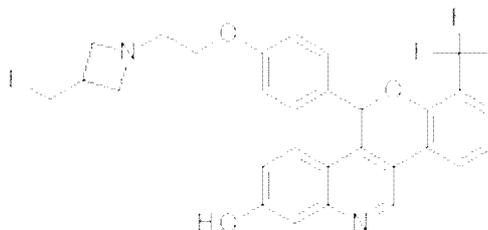
ПРИМЕР 2А

5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

и

ПРИМЕР 2В

5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



Разделяют два энантиомера 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола хиральной СЖХ в следующих условиях: колонка: CHIRALPAK® IC, 21 × 250 см; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 70 г/мин; длина

волны УФ-детектирования: 225 нм с получением Примера 2А в качестве первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 525,1 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ее, $t_{(R)}$: 1,56 минуты; колонка: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке соединение Примера 2В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2). ЭС/МС (m/z): 525,2 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при помощи хиральной аналитической СЖХ, 98% ее, $t_{(R)}$: 2,33 минуты; колонка: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм.

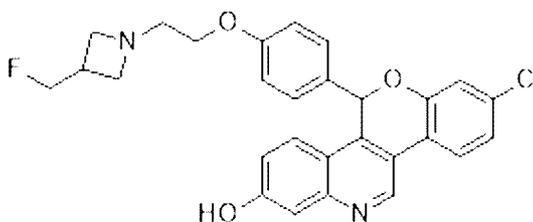
ПРИМЕР 3А

15 8-Хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

и

ПРИМЕР 3В

20 8-Хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



Разделяют два энантиомера 8-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола при помощи хиральной СЖХ в следующих условиях: колонка: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 см; элюируют подвижной фазой 35% MeOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 80 г/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм, с получением Примера 3А в качестве первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 491,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ее, $t_{(R)}$: 1,55 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке

соединение Примера 3В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2).
ЭС/МС (m/z): 491,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при
помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, $t_{(R)}$: 2,26 минуты; колонка:

5 CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в
CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-
детектирования: 225 нм.

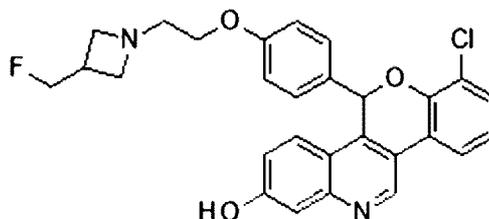
ПРИМЕР 4А

7-Хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-
10 [1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

и

ПРИМЕР 4В

7-Хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-5Н-
[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



15

Разделяют два энантиомера 7-хлор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-
ил]этокси}фенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола при помощи хиральной СЖХ в
следующих условиях: колонка: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 см; элюируют подвижной
фазой 35% MeOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 80

20 г/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм, с получением Примера 4А в качестве
первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 491,0 (M+H). Подтверждают
энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99%
ее, $t_{(R)}$: 1,71 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной
фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5

25 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке
соединение Примера 4В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2).
ЭС/МС (m/z): 491,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при
помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, $t_{(R)}$: 2,38 минуты; колонка:

30 CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в
CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-
детектирования: 225 нм.

ПРИМЕР 5А

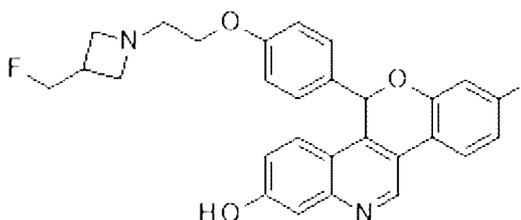
8-Фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

5

и

ПРИМЕР 5В

8-Фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



10 Разделяют два энантиомера 8-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола при помощи хиральной СЖХ в следующих условиях: колонка: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 см; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 80 г/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм, с получением Примера 5А в качестве

15 первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 475,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, *t*_(R): 1,56 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке

20 соединение Примера 5В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2). ЭС/МС (m/z): 475,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, *t*_(R): 2,29 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-

25 детектирования: 225 нм.

ПРИМЕР 6А

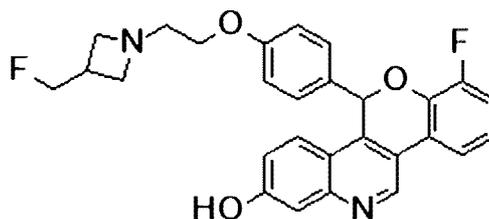
7-Фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

30

и

ПРИМЕР 6В

7-Фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2



5 Разделяют два энантиомера 7-фтор-5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола при помощи хиральной СЖХ в
следующих условиях: колонка: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 см; элюируют подвижной
фазой 35% MeOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 80
г/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм, с получением Примера 6А в качестве
10 первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 475,0 (M+H). Подтверждают
энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99%
ее, *t*_(R): 1,32 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной
фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5
мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке
15 соединение Примера 6В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2).
ЭС/МС (m/z): 475,0 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при
помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ее, *t*_(R): 1,95 минуты; колонка:
CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 35% MeOH (0,2% IPA) в
CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-
20 детектирования: 225 нм.

ПРИМЕР 8А

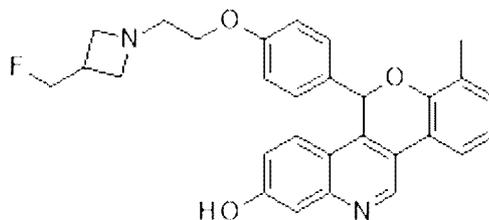
5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 1

и

ПРИМЕР 8В

5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2

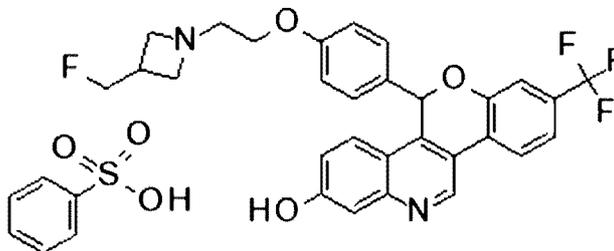
25



Разделяют два энантиомера 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-7-метил-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола при помощи хиральной СЖХ в следующих условиях: колонка: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 см; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (с 0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 80 г/мин; длина волны УФ-детектирования: 265 нм, с получением Примера 8А в качестве первого элюируемого энантиомера (Изомер 1). ЭС/МС (m/z): 471,2 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 1 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, *t*_(R): 1,47 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм. Выделяют указанное в заголовке соединение Примера 8В с получением второго элюируемого энантиомера (Изомер 2). ЭС/МС (m/z): 471,2 (M+H). Подтверждают энантиомерное обогащение Изомера 2 при помощи хиральной аналитической СЖХ, >99% ee, *t*_(R): 2,05 минуты; колонка: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 мм; элюируют подвижной фазой 30% iPrOH (0,2% IPA) в CO₂; температура колонки: 40 °С; скорость потока: 5 мл/мин; длина волны УФ-детектирования: 225 нм.

ПРИМЕР 9

5-(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2, бензолсульфовая кислота



Нагревают суспензию 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, Изомер 2 (Пример 1В) (100 мг, 0,19 ммоль) в ACN (3 мл) при 50 °С. Добавляют раствор моногидрата бензолсульфоновой кислоты (40 мг, 0,23 ммоль) в ACN (1 мл). Нагревают прозрачный желтый раствор в течение 10 минут при 50 °С. Прекращают нагревание, позволяют реакционной смеси

остыть до комнатной температуры и перемешивают смесь в течение ночи. Добавляют толуол (2 мл) и перемешивают реакционную смесь 2 часа. Раствор фильтруют, собирают образовавшееся твердое вещество и промывают твердое вещество ACN (1 мл). Сушат твердое вещество в вакууме, с получением указанного в заголовке соединения (74 мг, 55 %).

Альтернативный синтез ПРИМЕРА 9

Нагревают суспензию 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, Изомер 2 (Пример 1В) (124,1 мг, 0,24 ммоль) в МЕК (4 мл) при 50 °С. Добавляют раствор моногидрата бензолсульфоновой кислоты (50 мг, 0,28 ммоль), растворенный в МЕК (1 мл). Прекращают нагревание, позволяют реакционной смеси остыть до комнатной температуры и перемешивают смесь в течение выходных. Концентрируют в потоке N₂. Добавляют МЕК (1 мл) и суспендируют с получением желтого кристаллического твердого вещества. Собирают твердое вещество, промывают МЕК и сушат в вакууме при комнатной температуре с получением указанного в заголовке соединения (78,8 мг, 48%).

РД, Пример 9

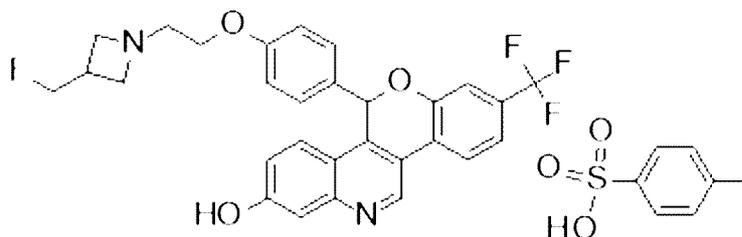
Выполняют РД, как описано для Примера 1В. Характеризуют полученный образец (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, Изомер 2, бензолсульфоновой кислоты по рентгенограмме с использованием излучения CuK α , имеющего дифракционные пики (значения 2-тета), как описано в Таблице 4 ниже, и, в частности, имеющего пики при 20,5 в комбинации с одним или несколькими пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,3, 22,2 и 23,1; с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

Таблица 5: Пики рентгеновской порошковой дифракции кристаллического Примера 9

| Пик | Угол ($^{\circ}2\text{-тета}$) $\pm 0,2^{\circ}$ | Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика) |
|-----|--|---|
| 1 | 7,6 | 27,10 |
| 2 | 10,6 | 34,50 |
| 3 | 12,3 | 42,10 |
| 4 | 12,6 | 32,30 |
| 5 | 17,7 | 32,80 |
| 6 | 19,2 | 26,70 |
| 7 | 20,5 | 100,00 |
| 8 | 22,2 | 45,50 |
| 9 | 23,1 | 36,30 |
| 10 | 24,2 | 29,80 |

ПРИМЕР 10

Кристаллический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, 4-метилбензолсульфоновая кислота, Изомер 2



Объединяют вместе 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол, Изомер 2 (Пример 1В) (204,2 г, 389 ммоль) и EtOAc (5 л) и перемешивают при 60 °С с последующим добавлением MeOH (200 мл) при 60 °С с получением прозрачного коричневого раствора. Добавляют указанный в заголовке продукт (11,48 г) для затравки раствора с последующим добавлением предварительно смешанного раствора 4-метилбензолсульфоновой кислоты; гидратируют (81,4 г, 428 ммоль) в EtOAc (800 мл) с получением желтой суспензии.

Перемешивают суспензию 30 минут при 50 °С. Концентрируют суспензию до ½ объема. Раствор охлаждают при комнатной температуре в течение 1 часа, фильтруют, собирают твердое вещество и промывают твердое вещество EtOAc. Сушат твердое вещество в вакууме при 30 °С в течение выходных с получением указанного в заголовке соединения

(239 г, 343 ммоль). Для дополнительной очистки материала добавляют указанное в заголовке соединение (229 г, 328,7 ммоль) и 2-пропанол (4,6 л) вместе и нагревают до 60 °С в течение 2 часов. Охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут. Фильтруют твердое вещество и промывают водой (100 мл). Сушат твердое вещество в потоке N₂ в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (174,4 г, 76,2%). Объединяют различные партии указанного в заголовке соединения, полученного по сути таким же образом, и добавляют гептан (2 л). Суспензию перемешивают в течение 30 минут, твердое вещество фильтруют и промывают гептаном (300 мл). Сушат собранное твердое вещество в потоке N₂ в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (199,7 г, 99,5%).

РД, Пример 10

Выполняют РД, как описано для Примера 1В. Характеризуют полученный образец 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, 4-метилбензолсульфоновой кислоты, Изомер 2 (Пример 10) по рентгенограмме с использованием излучения CuK α , имеющего дифракционные пики (значения 2-тета), как описано в Таблице 5 ниже, и, в частности, имеющего пики при 20,1 в комбинации с одним или несколькими пиками, выбранными из группы, состоящей из 12,8, 19,5 и 22,8; с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

**Таблица 6: Пики рентгеновской порошковой дифракции кристаллического
Примера 10**

| Пик | Угол ($^{\circ}$ 2-тета) +/- 0,2 $^{\circ}$ | Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика) |
|-----|--|---|
| 1 | 7,6 | 25,70 |
| 2 | 12,4 | 27,90 |
| 3 | 12,8 | 36,80 |
| 4 | 18,9 | 26,50 |
| 5 | 19,5 | 56,90 |
| 6 | 20,1 | 100,00 |
| 7 | 20,9 | 41,50 |
| 8 | 21,8 | 40,90 |
| 9 | 22,8 | 39,40 |
| 10 | 25,4 | 29,70 |

Биологические анализы

5 Доказательства взаимосвязи между экспрессией РЭ и некоторыми видами рака хорошо известны в данной области.

Результаты следующих анализов демонстрируют, что соединения Формулы I, Формулы II и Формулы III примеров представляют собой активные ССРЭ и считаются полезными при лечении рака.

10

Анализ конкурентного связывания РЭ α (дикий тип), РЭ α (мутант Y537S) и РЭ β

Целью следующих анализов конкурентного связывания РЭ является определение аффинности тестируемого соединения к РЭ α (дикий тип), РЭ α (мутант Y537S) и РЭ β .

15

Запускают анализ конкурентного связывания в буфере, содержащем 50 мМ HEPES, pH 7,5, 1,5 мМ EDTA, 150 мМ NaCl, 10% глицерин, 1 мг/мл яичного альбумина и 5 мМ DTT, используя 0,025 мКи на лунку ^3H -эстрадиола (118 Ки/ммоль, 1 мКи/мл), 7,2 нг/лунку РЭ α (дикий тип), или 7,2 нг/лунку РЭ α (Y537S мутант) или 7,7 нг/лунку РЭ β .

20

Добавляют тестируемое соединение в 10 различных концентрациях в диапазоне от 10000 нМ до 0,5 нМ и определяют неспецифическое связывание в присутствии 1 мкМ 17- β эстрадиола. Инкубируют реакцию связывания (140 мкл) в течение 4 часов при комнатной

температуре, и затем добавляют холодный декстран-угольный буфер (70 мкл) (содержащий на 50 мл аналитического буфера 0,75 г древесного угля и 0,25 г декстрана) к каждой реакции. Перемешивают планшеты в течение 8 минут на орбитальном шейкере при 4 °С, и затем центрифугируют при 3000 об/мин при 4 °С в течение 10 минут.

- 5 Переносят аликвоту (120 мкл) смеси в другой 96-луночный белый планшет с плоским дном (Costar) и добавляют сцинтилляционную жидкость Perkin Elmer Optiphase Supermix (175 мкл) в каждую лунку. Герметизируют планшеты и энергично встряхивают на орбитальном шейкере. После инкубации в течение 2,5 часов считывают данные планшетов на счетчике Wallac Microbeta. Рассчитывают IC_{50} с использованием 4-
- 10 параметрической логистической кривой и рассчитывают % ингибирования при 10 мкМ. Преобразовывают значения IC_{50} для соединения в K_i , используя уравнение Ченга-Пруссоффа. Результаты этого анализа демонстрируют, что Примеры 1, 1А и 1В (и другие) связываются с рекомбинантным РЭ α дикого типа и мутантом РЭ α (Y537S), как показано в Таблице 7 ниже, и также было определено, что Пример 1В связывается с РЭ β конкурируя
- 15 с K_i (нМ) РЭ β $0,11 \pm 0,07$, $n = 3$.

Таблица 7: результаты конкурентного связывания РЭ α (дикий тип), РЭ α (мутант Y537S) и РЭ β

| № примера | K _i (нМ) РЭ α (дикий тип) | K _i (нМ) РЭ α (мутант Y537S) |
|-----------|--|--|
| 1 | 0,87 | 5,80 |
| 1A | 12,45 \pm 9,32, n=3 | 57,18 \pm 39,13, n=3 |
| 1B | 0,31 \pm 0,38, n=5 | 2,79 \pm 3,00, n=5 |
| 2 | 2,17 | 6,78 |
| 2A | 0,65 | 7,92 |
| 2B | 60,4 | 293,6 |
| 3 | 2,36 | 6,69 |
| 3A | 8,11 | 27,23 |
| 3B | 0,59 | 2,79 |
| 4 | 0,64 | 12,11 |
| 4A | 16,78 | 54,97 |
| 4B | 0,34 | 2,34 |
| 5 | 2,82 | 19,47 |
| 5A | 12,54 | 81,15 |
| 5B | 1,30 | 6,56 |
| 6 | 4,14 | 15,77 |
| 6A | 8,53 | 45,99 |
| 6B | 1,13 | 5,71 |
| 7 | 1,55 | 8,55 |
| 8 | 3,20 | 11,4 |
| 8A | 9,33 | 66,94 |
| 8B | 0,94 | 5,44 |

Из приведенных в качестве примеров протестированных соединений, K_i для РЭ α дикого типа находится в диапазоне от около 0,300 нМ до около 65 нМ. K_i для мутанта РЭ α Y537S находится в диапазоне от около 2 до 300 нМ. Результаты этого анализа демонстрируют аффинность связывания и эффективность приведенных в качестве примеров соединений к белкам РЭ α дикого типа, мутантам (ESR1 Y537S) и белкам РЭ β .

Анализ разрушения РЭа в клетках MCF7

Целью следующего анализа разрушаемости РЭа является измерение разрушаемости РЭа тестируемым соединением в РЭа-позитивной клеточной линии рака груди, такой как MCF7.

- 5 Культивируют клетки MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 0,01 мг/мл человеческого инсулина 1 и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают в 384-луночные планшеты с плоским дном при плотности 4000 клеток на лунку в среде DMEM (20 мкл) без фенолового красного, содержащей 10% очищенную от угля FBS. Клетки инкубируют в течение ночи в
- 10 инкубаторе для культивирования клеток (5% CO₂, относительная влажность 95% и 37 °C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для
- 15 клеток, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, и для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют
- 20 планшеты с клетками при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 часов. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Промывают клетки один раз PBS (20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 часа. Промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2×), и блокируют 3% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 и 0,1%
- 25 TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку), в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичное антитело (20 мкл) (РЭа (Клон SP1) моноклональное антитело кролика №RM-9101-S, Thermo Scientific) в разведении 1% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 на лунку, закрывают планшеты и инкубируют в течение ночи при 4 °C. На
- 30 следующий день промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2×), и инкубируют с вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козий антикроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 минут при комнатной температуре. После промывания планшетов PBS (2 × 20 мкл) добавляют РНКазу (Sigma) (20 мкл, 50 мкг/мл) и раствор йодида пропидия в PBS 1:1000 на лунку (20 мкл). Закрывают чашки и инкубируют 1 час при комнатной температуре на столе (в
- 35 защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™

[лазерно-сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РЭ α . Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют РЭ-позитивные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % позитивных клеток РЭ. IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Результаты этого анализа демонстрируют сильную разрушаемость РЭ α , индуцированную соединениями Формулы I, Формулы II и Формулы III, описанными в данном документе, в клетках MCF7 рака груди. Относительные значения IC₅₀ для примеров 1, 1A и 1B показаны в Таблице 8.

Таблица 8: Анализ разрушения РЭ α в клетках MCF7

| Пример № | Относительная IC ₅₀ (мкМ) |
|----------|--------------------------------------|
| 1 | 0,003405 \pm 0,001086, n=3 |
| 1A | 0,3940 \pm 0,1941, n=4 |
| 1B | 0,003088 \pm 0,001523, n=19 |
| 2 | 0,05220 \pm 0,006508, n=2 |
| 2A | 0,05125 \pm 0,01626, n=2 |
| 2B | >2 |
| 3 | 0,03347 \pm 0,007830, n=3 |
| 3A | 0,3905 |
| 3B | 0,008664 |
| 4 | 0,02241 \pm 0,0003553, n=3 |
| 4A | 0,4998 |
| 4B | 0,006892 |
| 5 | 0,03653 \pm 0,03738, n=2 |
| 5A | 0,5221 |
| 5B | 0,009493 \pm 0,001103, n=2 |
| 6 | 0,05086 \pm 0,006889, n=3 |
| 6A | 0,1753 |
| 6B | 0,009132 |
| 7 | 0,07879 \pm 0,007379, n=2 |
| 8 | 0,01738 \pm 0,008752, n=2 |
| 8A | 0,2341 |
| 8B | 0,009617 \pm 0,005198, n=2 |
| 10 | 0,004216 \pm 0,001619, n=2 |

В частности, результаты в Таблице 7 показывают сильное разрушение РЭ α соединением Примера 1 в клетках MCF7 рака груди. Для приведенных в качестве примеров протестированных соединений, относительная IC₅₀ варьируется от 0,003 до >2 мкМ, что указывает на то, что все, кроме Примера 2B, проявляли активность при тестируемой концентрации. Результаты этого анализа демонстрируют, что соединение Формулы (I) представляет собой ССРЭ с сильной активностью разрушения РЭ α в клетках.

Цель следующего индукционного анализа РП α предназначена для определения, обладает ли тестируемое соединение агонистической активностью против рецептора РЭ α (ожидается, что агонист активирует рецептор).

Культивируют MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 0,01 мг/мл человеческого инсулина 1 и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают клетки (до слияния на 70%) в 384-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 4000 клеток на лунку в объеме 20 мкл в среде DMEM без фенолового красного, содержащей 10% FBS (очищенный от угля). Клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе для культивирования клеток (5% CO₂, относительная влажность 95% и 37 °C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки с добавлением тестируемого соединения (5 мкл) из планшета для серийного разведения в планшет с клетками, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с конечной концентрацией в диапазоне доз тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, а для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 часов. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Промывают клетки один раз PBS (20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 часа. Дважды промывают клетки PBS (20 мкл), содержащим 0,05% TWEEN® 20, и блокируют 3% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 и 0,1% TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку), в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичных антител (20 мкл) (моноклональные антитела РП мыши к человеку, клон PgR 636 Dako, M3569) в разведении 1% BSA/PBS с 0,05 TWEEN® 20 на лунку, закрывают планшеты и инкубируют в течение ночи при 4 °C.

На следующий день промывают клетки при помощи PBS 0,05% TWEEN® 20 (2 × 20 мкл) и инкубируют со вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козий анти-кроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 минут при комнатной температуре. После промывания PBS (2 × 20 мкл) добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и разводят йодидом пропидия 1:1000 в PBS на лунку. Герметизируют планшеты и инкубируют 1 час при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерный

сканирующий флуоресцентный цитометр для микропланшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РПа. Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют РП-позитивные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % позитивных клеток РП. IC₅₀ определяли путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Результаты этого анализа не демонстрируют значительной агонистической активности Примеров 1, 1A и 1B в отношении клеток MCF7 рака груди.

Для тестируемых соединений относительные IC₅₀ в этом анализе составляют > 2 мкМ. Результаты этого анализа демонстрируют отсутствие значительной агонистической активности приведенных в качестве примеров соединений, тестируемых в отношении клеток MCF7 рака груди. Эти результаты также демонстрируют, что приведенные в качестве примера тестируемые соединения являются антагонистами РЭα в клетках MCF7 рака груди (т.е. они обладают активностью ССРЭ).

Анализ ингибирования РПа (функциональный антагонизм РЭα) в клетках MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR

Цель следующего анализа ингибирования РПа (функциональный антагонизм РЭα) в клетках предназначен для определения антагонистической активности тестируемого соединения против мутантного рецептора РЭα Y537N. Ожидается, что антагонист в этом анализе блокирует функцию РЭα рецептора. РПа является нижестоящей транскрипционной мишенью РЭα, и, следовательно, ожидается, что антагонист РЭα будет ингибировать экспрессию РПа.

Культивируют MCF7-ESR1 Y537N-682 (сгенерированная редактированием гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон № 682) в среде DMEM с добавлением 10% FBS и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают клетки (до достижения 70 % конфлюэнтности) в 384-луночные планшеты с плоским дном при плотности 4000 клеток на лунку в среде DMEM, не содержащей фенолового красного, 10% FBS (объем 20 мкл) (очищенный уголь). Клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе для культивирования клеток (5% CO₂, относительная влажность 95% и 37 °C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для клеток, с

получением конечной концентрации DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, и для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37 °С и 5% CO₂ в течение 72 часов. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Промыть клетки PBS (1×20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20 в течение 1 часа. Промывают клетки PBS (2×20 мкл), 0,05% TWEEN® 20 и блокируют 3% BSA/PBS 0,05% TWEEN® 20, 0,1% TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку) в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичных антител (20 мкл) (моноклональные антитела РП мыши к человеку, клон PgR 636 Dako, M3569) в разведении 1% BSA/PBS с 0,05 TWEEN® 20 на лунку, герметизируют планшеты и инкубируют в течение ночи при 4 °С.

На следующий день промывают клетки PBS 0,05% ® (2×20 мкл) и инкубируют со вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козий антикроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 минут при комнатной температуре. После промывания PBS (2×20 мкл) добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и разводят йодидом пропидия 1:1000 в PBS на лунку. Герметизируют чашки и инкубируют 1 час при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерный сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РПа. Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют ПР-позитивные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % позитивных клеток РП. IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование РПа и функциональный антагонизм примеров 1, 1А и 1В в клетках MCF7 (ESR1 Y537N, гетерозиготный мутант) рака груди. Относительные значения IC₅₀ примеров 1, 1А и 1В (и других) в этом анализе показаны в Таблице 9 ниже. Относительные IC₅₀ тестируемых примеров соединений находятся в диапазоне от около 0,0118 до > 1,6 мкМ, что указывает на то, что приведенные в качестве примеров соединения являются сильными антагонистами мутанта РЭα (Y537N) и сильными ингибиторами транскрипции,

опосредованной РЭ α , за исключением примера 2В 1,6 мкМ). РП α (PGR) также является мишенью транскрипции РЭ α , и результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование опосредованной РЭ α транскрипции РП α .

**Таблица 9: Анализ ингибирования
РП α (функциональный антагонизм РЭ α) в
клетках MCF7 Y537N 682 CRISPR**

| Пример № | Относительная IC₅₀ (мкМ) |
|-----------------|--|
| 1 | 0,01679 \pm 0,00003, n=2 |
| 1A | 1,20 \pm 0,29, n=2 |
| 1B | 0,0130 \pm 0,0059, n=14 |
| 2 | 0,01451 \pm 0,002619, n=2 |
| 2A | 0,02494 \pm 0,007386, n=3 |
| 2B | 1,639 \pm 0,2228, n=3 |
| 3 | 0,07717 \pm 0,01154, n=2 |
| 3A | 0,6117 |
| 3B | 0,016 |
| 4 | 0,03854 \pm 0,003865, n=2 |
| 4A | 0,5052 |
| 4B | 0,01181 |
| 5 | 0,06614 \pm 0,01551, n=2 |
| 5A | 0,3945 |
| 5B | 0,01822 \pm 0,009815, n=2 |
| 6 | 0,06319 \pm 0,01609, n=2 |
| 6A | 0,2364 |
| 6B | 0,0136 |
| 7 | 0,1271 |
| 8 | 0,04124 \pm 0,006572, n=2 |
| 8A | 0,4335 \pm 0,1946, n=3 |
| 8B | 0,008926 \pm 0,003828, n=3 |
| 10 | 0,007936 \pm 0,003163, n=3 |

5

**Анализ ингибирования РП α (функциональный антагонизм РЭ α) в клетках
MCF7**

Цель следующего анализа ингибирования РП α (функциональный антагонизм РЭ α) в клетках предназначен для определения антагонистической активности тестируемого

соединения против рецептора РЭα. Ожидается, что антагонист в этом анализе блокирует функцию рецептора РЭα. РПα является нижестоящей транскрипционной мишенью РЭα, и, следовательно, ожидается, что антагонист РЭα будет ингибировать экспрессию РПα.

Выполняют условия анализа, как подробно описано в анализе Acumen основанном на клеточном разрушении РЭα выше, используя линию клеток MCF7, за исключением того, что перед распределением тестируемого соединения удаляют среду с планшета и предварительно обрабатывают все лунки, кроме лунок с отрицательным контролем (столбец 24 планшета), аналитической средой, содержащей 0,47 нМ эстрадиола, в течение 30 минут. В этом анализе проводят иммуноокрашивание для обнаружения РПα и сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерный сканирующий флуоресцентный цитометр для микропланшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РПα. Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют РПα-позитивные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % РПα-позитивных клеток. IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование РПα и функциональный антагонизм Примеров 1, 1А и 1В в клетках MCF7 рака груди. Относительные IC₅₀ Примеров 1, 1А и 1В в этом анализе показаны в Таблице 10 ниже. Относительные IC₅₀ приведенных в качестве примеров соединений находится в диапазоне от около 0,029 до >2 мкМ, что указывает на то, что все приведенные в качестве примеров соединения, за исключением 1А и 2В, являются сильными антагонистами белка дикого типа РЭα и сильными ингибитором транскрипции, опосредованной РЭα. РПα (PGR) также является мишенью транскрипции РЭα, и результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование опосредованной РЭα транскрипции РПα в тестируемой концентрации.

Таблица 10: Анализ ингибирования РПα (функциональный антагонизм РЭα) в клетках MCF7

| Пример № | Относительная IC ₅₀ (мкМ) |
|----------|--------------------------------------|
| 1 | 0,1283 ± 0,0226, n=3 |
| 1А | >2,000 |
| 1В | 0,04129 ± 0,03370, n=16 |
| 2 | 0,1634 |
| 2А | 0,1215 ± 0,05368, n=2 |

| | |
|----|-------------------------|
| 2B | >2,000 |
| 3 | 0,07666 ± 0,02101, n=3 |
| 3A | 0,9274 |
| 3B | 0,03435 |
| 4 | 0,07626 ± 0,1676, n=3 |
| 4A | 0,8465 |
| 4B | 0,02866 |
| 5 | 0,1180 ± 0,01230, n=2 |
| 5A | 0,6002 |
| 5B | 0,03203 ± 0,005306, n=2 |
| 6 | 0,08258 ± 0,005682, n=3 |
| 6A | 0,2528 |
| 6B | 0,02835 |
| 7 | 0,1134 ± 0,02087, n=2 |
| 8 | 0,06835 ± 0,02273, n=2 |
| 8A | 0,2058 |
| 8B | 0,04848 ± 0,02944, n=2 |
| 10 | 0,02633 ± 0,004459, n=3 |

Анализ пролиферации клеток в MCF7 и MCF7-ESR1 Y537N-682

Целью следующих анализов пролиферации клеток обычно является определение того, оказывает ли тестируемое соединение влияние на пролиферацию клеток.

- 5 Высевают клетки MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) с плотностью 2000 клеток на лунку в среде DMEM, свободной от фенолового красного, 10% FBS (объем 20 мкл) (очищенный от угля) в 384-луночный планшет для культивирования клеток с прозрачным дном. Помещают MCF7-ESRY537N -682 (сгенерированные посредством редактирования гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон №682) в среду DMEM
- 10 с добавлением 10% FBS и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина при плотности 1000 клеток на лунку. Инкубируют планшеты при 37 °C и 5% CO₂. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в
- 15 планшет для клеток с получением конечной концентрации DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 20 до 0,001 мкМ. Для максимальной

точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, и для минимальной точки используют фулвестрант, разбавленный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37 °С и 5% CO₂. Через семь дней после добавления

5 тестируемого соединения вынимают планшеты из инкубатора и добавляют 96% холодного EtOH (65 мкл) в каждую лунку. Через 30 минут удаляют среду и добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и раствор йодида пропидия 1:1000 в PBS на лунку. Герметизируют планшеты и инкубируют 1 час при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™

10 [лазерный сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD]. Клеточная линия MCF-7 растет, образуя агрегаты, количество клеток как количество объектов не может быть использовано для считывания; таким образом, количество клеток может быть оценено при помощи предполагаемого количества клеток (рассчитывается при помощи параметра площади (отношение общей площади к общей

15 популяции клеток (заданный диапазон пиковой интенсивности FL-1 (ПИ) и средней площади популяции отдельных клеток (определяется по периметру)). IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Относительные IC₅₀ Примеров 1, 1A и 1B (и других) в клетках MCF7 ESR1 дикого типа и мутантных клетках MCF7-ESR1 Y537N

20 показаны в Таблице 10 ниже. Результаты этого анализа демонстрируют сильную антипролиферативную активность и ингибирование роста клеток при помощи примеров 1, 1A и 1B (и других) в клетках MCF7 (ESR1 дикого типа) и MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака груди. Относительные IC₅₀ приведенных в качестве примеров соединений находятся в диапазоне от около 0,0035 до 1,176 мкМ в MCF7 ESR1 дикого типа и от 0,014 до 1,86

25 мкМ в клетках MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака груди, что указывает на то, что все приведенные в качестве примера соединения демонстрируют сильную антипролиферативную активность и ингибирование роста клеток MCF7 (ESR1 дикого типа) и MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака груди.

Таблица 11: Анализ пролиферации клеток в MCF7 и MCF7-ESR1Y537N-682

| Пример № | Относительная IC ₅₀ (мкМ) MCF7 ESR1 дикого типа | Относительная IC ₅₀ (мкМ) мутантных клеток MCF7 ESR1 Y537N |
|----------|---|--|
| 1 | 0,00768 ± 0,01263, n=3 | 0,0321 ± 0,0068, n=2 |
| 1A | 1,18 ± 0,68, n=4 | 1,86 ± 1,03, n=4 |
| 1B | 0,00349 ± 0,00225, n=11 | 0,0167 ± 0,0091, n=12 |
| 2 | 0,00425 | 0,05113 |
| 2A | 0,00612 | 0,04284 ± 0,002666, n=2 |
| 2B | 0,4053 | 0,7777 |
| 3 | 0,3287 | 0,02394 |
| 3A | 0,303 | 0,6169 ± 0,1735, n=3 |
| 3B | 0,008785 | 0,02144 ± 0,008938, n=3 |
| 4 | 0,02861 | 0,02664 |
| 4A | 0,2862 | 0,5442 ± 0,2181, n=3 |
| 4B | 0,003496 | 0,01433 ± 0,004925, n=3 |
| 5 | 0,08009 | 0,07252 ± 0,02632, n=2 |
| 5A | 0,4095 | 0,5167 ± 0,09497, n=3 |
| 5B | 0,007666 | 0,02131 ± 0,01300, n=3 |
| 6 | 0,05128 | 0,02362 |
| 6A | 0,0759 | 0,3234 ± 0,1758, n=3 |
| 6B | | 0,01539 |
| 7 | 0,01902 | 0,04479 ± 0,01188, n=2 |
| 8 | 0,04157 | 0,03290 ± 0,003002, n=2 |
| 8A | 0,1743 | 0,6621 ± 0,1173, n=2 |
| 8B | 0,005083 | 0,01419 ± 0,01108, n=2 |
| 10 | 0,004379 | 0,01059 |

**Анализ целевого ингибирования *In Vivo* (ЦИВ) (анализ PGR RT-qPCR) в
опухолях MCF7**

- 5 Целью этого анализа ЦИВ является измерение способности тестируемого соединения (ССРЭ) ингибировать экспрессию (транскрипцию) гена РПа ниже РЭа в ксенотрансплантированных опухолях, имплантированных мышам.

Имплантируют самкам мышей NOD SCID (22-25 г) от Envigo RMS, Inc., Мэдисон, Висконсин подкожно 5×10^6 РЭ-позитивные клетки MCF7 рака груди (ATCC, № HTB-22) в область правого фланга в 1:1 раствор HBSS+MATRIGEL™ (200 мкл). Имплантируют гранулы 17-β эстрадиола (0,18 мг/гранула, высвобождение 90 дней, от Innovative Research) подкожно за 1 день до имплантации опухолевых клеток. Измеряют рост опухоли и массу тела дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации. Когда размер опухоли достигнет 250-350 мм³, рандомизируют животных и группируют их в группы по пять животных. Вводят животным несколько доз тестируемого соединения в специфическом для тестируемого соединения носителе (1% гидроксипропилцеллюлоза/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногаситель в очищенной воде) или только носителем перорально в течение 3 дней и собирают опухоли и кровь через желаемые интервалы времени после последней дозы. Умерщвляют животных используя анестезию изофлураном и вывих шейных позвонков. Быстро замораживают опухоли и хранят при -80 °С до обработки для выделения РНК и анализа РВ-кПЦР. Собирают кровь в пробирки с EDTA, замедляют вращение для сбора плазмы и замораживают при -80 °С в 96-луночном планшете. Определяют воздействие тестируемого соединения при помощи масс-спектрометрии.

Измельчают опухоли в жидком азоте и лизируют в буфере для лизиса $1 \times$ РНК (из наборов для выделения РНК) с использованием шариков Matrix D (MP Biomedical, № 6913-500) в машине FASTPREP-24™ Cell Disrupter (MP Biomedical). Переносят лизаты опухолей в свежие пробирки после вращения при 14000 об/мин в течение 20 минут при 4 °С. Выделяют РНК из опухолевых лизатов при помощи набора PURELINK® RNA Mini (Invitrogen № 12183018A) или RNeasy Mini Kit (Qiagen № 74104 и № 74106). Удаляют загрязнения ДНК при помощи набора PURELINK® DNase (Invitrogen № 12185010) или набора RNase-Free DNase (Qiagen № 79254). Измеряют концентрацию выделенной РНК, разбавив образцы водой, свободной от РНКазы, и измеряют поглощение при 260 нм на считывателе для планшетов (SpectraMax190). Вычитают среднее измерение поглощения при 260 нм пустого опыта (только вода, не содержащая РНКазу) из измерений при 260 нм всех других образцов РНК. Разводят образцы РНК до равных концентраций в воде, свободной от РНКазы. Синтезируют кДНК из разбавленной РНК, используя систему синтеза первой цепи для РВ-ПЦР (Invitrogen, № 18080-051). Для проведения РВ-кПЦР, сначала разбавляют кДНК в воде, свободной от РНКазы. Объединяют $2 \times$ Absolute Blue qPCR ROX Mix (Thermo, № AB-4139/A), праймер PGR (Thermo, Hs01556702_m1) и разведенную кДНК для каждой реакции в планшете для PCR (Applied Biosystems, № 4309849). Амплифицируют кДНК, инкубируя образцы в течение 2 минут при 50 °С, а

затем 15 минут при 95 °С в термоциклере (севентатор ABI Prism 7900HT). Продолжают инкубировать при 95 °С в течение 15 секунд, а затем при 50 °С в течение 60 секунд, всего 40 циклов. Циклы нормализованы по домашнему гену и используются для расчета % ингибирования PGR по сравнению с одним носителем. Анализируют каждый образец в
5 двух экземплярах и используют средние числа для расчетов. Рассчитывают целевой процент ингибирования (PGR) при помощи Excel и XL Fit.

Результаты этого анализа демонстрируют, что Пример 1В ингибирует экспрессию РПа (PGR) в модели ксенотрансплантированной опухоли. Пример 1В ингибирует экспрессию РПа (PGR) на ~78% в модели ксенотрансплантированной опухоли в течение
10 24 часов с дозой 30 мг/кг при пероральном введении. Эти результаты демонстрируют значительное и устойчивое ингибирование антагонистической активности РЭа и опосредованной РЭа транскрипционной активности *in vivo* на модели ксенотрансплантированной опухоли.

15 **Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* на РЭ-позитивных (ESR1 дикого типа) моделях ксенотрансплантированной опухоли рака груди, имплантированной мышам**

Целью следующего анализа ингибирования ксенотрансплантированной опухоли является измерение уменьшения объема опухоли в ответ на введение тестируемого
20 соединения.

Размножают клетки MCF7 рака груди человека (ATCC № HTB-22) и HCC1428 (ATCC № CRL-2327) в культуре, собирают и вводят 5×10^6 клеток в растворе HBSS+MATRIGEL™ 1:1 (200 мкл) подкожно на задний правый бок самок мышей NOD SCID (22-25 г, Envigo RMS, Inc). За двадцать четыре часа до имплантации клеток
25 имплантируют гранулы эстрогена (0,18 мг/гранулу, 17β эстрадиол, высвобождение 90 дней, Innovative Research) подкожно. Размножают клетки T47D рака груди человека (ATCC № HTB-22) в культуре, собирают и вводят 5×10^6 клеток в растворе HBSS+MATRIGEL™ 1:1 (200 мкл) подкожно на задний правый бок самок мышей NOD SCID (22-25 г, Envigo RMS, Inc). За 24 часа до имплантации клеток имплантируют
30 гранулы эстрогена (0,38 мг/гранулу, 17β эстрадиол, высвобождение 90 дней, Innovative Research) подкожно. Размножают клетки ZR-75-1 рака груди человека (ATCC № CRL-1500) в культуре, собирают и вводят 5×10^6 клеток в растворе HBSS+MATRIGEL™ 1:1 (200 мкл) подкожно на задний правый бок самок мышей NOD SCID (22-25 г, Envigo RMS, Inc). За двадцать четыре часа до имплантации клеток животным вводят внутримышечно
35 (10 мг/мл) 50 мкл эстрадиола валерата (Delestrogen®), и затем один раз каждые 14 дней в

течение всего исследования. Измеряют рост опухоли и массу тела дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации. Когда размеры опухоли достигают 250-350 мм³, животных рандомизируют и группируют в группы по 5 животных. Готовят тестируемое соединение, пример 1В в подходящем носителе (1%

- 5 гидроксипропилцеллюлоза/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногаситель в очищенной воде) и вводят через желудочный зонд в течение 28 дней, QD. Определяют ответ опухоли путем измерения объема опухоли два раза в неделю в течение курса лечения. При измерении объема опухоли в качестве общей меры токсичности принимают массу тела.

- 10 Было обнаружено, что соединение Примера 1В имеет значения дельта T/C%, как показано в Таблице 12 ниже. Эти результаты показывают, что соединение Примера 1В демонстрирует хорошую пероральную биодоступность у мышей и значительную противоопухолевую активность или регрессию опухоли на PЭ-позитивных (ESR1 дикого типа) ксенотрансплантированных моделях рака груди человека.

Таблица 12: Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* на ксенотрансплантированных моделях РЭ-позитивного рака груди, имплантированного мышам

| Модель опухоли | Доза (мг/кг) | Дельта Т/С% или % регрессии | р-значение |
|--|--------------|-----------------------------------|------------|
| MCF7 (Ксенотрансплантат рака груди) | 3 | -26 | 0,001* |
| | 10 | -46 | <0,001* |
| | 30 | -36 | <0,001* |
| T47D (Ксенотрансплантат рака груди) | 3 | 30 | 0,008* |
| | 10 | -11 | <0,001* |
| | 30 | -28 | <0,001* |
| ZR-75-1 (Ксенотрансплантат рака груди) | 3 | 4 | <0,001* |
| | 10 | 0 | <0,001* |
| | 30 | 19 | <0,001* |
| HCC1428 (Ксенотрансплантат рака груди) | 10 | -45 | <0,001* |
| | 30 | -22 | <0,001* |

Анализ объема опухоли основан на ковариационной структуре Log 10 и

5 SpatialPower.

*: значительно ($p < 0,05$) по сравнению с растворителем контролем .

Дельта Т/С% рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли. Формула $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. T_0 и C_0 - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

% регрессии рассчитывают, когда конечный объем ниже исходного. Формула $100 * (T - T_0) / T_0$, в которой T_0 - средний исходный объем опухоли для обработанной группы.

15 Общее среднее значение всех групп от исходного уровня (рандомизация) на 32 день используется для вычисления % изменения Т/С.

Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* на модели опухоли (ST941/Н1) в мутантной ESR1 (Y537S) рака груди PDX, имплантированной мышам

Целью следующего анализа ингибирования ксенотрансплантированной опухоли является измерение уменьшения объема опухоли в ответ на введение тестируемого соединения в мутантный ESR1 и независимую от гормонов (HI) ксенотрансплантированную (PDX) модель рака груди, полученную от пациента.

5 Модель ST941/HI PDX была разработана и выпущена South Texas Accelerated Research Therapeutics (Сан-Антонио, Техас). Фрагменты опухоли собирали у животных-хозяев и имплантировали мышам с иммунодефицитом (лаборатория Джексона), и исследование начинали при среднем объеме опухоли около 125-250 мм³. Получают тестируемое соединение, Пример 1B в подходящем носителе (1% гидроксипропилбета-Д-глюкопиранозид/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногасителя в очищенной воде) и вводят через желудочный зонд в течение 28 дней. Определяют ответ опухоли путем измерения объема опухоли два раза в неделю в течение курса лечения. При измерении объема опухоли в качестве общей меры токсичности принимают массу тела.

15 Было обнаружено, что соединение Примера 1B имеет значения дельта T/C%, как показано в Таблице 13 ниже. Эти результаты показывают, что соединение Примера 1B демонстрирует хорошую пероральную биодоступность у мышей и значительную противоопухолевую активность или регрессию опухоли в модели PDX рака груди человека с мутантным ESR1 (Y537S).

20 **Таблица 13: Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* на модели опухоли PDX мутантного ESR1 рака груди, имплантированной мышам**

| Модель опухоли | Доза (мг/кг) | График | Дельта T/C% или % регрессии | p-значение |
|---|--------------|--------|-----------------------------|------------|
| ST941C/HI (модель PDX мутантного ESR1 рака груди) | 3 | QD | 66 | 0,213 |
| | 10 | QD | 15 | <0,001* |
| | 30 | QD | 6 | <0,001* |

Анализ объема опухоли основан на ковариационной структуре Log 10 и SpatialPower.

*: значительно ($p < 0,05$) по сравнению с растворителем контролем.

25 Дельта T/C% рассчитывали, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой T и C являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или

контрольной группе соответственно. T_0 и C_0 - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

5 % регрессии рассчитывается, когда конечный объем ниже исходного. Формула $100*(T_0)/T_0$, в которой T_0 - средний исходный объем опухоли для обработанной группы.

Общее среднее значение всех групп от исходного уровня (рандомизация) на 32 день используется для вычисления % изменения T/C.

10

Комбинированные исследования

Из-за неоднородности опухоли и приобретенной устойчивости к эндокринной терапии, комбинированная терапия стала незаменимой при лечении РЭ-позитивного и распространенного/метастатического рака груди для эффективной терапии или преодоления приобретенной устойчивости. Мы протестировали комбинированный эффект

15 Примера 1В с ингибитором CDK4/6 - абемациклибом, ингибитором mTOR - эверолимусом, ингибитором PI3K - алпелисибом и ингибитором PI3K/mTOR - 8-[5-(1-гидрокси-1-метилэтил)пиридин-3-ил]-1-[(2S)-2-метоксипропил]-3-метил-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]хинолин-2-оном («Соединение А») в пяти РЭ-позитивных линиях клеток рака груди *in vitro*.

20

Анализ жизнеспособности клеток для комбинированных исследований

Высевают клетки с плотностью, указанной в Таблице 14 ниже, в объеме среды 20 мкл, описанной в таблице, в 384-луночный планшет с прозрачным дном для культивирования клеток.

25

Таблица 14: Информация о клеточной линии для анализа жизнеспособности клеток

| Клеточная линия | Плотность высевания | Коммерческая ссылка | Среда | Время фиксации (часы) |
|-----------------|---------------------|---------------------|---|-----------------------|
| T-47D | 1000 | ATCC HTB-133 | RMPI 10% FBS 1% П/С, 0,008 мг/мл бычьего инсулина | 72 |
| MCF-7 | 1000 | ATCC HTB-22 | DMEM 10% FBS 1% П/С 0,01 мг/мл человеческого инсулина | 96 |
| EFM-19 | 3000 | ACC 231 | RMPI 10% FBS 1% П/С | 144 |
| ZR-75-1 | 1000 | ATCC CRL-1500 | RMPI 10% FBS 1% П/С | 144 |
| BT-474 | 1000 | ATCC HTB-20 | HYBRI-CARE (1 л H ₂ O, 1,5 г/л бикарбоната натрия, 10% FBS, 1% П/С) | 144 |
| ZR-75-30 | 1000 | ATCC CRL-1504 | RMPI 10% FBS 1% П/С | 240 |

Инкубируют планшеты при 37 °С и 5% CO₂. На следующий день вводят в клетки
5 тестируемое соединение, Пример 1В.

Получают соединения в виде 10 мМ исходных растворов DMSO и используют для
исследования ответа на дозу с максимальной концентрацией, начиная с 10 или 1 мкМ, два
соединения, тестируемых вместе при фиксированном соотношении, и затем полученные
серийные разведения 1:3, а также соединения по отдельности для определение IC₅₀ с
10 начальной концентрацией 20 мкМ. Дозируют клетки путем добавления 5 мкл из планшета
для серийного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию DMSO
0,2% с диапазоном конечной дозы тестируемого соединения от 20 до 0,001 мкМ для
однократной обработки или меньшего диапазона для комбинаций. Для максимальной
точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, и для минимальной точки используют
15 стауроспорин, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания,
содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют
планшеты с клетками при 37 °С и 5% CO₂. После двукратной инкубации с соединениями
вынимают планшеты из инкубатора и добавляют 96% холодный EtOH (65 мкл) в каждую

- лунку. Через 30 минут удаляют среду и добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и раствор йодида пропидия 1:1000 в PBS на лунку. Герметизируют планшеты и инкубируют 1 час при комнатной температуре (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерный сканирующий флуоресцентный цитометр
- 5 для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD]. Поскольку некоторые клеточные линии растут, образуя агрегаты, число клеток как число объектов может не использоваться для считывания; поэтому для оценки количества клеток используется общая популяция площади (обозначенный диапазон пиковой интенсивности FL-1 (ПИ)) или общая интенсивность ПИ.
- 10 Данные комбинации *in vitro* предполагают синергизм (как определено ниже) с комбинацией Примера 1В с абемациклибом или эверолимусом в 5 из 5 РЭ-положительных клеточных линий рака груди, как показано в Таблице 15. Комбинация Примера 1В с Соединением А синергична в 4 из 4 испытанных линий РЭ-положительных клеток рака груди. Комбинированный эффект Примера 1В с алпелисибом является аддитивным в 2 из 4 РЭ-
- 15 положительных клеточных линиях рака груди и синергичным в 2 из 4 РЭ-положительных клеточных линиях рака груди.

Таблица 15: Комбинация *in vitro* Примера 1В с другими целевыми агентами в РЭ-позитивных клеточных линиях рака груди

| Клеточная линия рака груди | Обработка 1 | Обработка 2 | Индекс комбинирования (CI50) | Статистическая интерпретация | Биологическая интерпретация |
|----------------------------|-------------|--------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| MCF7 | Пример 1В | Абемациклиб | 0,2675 | Синергический | Аддитивный |
| | | Эверолимус | 0,0389 | Синергический | Синергический |
| T47D | Пример 1В | Абемациклиб | 0,2693 | Синергический | Синергический |
| | | Эверолимус | 0,0609 | Синергический | Синергический |
| | | Алпелисиб | 0,0818 | Синергический | Синергический |
| | | Соединение А | 0,2401 | Синергический | Синергический |
| ZR-75-1 | Пример 1В | Абемациклиб | 0,2067 | Синергический | Синергический |
| | | Эверолимус | 0,1853 | Синергический | Синергический |
| | | Алпелисиб | 1,3717 | Аддитивный | Аддитивный |
| | | Соединение А | 0,3768 | Синергический | Синергический |
| ZR-75-30 | Пример 1В | Абемациклиб | 0,3960 | Синергический | Синергический |
| | | Эверолимус | 0,1248 | Синергический | Синергический |
| | | Алпелисиб | 0,4149 | Аддитивный | Аддитивный |
| | | Соединение А | 0,7098 | Синергический | Синергический |
| EFM-19 | Пример 1В | Абемациклиб | 0,3455 | Синергический | Синергический |
| | | Эверолимус | 0,5033 | Синергический | Аддитивный |
| | | Алпелисиб | 0,2963 | Синергический | Синергический |
| | | Соединение А | 0,4326 | Синергический | Синергический |

Анализ данных и интерпретация комбинированного эффекта

- 5 Используют методы, опубликованные в литературе, для расчета комбинированного эффекта *in vitro* (L. Zhao, et al, Front Biosci, 2010, 2:241-249 и L. Zhao, et al, Clin Cancer Res, 2004, 10(23):7994-8004). Для выявления синергетических или антагонистических взаимодействий между двумя лекарствами был проведен анализ сдвига кривой с использованием настроенного шаблона XL с надстройками XLFit 5. Кривые одного агента
- 10 корректируются с использованием 4 параметров логистической регрессии. Критерии и ограничения, используемые для подгонки: (i) нижняя часть <(-20) фиксируется на 0 и (ii)

верхняя часть >120 фиксируется на 100. Если все наблюдения ниже порога, установленного пользователем, то выполняется постоянная аппроксимация с холмом $= 0$, и IC_{50} считается выше, чем максимальная включенная концентрация. После получения абсолютного значения IC_{50} для каждого отдельного агента рассчитывают эквивалентную концентрацию при 50% активности для отдельных агентов и комбинации. Используя эти эквивалентные концентрации вместе с измеренными активностями, мы пересчитываем абсолютную IC_{50} , кривая для отдельных агентов достигнет активности 50% при значениях эквивалентных концентраций, равных 1, в то время как синергетические комбинации достигнут 50% при более низких значениях, что приведет к отклонению сдвига влево, и антагонистическая комбинация покажет сдвиг вправо. Эквивалентные концентрации также используются для расчета CI_{50} (индекс комбинирования при 50% активности), где CI_{50} равен абсолютному IC_{50} кривой комбинации. Вместе с CI_{50} могут быть рассчитаны другие CI (индексы комбинирования) при различных процентах активности (CI_{10} , CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{60} , CI_{70} , CI_{80} , CI_{90}). Для расчета CI_{Inn} рассчитываются эквивалентные концентрации при различных процентах активности. Для каждого процента активности мы вычисляем предел погрешности, который представляет собой доверительный интервал при 95%, и, используя этот доверительный интервал, мы рассчитываем верхний предел как добавление допустимой погрешности к CI и нижний предел как вычитание допустимой погрешности к CI . Верхний предел = $CI + \text{доверительный интервал } 95\%$ и Нижний предел = $CI - \text{доверительный интервал } 95\%$. Эти пределы затем используются для интерпретации результатов.

Статистическая интерпретация для каждого процента активности выглядит следующим образом:

| | |
|--|---------------|
| Нижний предел <1 и верхний предел >1 | Аддитивный |
| Верхний предел <1 | Синергический |
| Нижний предел >1 | Антагонист |

Биологическая интерпретация для каждого процента активности выглядит следующим образом:

| | |
|---------------------------------|---------------|
| $C_{Inn} < 0,5$ | Синергический |
| $C_{Inn} > 0,5$ и $C_{Inn} < 2$ | Аддитивный |
| $C_{Inn} > 2$ | Антагонист |

Комбинированные исследования *in vivo*

5 Из-за неоднородности опухоли и приобретенной устойчивости к эндокринной терапии, комбинированная терапия стала незаменимой при лечении РЭ-позитивного и распространенного/метастатического рака груди для эффективной терапии или преодоления приобретенной устойчивости. Предполагается, что комбинация целевой

10 позитивного рака груди. Комбинация ингибиторов CDK4/6 и фулвестранта была одобрена для лечения РЭ-позитивного метастатического рака груди, но у большого процента пациентов развивается резистентность из-за приобретенных мутаций в ESR1 или PIK3CA. В качестве сильного супрессора и антагониста РЭα пероральный ССРЭ, такой как пример 1В, может быть более эффективным в замедлении или остановке мутантного ESR1 или

15 мутантного PIK3CA рака груди в качестве единственного агента или в комбинации с ингибитором CDK4/6, таким как абемациклиб или ингибитором PI3K/mTOR, таким как соединение А. В этом контексте соединение Примера 1В тестируется на ингибирование роста опухоли в комбинации с абемациклибом (патентная ссылка) или соединением А (патентная ссылка). Более конкретно, соединение Примера 1В тестируют в комбинации с

20 абемациклибом или соединением А на ксенотрансплантированной модели рака груди дикого типа ESR1 и мутантного PIK3Ca MCF7.

Размножают клетки рака груди человека MCF7 (ATCC № HTB-22) в культуре, собирают и вводят 5×10^6 клеток в растворе HBSS+MATRIGEL™ 1:1 (200 мкл) подкожно на задний правый бок самок мышей NOD SCID (22-25 г, Envigo RMS, Inc). За двадцать

25 четыре часа до имплантации клеток, подкожно имплантируют гранулы эстрогена (0,18 мг/гранулу, 17β эстрадиол, высвобождение 90 дней, Innovative Research). Измеряют рост опухоли и массу тела дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации. Когда размеры опухоли достигают 250-350 мм³, животных рандомизируют и группируют в группы по 5 животных. Получают тестируемое соединение, Пример 1В в подходящем

30 носителе (1% гидроксипропилцеллюлоза/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногасителя в очищенной воде) и вводят через желудочный зонд в течение 42 дней. Ингибитор CDK4/6 (абемациклиб) получают из 1% НЕС в 25 мМ натрий-фосфатном буфере, pH

2,0. Ингибитор PI3K/mTOR (Соединение А) получают из 1%

гидроксиэтилцеллюлозы/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногасителя в очищенной воде.

Определяют ответ опухоли путем измерения объема опухоли два раза в неделю в течение курса лечения. При измерении объема опухоли в качестве общей меры токсичности

- 5 принимают массу тела. Объем опухоли оценивают по формуле $v = l \times w^2 \times 0,535$, где l - больше измеренного диаметра, а w - меньше перпендикулярного диаметра.

Статистический анализ

Статистический анализ данных объема опухоли начинается с преобразования

- 10 данных в логарифмическую шкалу для выравнивания дисперсии по времени и группам лечения. Данные об объеме опухоли анализируют при помощи двухстороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями по времени и лечению с использованием методик MIXED в программном обеспечении SAS (Версия 9.3). Модель корреляции для повторных измерений представляет собой Spatial Power. Обработанные
- 15 группы сравнивают с контрольной группой в каждый момент времени. Методика MIXED также используется отдельно для каждой группы лечения для расчета скорректированных средних и стандартных ошибок в каждый момент времени. Оба анализа учитывают автокорреляцию внутри каждого животного и потерю данных, которая происходит, когда животные с большими опухолями удаляются из исследования на раннем этапе.
- 20 Скорректированные средние и стандартные ошибки (с.о.) нанесены на график для каждой экспериментальной группы в зависимости от времени. Анализ объема опухоли основан на \log_{10} и пространственной ковариационной структуре мощности. Значение P основано на сравнении двух конкретных групп.

- 25 Способ комбинированного анализа (независимый анализ по Блисссу для исследований IVEF)

Во-первых, обычная модель повторных измерений подходит для регистрации объема в зависимости от группы и времени. Затем показатели контраста используют для проверки эффекта взаимодействия в каждый момент времени с использованием двух

- 30 комбинированных способов лечения. Это эквивалентно способу независимого анализа Блисса и предполагает, что объем опухоли теоретически может достигнуть нуля, то есть полной регрессии. Ожидаемый аддитивный ответ (EAR) для комбинации рассчитывают по шкале объема опухоли как: ответ (EAR) объем $EAR = V1 * V2/V0$, где $V0$, $V1$ и $V2$ - расчетные средние объемы опухоли для контроля носителя, только обработка 1 и только
- 35 обработка 2 соответственно. Если тест взаимодействия является значимым,

комбинированный эффект объявляется статистически большим, чем аддитивный, или меньшим, чем аддитивный, в зависимости от наблюдаемого среднего объема комбинации, который меньше или больше, чем объем EAR, соответственно. В противном случае статистический вывод является аддитивным. Кроме того, биологически значимый

5 диапазон аддитивности может быть определен как % X выше и ниже объема EAR.

Обычно X составляет от 25 до 40%. Затем биологический вывод может быть сделан для комбинации как больше, чем аддитивный, аддитивный или меньше, чем аддитивный, если наблюдаемый средний объем комбинации ниже, в или выше интервала аддитивности.

10 Могут быть ситуации, когда стазис - лучший ожидаемый ответ. В таких ситуациях способ Блисса может быть применен непосредственно к значениям % дельта T/C для получения процентного отклика EAR: % EAR дельта T/C = $Y1 * Y2/100$, где Y1 и Y2 - процент значения дельта T/C для лечения одним агентом. В настоящее время не существует статистического теста для сравнения наблюдаемого % дельта T/C в комбинированной группе с EAR, но можно применить биологический критерий,

15 описанный выше.

Как показано в Таблицах 15 и 16, лечение препаратом Примера 1В или абемациклибом в качестве единственного агента приводило к 32% (%dT/C = -32) и 52% (%dT/C = -52) регрессии опухоли соответственно, и оба они статистически значимы ($p < 0,001$) по сравнению с растворителем контролем. Эффективность комбинации Примера

20 1В с абемациклибом была «меньше, чем аддитивная», но эффективность комбинации Примера 1В плюс абемациклиб была значительно выше, чем эффективность комбинации Примера 1В отдельно ($p < 0,001$). Однако эффективность абемациклиба в качестве единственного агента не была статистически значимой в сравнении с комбинацией ($P = 0,055$). Комбинация переносится животными без значительной потери массы тела.

25

Таблица 15: Эффективность комбинации Примера 1В с абемациклибом в MCF7 РЭ-позитивной модели рака груди

| Лечение 1 | Лечение 2 | Разница ^b | СО | р-значение |
|--|--|----------------------|--------|------------|
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 1Б, 10 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,628 | 0,0658 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,479 | 0,0658 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО /Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,756 | 0,0658 | <0,001* |
| Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО /Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,128 | 0,0658 | 0,055 |
| Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО /Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО РО | 0,278 | 0,0658 | <0,001* |

Разница^b = лечение 1 - лечение 2; * р-значение: значительно (р < 0,05)

СО - Стандартная ошибка

5

Таблица 16: Эффективность комбинации Примера 1В с абемациклибом в MCF7 РЭ-позитивной модели рака груди

| Лечение | % дельта Т/С или % | р-значение | Комбинированный эффект | Масса тела |
|---------|-----------------------|------------|---------------------------|------------|
|---------|-----------------------|------------|---------------------------|------------|

| | | | | |
|--|-----------|---------|---------------------------|----------------------------------|
| | регрессии | | | |
| Растворитель | н.с. | н.с. | | |
| Пример 1В | -32 | <0,001* | | |
| Абемациклиб | -52 | <0,001* | | |
| Пример 1В / Абемациклиб / (Комбинация) | -64 | <0,001* | Меньше, чем аддитивный | Без значительных изменений |

Анализ объема опухоли основан на Log_{10} и Spatial Power ковариационной структуры.

* р-значение: значительно ($p < 0,05$); н.с.: не соответствует

5 % дельта Т/С рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли; и % регрессии рассчитывают для объема опухоли ниже исходного значения. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. T_0 и C_0 - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

Как показано в Таблицах 17 и 18, лечение Примером 1В или только Соединением А приводило к 32% ($\%dT/C = -32$) и 36% ($\%dT/C = -36$) регрессии опухоли соответственно, и оба являются статистически значимыми ($p < 0,001$) по сравнению с растворителем контролем. Эффективность комбинации Примера 1В с соединением А была «меньше, чем аддитивной», но эффективность комбинации Примера 1В плюс 15 соединение А была значительно лучше, чем эффективность только соединения Примера 1В ($p < 0,001$) или только Соединения А ($p = 0,002^*$). Комбинация переносится животными без значительной потери массы тела.

20

Таблица 17: Эффективность комбинации Примера 1В с Соединением А в MCF7 модели РЭ-позитивного рака груди

| Лечение 1 | Лечение 2 | Разница ^b | СО | p-значение |
|---|--|----------------------|--------|------------|
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,479 | 0,0759 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Соединение А, 7,5 мг/кг, BID x 42, ПО | 0,504 | 0,0759 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО/Соединение А, 7,5 мг/кг, BID x 42, ПО | 0,761 | 0,0791 | <0,001* |
| Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО/Соединение А, 7,5 мг/кг, BID x 42, ПО | 0,282 | 0,0791 | <0,001* |
| Соединение А, 7,5 мг/кг, BID x 42, ПО | Пример 1В, 10 мг/кг, QD x 42, ПО/Соединение А, 7,5 мг/кг, BID x 42, ПО РО | 0,257 | 0,0791 | 0,002 * |

Разница^b = лечение 1 - лечение 2; *p-значение: значительно (p < 0,05)

СО - Стандартная ошибка

Таблица 18: Эффективность комбинации Примера 1В с абемациклибом в MCF7 РЭ-позитивной модели рака груди

| Лечение | % дельта Т/С или % регрессии | р-значение | Комбинированный эффект | Масса тела |
|--|------------------------------|------------|------------------------|----------------------------|
| Растворитель | н.с. | н.с. | | |
| Пример 1В | -32 | <0,001* | | |
| Соединение А | -36 | <0,001* | | |
| Пример 1В /Соединение А / (Комбинация) | -65 | <0,001* | Меньше, чем аддитивный | Без значительных изменений |

Анализ объема опухоли основан на Log₁₀ и Spatial Power ковариационной структуры.

5 * р-значение: значительно (р < 0,05); н.с.: не соответствует

% дельта Т/С рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли; и % регрессии рассчитывают для объема опухоли ниже исходного значения. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. Т₀ и С₀ - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

Как показано в Таблицах 19 и 20, лечение препаратом Примера 10 или абемациклибом в качестве единственного агента приводило к 51% (%dT/C = -51) и 70% (15 %dT/C = -70) регрессии опухоли соответственно, и оба они статистически значимы (р < 0,001) по сравнению с растворителем контролем. Эффективность комбинации Примера 10 с абемациклибом была «меньше, чем аддитивная», но эффективность комбинации 10 плюс абемациклиб была значительно выше, чем эффективность комбинации 10 отдельно (р = 0,039). Однако эффективность комбинации Примера 10 плюс 20 абемациклиб существенно не отличалась от эффективности только абемациклиба (р = 0,905). Комбинация переносится животными без значительной потери массы тела.

Таблица 19: Эффективность комбинации Примера 10 с абемациклибом в MCF7 РЭ-позитивной модели рака груди

| Лечение 1 | Лечение 2 | Разница ^b | СО | р-значение |
|--|--|----------------------|--------|------------|
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,659 | 0,113 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Абемациклиб 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,445 | 0,1054 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,672 | 0,1054 | <0,001* |
| Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,013 | 0,1103 | 0,905 |
| Абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/абемациклиб, 50 мг/кг, QD x 42, ПО РО | 0,227 | 0,1054 | 0,039* |

Разница^b = лечение 1 - лечение 2; *р-значение: значительно (p < 0,05)

СО - Стандартная ошибка

Таблица 20: Эффективность комбинации Примера 10 с абемациклибом в MCF7 РЭ-позитивной модели рака груди

| Лечение | % дельта Т/С или % регрессии | p-значение | Комбинированный эффект | Масса тела |
|---------------------------------------|------------------------------|------------|------------------------|----------------------------|
| Растворитель | н.с. | н.с. | | |
| Пример 10 | -51 | <0,001* | | |
| Абемациклиб | -70 | <0,001* | | |
| Пример 10 /Абемациклиб / (Комбинация) | -71 | <0,001* | Меньше, чем аддитивный | Без значительных изменений |

Анализ объема опухоли основан на Log_{10} и Spatial Power ковариационной структуры.

5 * p-значение: значительно ($p < 0,05$); н.с.: не соответствует

% дельта Т/С рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли; и % регрессии рассчитывают для объема опухоли ниже исходного значения. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. T_0 и C_0 - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

Как показано в Таблицах 21 и 22, лечение препаратом Примера 10 или алпелисибом в качестве единственного агента приводило к 51% ($\%dT/C = -51$) и 21% ($\%dT/C = -21$) регрессии опухоли соответственно, и оба они статистически значимы ($p < 0,001$ и $p = 0,013$) по сравнению с растворителем контролем. Эффективность комбинации Примера 10 с алпелисибом была «аддитивная», и эффективность комбинации Примера 10 плюс алпелисиб была значительно выше, чем эффективность только Примера 10 ($p = 0,009$). Эффективность комбинации Примера 10 и алпелисиба также была значительно выше, чем эффективность только алпелисиба ($p = <0,001$). Комбинация переносится животными без значительной потери массы тела.

15

20

Таблица 21: Эффективность комбинации Примера 10 с алпелисибом на модели MCF7 РЭ-позитивного рака груди

| Лечение 1 | Лечение 2 | Разница ^b | СО | р-значение |
|--|--|----------------------|--------|------------|
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,241 | 0,1121 | <0,039* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Алпелисиб 15 мг/кг (d1-d7,), 10 мг/кг (d8-42), мг/кг, QD x 42, ПО | 0,445 | 0,1121 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/алпелисиб 15 мг/кг (d1-d7,), 10 мг/кг (d8-42), мг/кг, QD x 42, ПО | 0,755 | 0,1121 | <0,001* |
| Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/алпелисиб 15 мг/кг (d1-d7,), 10 мг/кг (d8-42), мг/кг, QD x 42, ПО | 0,514 | 0,1121 | <0,001 |
| Алпелисиб 15 мг/кг (d1-d7,), 10 мг/кг (d8- 42), МПК, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/алпелисиб 15 мг/кг (d1-d7,), 10 мг/кг (d8-42), мг/кг, QD x 42, ПО | 0,310 | 0,1121 | 0,009* |

Разница^b = лечение 1 - лечение 2; *р-значение: значительно (p < 0,05)

СО - Стандартная ошибка

Таблица 22: Эффективность комбинации Примера 10 с алпелисибом на модели MCF7 РЭ-позитивного рака груди

| Лечение | % дельта Т/С или % регрессии | р-значение | Комбинированный эффект | Масса тела |
|-----------------------------------|------------------------------|------------|------------------------|----------------------------|
| Растворитель | н.с. | н.с. | | |
| Пример 10 | -51 | <0,001* | | |
| алпелисиб | -21 | <0,013* | | |
| Пример 10 /алпелисиб (Комбинация) | -76 | <0,001* | Аддитивный | Без значительных изменений |

Анализ объема опухоли основан на Log₁₀ и Spatial Power ковариационной структуры.

5 * р-значение: значительно (p < 0,05); н.с.: не соответствует

% дельта Т/С рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли; и % регрессии рассчитывают для объема опухоли ниже исходного значения. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. Т₀ и С₀ - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

Как показано в Таблицах 23 и 24, лечение препаратом Примера 10 или эверолимусом в качестве единственного агента приводит к 51% (%dT/C = -51) и 50% (15 %dT/C = -50) регрессии опухоли соответственно, и оба они статистически значимы (p<0,001 и p<0,001) по сравнению с растворителем контролем. Эффективность комбинации Примера 10 с эверолимусом была «аддитивной», и эффективность комбинации Примера 10 плюс эверолимус была значительно выше, чем эффективность только Примера 10 (p = 0,004). Эффективность комбинации Примера 10 плюс эверолимус (20 также была значительно выше, чем эффективность только эверолимуса (p = 0,04). Комбинация переносится животными без значительной потери массы тела.

Таблица 23: Эффективность комбинации Примера 10 с эверолимусом на модели MCF7 РЭ-позитивного рака груди

| Лечение 1 | Лечение 2 | Разница ^b | СО | р-значение |
|-----------|-----------|----------------------|----|------------|
|-----------|-----------|----------------------|----|------------|

| | | | | |
|--|---|-------|--------|---------|
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,445 | 0,0999 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Эверолимус, 5 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,433 | 0,1038 | <0,001* |
| Растворитель, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/Эверолимус, 5 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,748 | 0,0999 | <0,001* |
| Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/Эверолимус, 5 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,303 | 0,0999 | 0,004* |
| Эверолимус, 5 мг/кг, QD x 42, ПО | Пример 10, 15 мг/кг, QD x 42, ПО/Эверолимус, 5 мг/кг, QD x 42, ПО | 0,315 | 0,138 | 0,004* |

Разница^b = лечение 1 - лечение 2; *р-значение: значительно (p <0,05)

СО - Стандартная ошибка

Таблица 24: Эффективность комбинации Примера 10 с эверолимусом на модели MCF7 РЭ-позитивного рака груди

| Лечение | % дельта Т/С или % регрессии | р-значение | Комбинированный эффект | Масса тела |
|------------------------------------|------------------------------|------------|------------------------|----------------------------|
| Растворитель | н.с. | н.с. | | |
| Пример 10 | -51 | <0,001* | | |
| Эверолимус | -50 | <0,001* | | |
| Пример 10 /Эверолимус (Комбинация) | -76 | <0,001* | Аддитивный | Без значительных изменений |

Анализ объема опухоли основан на Log₁₀ и Spatial Power ковариационной структуры.

5 * р-значение: значительно (p < 0,05); н.с.: не соответствует

% дельта Т/С рассчитывают, когда конечный объем опухоли в обработанной группе находился на уровне или выше исходного объема опухоли; и % регрессии рассчитывают для объема опухоли ниже исходного значения. Формула $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, в которой Т и С являются средними конечными объемами опухоли в обработанной или контрольной группе соответственно. T₀ и C₀ - средние исходные объемы опухолей в данных группах.

10

Анализ пероральной биодоступности у крыс

Цель следующего анализа - продемонстрировать, является ли тестируемое соединение биодоступным при пероральном введении.

15

Испытываемое соединение вводят крысам линии Спрега-Доули внутривенно (ВВ) в количестве 1 мг/кг (с применением растворителей: 20% CAPTISOL® в 25 мМ натрий-фосфатном буфере, достаточное количество для рН 2; или 25% DMA, 15% EtOH, 10% пропиленгликоля, 25% 2-пирролидона и 25% очищенной воды) и перорально (ПО) в количестве 10 мг/кг (с применением растворителя: 1% гидроксипропилцеллюлозы, 0,25% полисорбата 80, 0,05% пеногасителя 1510-US и достаточное количество очищенной воды).

20

Серийные образцы крови отбирали через 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 12 ч после ВВ болюсного введения дозы и через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 12 ч после перорального введения дозы. После обработки коагулянтом EDTA, плазму получали путем центрифугирования и хранили при -70°C до анализа путем ЖХ-МС/МС. Определяли концентрацию

25

тестируемого соединения в плазме и загружали в систему Watson LIMS™, где для расчета площади под кривой (ППК) для ВВ и ПО ветвей применяли некомпартментный анализ.

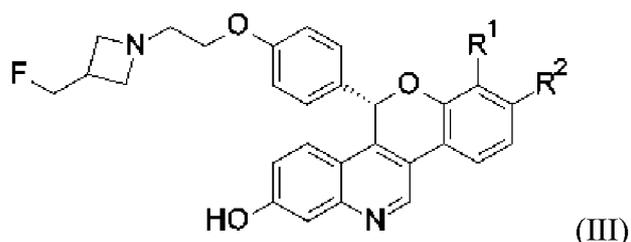
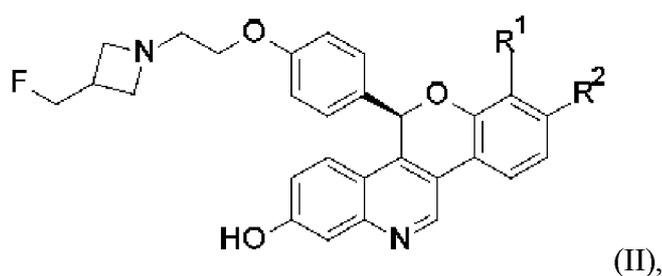
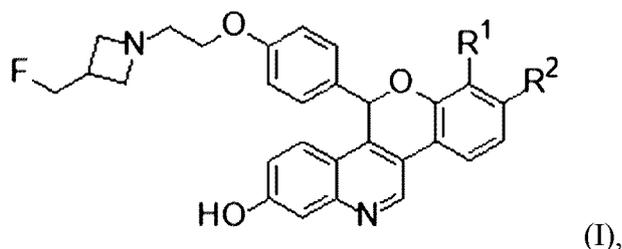
Рассчитывают пероральную биодоступность (% F) при помощи следующего уравнения,

$$\%F = (\text{ППК}_{\text{ПО}} \times \text{доза}_{\text{ВВ}}) / (\text{ППК}_{\text{ВВ}} \times \text{доза}_{\text{ПО}}) \times 100.$$

- 5 Соединения Примера 1В показывают значение % F ~ 50% в вышеупомянутом анализе. Этот анализ показывает, что Пример 1В имеет хорошую биодоступность при пероральном введении.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтический агент для лечения рака у пациента, содержащий соединение формул I, II или III:



где или R^1 , или R^2 независимо выбран из Cl, F, $-CF_3$ или $-CH_3$, а другой представляет собой водород,

или его фармацевтически приемлемую соль,

где терапевтический агент применяют в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из СМРЭ, ингибиторов ароматазы, ингибиторов CDK4, ингибиторов CDK6, ингибиторов PI3K, ингибиторов mTOR и ингибитора PI3K/mTOR.

2. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой СМРЭ.

3. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой ингибитор ароматазы.

4. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой ингибитор CDK4.

5. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой ингибитор CDK6.

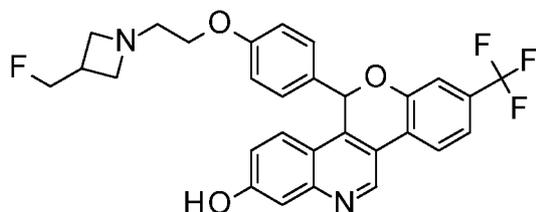
6. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой абемациклиб.

7. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что ингибитор mTOR представляет собой эверолимус.

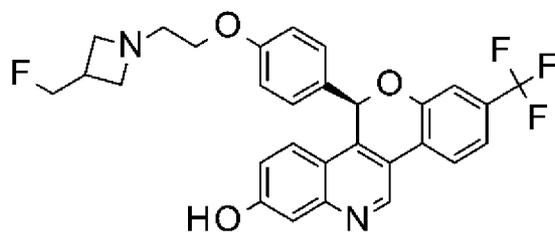
8. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что ингибитор PI3K представляет собой алпелисиб.

9. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из соли бензолсульфоновой кислоты или соли 4-метилбензолсульфоновой кислоты.

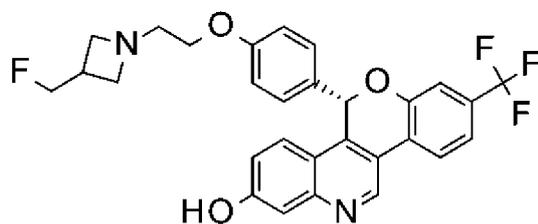
10. Терапевтический агент по п.1, отличающийся тем, что соединение формулы I представляет собой



соединение формулы II представляет собой



и
соединение формулы III представляет собой



11. Терапевтический агент по п.10, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из соли бензолсульфоновой кислоты и соли 4-метилбензолсульфоновой кислоты.

12. Терапевтический агент по п.10, отличающийся тем, что у пациента идентифицирован или диагностирован рак, выбранный из группы, состоящей из: рака

груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка и рака легких.

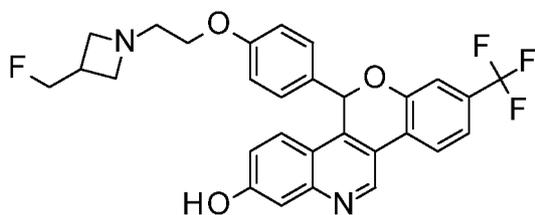
13. Терапевтический агент по п.12, отличающийся тем, что рак груди представляет собой РЭ-положительный рак груди.

14. Терапевтический агент по п.12, отличающийся тем, что рак желудка представляет собой РЭ-положительный рак желудка.

15. Терапевтический агент по п.12, отличающийся тем, что рак легких представляет собой РЭ-положительный рак легких.

16. Терапевтический агент по п.12, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает абемациклиб, эверолимус или алпелисиб.

17. Терапевтический агент для лечения рака, содержащий соединение формулы I:

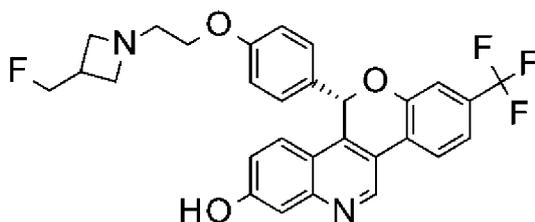


соединение формулы II:



, или

соединение формулы III:



или его фармацевтически приемлемую соль,

где терапевтический агент применяют в комбинации со вторым терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из СМРЭ, ингибиторов ароматазы, ингибиторов CDK4, ингибиторов CDK6, ингибиторов PI3K, ингибиторов mTOR и ингибитора PI3K/mTOR.

18. Терапевтический агент по п.17, отличающийся тем, что второй терапевтический агент включает абемациклиб, эверолимус или алпелисиб; и фармацевтически приемлемая

соль выбрана из группы, состоящей из соли бензолсульфоновой кислоты или соли 4-метилбензолсульфоновой кислоты.

19. Терапевтический агент по п.18, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка и рака легких.

20. Терапевтический агент по п.19, где рак груди представляет собой РЭ-позитивный рак груди, рак желудка представляет собой РЭ-позитивный рак желудка и рак легких представляет собой РЭ-позитивный рак легких.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference X21755 | FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. | |
| International application No. PCT/US2019/041334 | International filing date (<i>day/month/year</i>) 11 July 2019 (11-07-2019) | (Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 12 July 2018 (12-07-2018) |
| Applicant ELI LILLY AND COMPANY | | |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/041334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07D491/052 A61K31/436 A61P35/00
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | US 2011/281847 A1 (DALLY ROBERT DEAN [US] ET AL) 17 November 2011 (2011-11-17) the whole document | 1-22 |
| A | ----- US 2017/197915 A9 (GENENTECH INC [US]) 13 July 2017 (2017-07-13) page 14, left hand column, last formula; paragraph [0168] ----- | 1-22 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2019

Date of mailing of the international search report

10/10/2019

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
 Grassi, Damian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/041334

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
| US 2011281847 | A1 | 17-11-2011 | AT 476428 T 15-08-2010 |
| | | | AU 2005207821 A1 11-08-2005 |
| | | | BR PI0506721 A 02-05-2007 |
| | | | CA 2551956 A1 11-08-2005 |
| | | | CN 102250042 A 23-11-2011 |
| | | | CR 8517 A 01-12-2006 |
| | | | EA 200601353 A1 27-02-2007 |
| | | | EA 200900586 A1 28-08-2009 |
| | | | EC SP066711 A 31-10-2006 |
| | | | EP 1709021 A1 11-10-2006 |
| | | | ES 2347973 T3 26-11-2010 |
| | | | JP 4909086 B2 04-04-2012 |
| | | | JP 2007519721 A 19-07-2007 |
| | | | KR 20060129277 A 15-12-2006 |
| | | | KR 20080016755 A 21-02-2008 |
| | | | MA 28436 B1 01-02-2007 |
| | | | SG 149867 A1 27-02-2009 |
| | | | US 2009023917 A1 22-01-2009 |
| | | | US 2011281847 A1 17-11-2011 |
| | | | WO 2005073204 A1 11-08-2005 |
| ----- | | | |
| US 2017197915 | A9 | 13-07-2017 | CN 107406424 A 28-11-2017 |
| | | | EP 3233828 A1 25-10-2017 |
| | | | JP 2018504384 A 15-02-2018 |
| | | | US 2016304450 A1 20-10-2016 |
| | | | WO 2016097071 A1 23-06-2016 |
| ----- | | | |