

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046987**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.20

(21) Номер заявки
202392062

(22) Дата подачи заявки
2022.03.10

(51) Int. Cl. **C07H 17/00** (2006.01)
C07D 491/052 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ РАЗРУШИТЕЛИ ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА**(31) **63/161,531**(32) **2021.03.16**(33) **US**(43) **2023.09.13**(86) **PCT/US2022/019770**(87) **WO 2022/197528 2022.09.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Кассиди Кеннет Чарльз, Катяян
Кишор Кумар (US)**

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

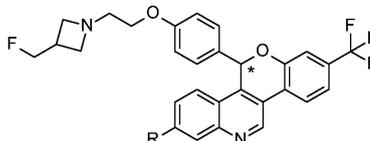
(56) WO-A1-2020014435
ERVIN SAMANTHA M. ET AL.: "Structural
Insights into Endobiotic Reactivation by Human Gut
Microbiome-Encoded Sulfatases", *BIOCHEMISTRY*,
vol. 59, no. 40, 29 September 2020 (2020-09-29),

pages 3939-3950, XP055936669, ISSN: 0006-2960,
DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00711, Retrieved
from the Internet: URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.biochem.0c00711>> abstract
"Discussion" part; page 3947, right-hand column -
page 3948, left-hand column

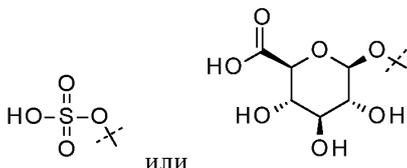
ERVIN SAMANTHA M. ET AL.:
"Gut microbial [beta]-glucuronidases reactivate
estrogens as components of the estrobolome
that reactivate estrogens", *JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 294, no. 49, 1
December 2019 (2019-12-01), pages 18586-18599,
XP055935415, US, ISSN: 0021-9258, DOI:
10.1074/jbc.RA119.010950, abstract, page 18586,
right-hand column, line 1 - page 18587, left-hand
column, line 28; figure 1

BAO TING ZHU ET AL.: "Functional role
of estrogen metabolism in target cells: review
and perspectives", *CARCINOGENESIS*, vol. 19,
no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1-27,
XP055936634, GB, ISSN: 0143-3334, DOI: 10.1093/
carcin/19.1.1 Part "Formation and hydrolysis of
estrogen sulfates and glucuronides"; page 11, right-
hand column, line 43 - page 23, right-hand column,
line 21 page 16; figure 5, page 16, left-hand column,
lines 6-13

(57) Предложены новые избирательные разрушители эстрогенового рецептора (SERD) формулы



и их фармацевтически приемлемая соль, и их фармацевтические композиции, где R выбран из

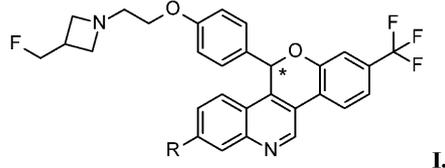
**B1****046987****046987 B1**

Предпосылки создания изобретения

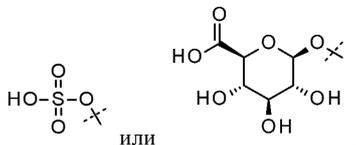
Избирательные разрушители эстрогенового рецептора (SERD) связываются с эстрогеновым рецептором (ER) и подавляют опосредованную ER транскрипционную активность. Такая деградация и дезактивация, вызванные SERD, могут быть полезны при лечении нарушений пролиферации клеток, таких как рак. Некоторые примеры низкомолекулярных SERD описаны в литературе (см., например, WO 2005073204, WO 2014205136 и WO 2016097071). Однако известные SERD пока не так полезны, как это необходимо для эффективного лечения рака. Например, обнаружение SERD 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. Высоко избирательный антагонист SERD с ингибированием опосредованной ER транскрипции был бы особенно полезен при лечении рака. Существует потребность в новых SERD для лечения таких видов рака, как рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак матки, рак желудка и рак легких, а также мутаций из-за возникающей резистентности. В частности, существует потребность в новых SERD для лечения ER-положительного рака молочной железы, рака желудка и/или рака легких.

В данном документе описаны новые тетрациклические соединения и их фармацевтические соли, которые действуют как SERD. Недавно изобретенные SERD, которые описаны в настоящем документе, обеспечивают ингибирование опосредованной ER транскрипции, что будет полезно при лечении таких видов рака, как рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак матки, рак желудка и рак легких, а также мутаций из-за возникающей резистентности. Эти SERD могут использоваться либо в качестве отдельных агентов, либо в комбинации с другими классами лекарств, включая избирательные модуляторы эстрогенового рецептора (SERM), ингибиторы ароматазы, ингибиторы CDK4, ингибиторы CDK6, ингибиторы PI3K и ингибиторы mTOR для лечения рака, положительно по рецептору гормонов, такого как рак молочной железы, рак желудка и/или рак легких.

Описанные в данном документе новые соединения представлены формулой I:

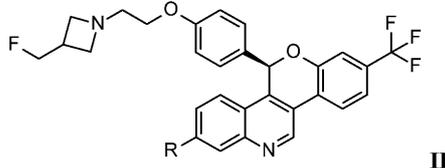


где R выбран из

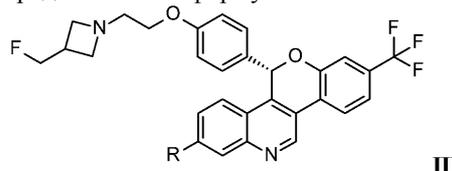


или его фармацевтически приемлемая соль.

Специалисту в данной области будет очевидно, что соединения, описанные формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли содержат хиральный центр, положение которого обозначено посредством *. Специалисту в данной области также будет очевидно, что согласно правилам Кана - Ингольда - Прелога расположение (R) или (S) для хиральных центров будет отличаться в зависимости от схем замещения вокруг хирального центра. Хиральный центр в соединении формулы I обеспечивает R-энантиомерную форму, показанную формулой II:

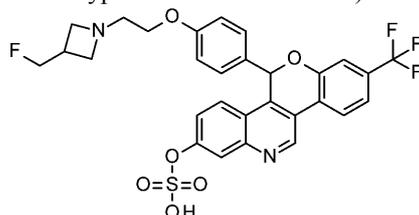


A S-энантиомерная форма, представленная формулой III:

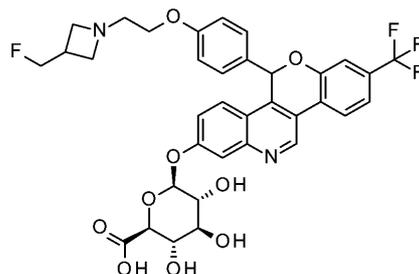


Все индивидуальные стереоизомеры, энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров и диастереомеров соединений формулы I, формулы II и формулы III, включая рацематы, включены в объем описанных в данном документе соединений. Соединения для фармацевтического применения, которые содержат хиральные 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:



[5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]гидросульфат;



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[[[5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]окси]-3,4,5-тригидрокситетрагидропиран-2-карбоновая кислота.

Из-за хирального центра формулы I, обозначенного выше посредством *, 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 табл. 1.

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]этоксифенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]гидросульфат		
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[[[5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]окси]-3,4,5-тригидрокситетрагидропиран-2-карбоновая кислота		

В настоящем документе также описаны фармацевтические композиции, содержащие соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых добавок. В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая(е) добавка(и)" относится к одному или более носителям, разбавителям и эксципиентам, ко-

торые совместимы с другими добавками к композициям или составам 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 контроля или оптимизации биодоступности активного ингредиента. Например, пероральная биодоступная композиция SERD будет особенно полезной. Считается, что соединения формулы I, формулы II и формулы III или их фармацевтически приемлемые соли, описанные в настоящем документе, обладают биодоступностью. Примеры фармацевтических композиций и способов их получения приведены в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L. V. Allen Jr, Editor, 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Не имеющие ограничительного характера примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и эксципиентов включают следующие: солевой раствор, вода, крахмал, сахара, маннит и производные кремнезема; связующие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон; каолин и бентонит; и полиэтиленгликоли.

В настоящем документе дополнительно описаны способы лечения рака. Описанные в настоящем документе способы включают введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, или его фармацевтической композиции. Например, способ введения эффективного количества соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, или его фармацевтических композиций может представлять собой пероральное введение или альтернативно может представлять собой внутривенное введение. Рак может представлять собой рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак матки, рак желудка или рак легких. В частности, рак может быть эстрогенчувствительным раком, например ER-положительным раком молочной железы, ER-положительным раком желудка или ER-положительным раком легких.

В настоящем документе также описаны соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемая соль, или их фармацевтическая композиция для применения в терапии. В настоящем документе также представлены соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемая соль, или их фармацевтическая композиция для применения в лечении рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака матки, рака желудка или рака легких. Например, рак может быть ER-положительным раком молочной железы, ER-положительным раком желудка или ER-положительным раком легких. Например, соединение формулы I, формулы II и формулы III, или его фармацевтически приемлемую соль, или его фармацевтическую композицию можно вводить перорально.

Кроме того, соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, или их фармацевтическую композицию можно применять в получении 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 молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка или рак легких. Например, рак может быть ER-положительным раком молочной железы, ER-положительным раком желудка или ER-положительным раком легких.

Соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, и их фармацевтически приемлемые соли или их фармацевтическая композиция могут иметь клиническое применение в качестве единственного агента или в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами (например, противораковыми агентами) для лечения таких видов рака, как рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак предстательной железы, 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 настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, или их фармацевтическую композицию можно применять одновременно, последовательно или отдельно с другими терапевтическими агентами. 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 SERM, ингибиторы ароматазы, ингибиторы CDK4, ингибиторы CDK6, ингибиторы PI3K и ингибиторы mTOR для лечения рака молочной железы, положительного по рецептору гормонов. Более конкретные примеры лекарственных средств, с которыми можно комбинировать соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, или их фармацевтическую композицию, включают абемациклиб (ингибитор CDK4/6), эверолимус (ингибитор mTOR), альпелисиб (ингибитор PI3K) 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).

В настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, или его фармацевтической композиции, которые при однократном или многократ-

ном введении пациенту обеспечивают требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению. Предпочтительно требуемый эффект представляет собой ингибирование пролиферации опухолевых клеток, гибель опухолевых клеток или оба этих эффекта. Соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, или их фармацевтическая композиция по существу эффективны в широком диапазоне доз. Например, суточные дозировки обычно находятся в суточном диапазоне от примерно 100 мг до примерно 2000 мг.

В настоящем документе термин "лечить", "лечащий" или "лечение" относится к ограничению, замедлению, остановке или обращению прогрессирования или тяжести существующего симптома или расстройства.

В настоящем документе термин "пациент" относится к человеку, имеющему конкретное заболевание, расстройство или патологическое состояние.

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 в способах 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. Реагенты и исходные вещества легко доступны рядовому специалисту в данной области.

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, некоторые промежуточные соединения, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или более защитных групп. Переменные защитные группы в каждом случае могут быть одинаковыми или различными, в зависимости от конкретных условий реакции и конкретных преобразований, которые должны быть осуществлены. Условия защиты и снятия защиты хорошо известны специалистам в данной области и описаны в литературных источниках (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 настоящем документе, такими способами, как способ избирательной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and 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 настоящем документе как "изомер 1" или "изомер 2", выделены, как указано в конкретных описаниях экспериментов ниже. То, является ли изомер "1" или "2", относится к порядку, в котором соединения формулы I, формулы II и формулы III элюируются из колонки для хиральной хроматографии в указанных условиях, т. е. "изомер 1" представляет собой изомер, который первым элюируется из колонки 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: BSA - бычий сывороточный альбумин; CRISPR - кластеризованные регулярно перемежающиеся короткие палиндромные повторы; DCM - дихлорметан или метилхлорид; DMEA - диметилэтаноламин; DMEM - модифицированная по способу Дульбекко среда Игла DMF - N,N-диметилформамид; "DMCO" означает диметилсульфоксид; ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота; ee - в энантиомерном выражении; ER - эстрогеновый рецептор; ER α - эстрогеновый альфа-рецептор; ИЭР/МС - ионизация электрораспылением / масс-спектрометрия; EtOAc - этилацетат; EtOH - этанол, или этиловый спирт; FBS - эмбриональная бычья сыворотка; HCl - соляная кислота; Термин "IC₅₀" относится к концентрации агента, которая вызывает 50% от максимального ингибирующего ответа, возможного для данного агента (относительная IC₅₀), или концентрации агента, которая вызывает 50% ингибирование активности целевого фермента по сравнению с контрольным образцом с плацебо (абсолютная IC₅₀); iPrOH - изопропанол, или изопропиловый спирт; в/в - внутривенное введение; ЖХ/МС - жидкостная хроматография / масс-спектрометрия MeOH - метиловый спирт, или метанол; МТВЕ - метил-m-бутиловый простой эфир m/z - отношение массы к заряду; PBS - фосфатно-солевой буферный раствор; PR - прогестероновый рецептор; PR α - альфа-рецептор

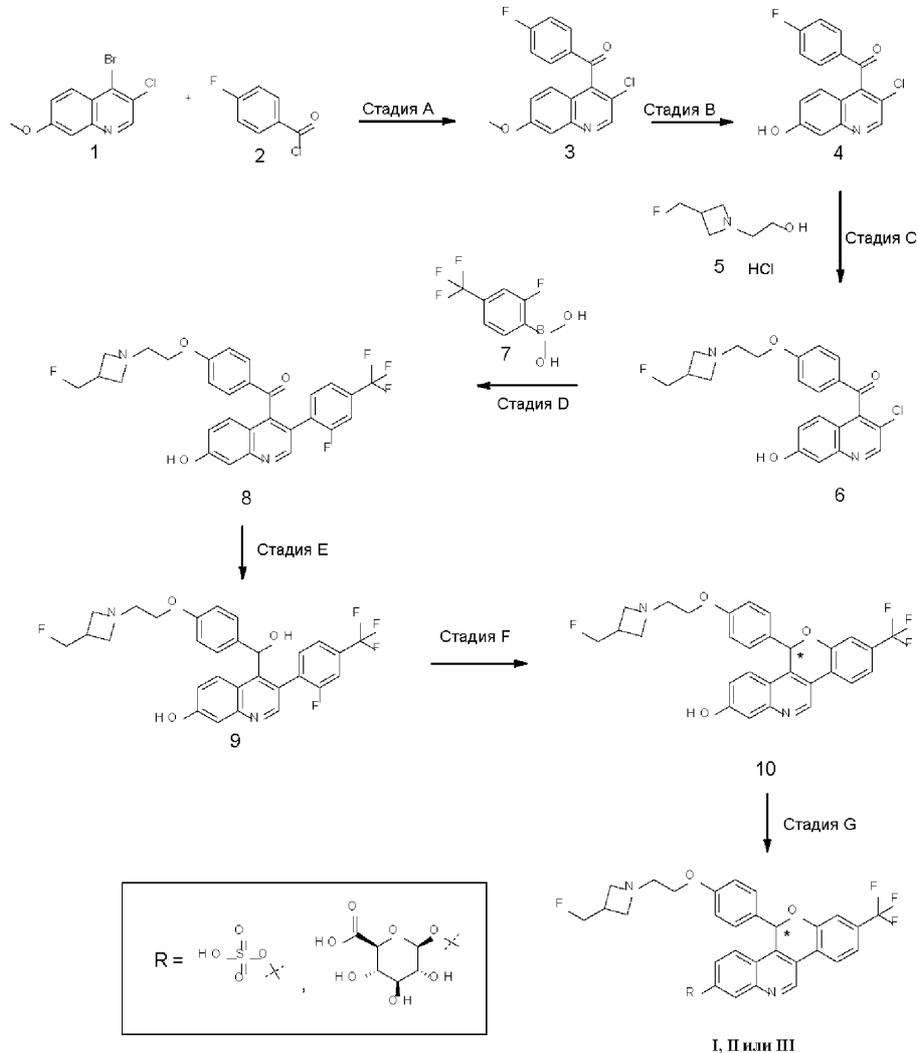
к прогестерону; RN-аза - рибонуклеаза; СЖХ - сверхкритическая жидкостная хроматография; ТГФ - тетрагидрофуран; $t_{(R)}$ - время удерживания; и XPhos Pd G2 -хлор(2-дидциклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II).

Следующие способы получения и примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение.

Способы получения и примеры

На схеме 1 представлен синтез соединений формулы I, II или III.

Схема 1.



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

На стадии В арилметилловый простой эфир соединения 3 можно деметилировать в различных условиях, известных специалисту в данной области, таких как обработка трибромидом бора. Например, соединение 3 медленно обрабатывают трибромидом бора при температуре около 0°C в растворителе, таком как DCM. Смесь перемешивают при комнатной температуре и гасят двухосновным фосфатом калия с получением соединения 4.

На стадии С азетидиновый эфир 6 может быть образован обработкой соответствующего н-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 ТГФ, с получением эфира 6.

Затем соединение 6 алкилируют соответствующей замещенной арилбороновой кислотой, соединением 7, в реакции кросс-сочетания Сузуки с получением соединения 8 на стадии D. Специалист в данной области поймет, что существует множество условий, которые можно использовать для облегчения таких

реакций кросс-сочетания. Подходящие палладиевые реагенты могут включать XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, хлорид бис(трифенилфосфин)палладия(II), трис(добензилиденацетон)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-бутоксид лития или трехосновный моногидрат фосфата калия. Соединение 6, например, можно приводить в реакцию с соответствующей бороновой кислотой, соединением 7, такой 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 нагревать до около 80°C в условиях микроволн с получением соединения 8.

Специалист в данной области поймет, что стадия D, реакция кросс-сочетания Сузуки, может быть завершена до образования азетидинового эфира на стадии С.

Специалист в данной области поймет, что на стадии E соединение 9 можно получать посредством восстановления кетона. Это может быть выполнено с использованием восстановителя, такого как триэтилборгидрид лития, в растворителях, таких как 1,4-диоксан и ТГФ, и при температуре от примерно 0°C до комнатной температуры с получением соответствующего вторичного спирта 9, который можно необязательно очистить посредством хиральной хроматографии с получением энантиомерно обогащенного вторичного спирта.

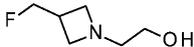
На стадии F спирт 9 можно поддавать внутримолекулярной циклизации посредством взаимодействия с основанием, таким как гидрид натрия, с получением циклического простого эфира 10. Специалист в данной области поймет, что для этой стадии можно использовать множество приемлемых оснований.

На стадии G дальнейшая реакция спирта 10 с комплексом триметиламина и триоксида серы или сложным метиловым эфиром ацетобром- α -D-глюкуроновой кислоты с последующим гидролизом сложного эфира дает соединения формулы I, II или III.

На необязательной стадии может быть получена фармацевтически приемлемая соль соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанного в настоящем документе, посредством взаимодействия соответствующего свободного основания соединения формулы I, формулы II и формулы III, описанного в настоящем документе, с соответствующей фармацевтически приемлемой кислотой в подходящем растворителе при 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, описанных 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.

Способ получения 1.

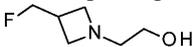
2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол.



Добавляют триацетоксиборгидрид натрия (405 г, 1,91 моль) порциями в течение 15 минут к перемешиваемому при 0°C раствору 3-(фторметил)азетидина гидрохлорида (160 г, 1,28 моль) в DCM (2,4 л) в атмосфере газообразного азота и перемешивают при 0°C в течение 10 мин. Добавляют 1,4-диоксан-2,5-диол (99 г, 0,83 моль) при 0°C 6 порциями в течение 1 часа, впоследствии перемешивают при 0-5°C в течение 15 минут. Позволяют реакционной смеси нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 2 часов в атмосфере газообразного азота. Реакционную смесь охлаждают до 10-15°C в течение 20 мин, затем нагревают до 25-30°C и выдерживают при этой температуре в течение 2 часов. Добавляют воду (800 мл) в течение 25-30 мин при 10-15°C, позволяют смеси нагреться до комнатной температуры в течение 5-10 мин, и впоследствии разделяют слои. Водный слой промывают DCM (800 мл), разделяют слои, впоследствии охлаждают объединенные водные слои до 10-15°C и доводят pH до 13-14, используя 50%-й водный раствор гидроксида натрия (~ 540 мл). Позволяют водному слою нагреться до комнатной температуры, экстрагируют DCM (4x800 мл), сушат безводным Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют досуха с получением указанного в заголовке соединения (139 г, 82%) в виде густого желтого масла. ИЭР/МС (m/z): 134,1 (M+H).

Способ получения 2.

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



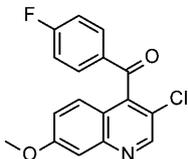
HCl

Растворяют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол (529 г, 4 моль) в МТВЕ (2,6 л) и охлаждают до

0°C. Добавляют раствор HCl/EtOH (492 мл, 30 мас.%) по каплям в течение 30 мин, затем перемешивают при 0°C в течение 30 мин. Фильтруют твердые вещества и промывают осадок на фильтре МТВЕ (2×200 мл). Сушат в атмосфере газообразного азота в течение 8 часов с получением указанного в заголовке соединения (580 г, 86%) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 134,0 (M+H).

Способ получения 3.

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



Охлаждают смесь 4-бром-3-хлор-7-метоксихинолина (70 г, 254 ммоль) и ТГФ (1 л) до -40°C в атмосфере газообразного азота, что приводит к осаждению материала. Добавляют изопропилмагнийхлорид (2 М в ТГФ, 254 мл, 509 ммоль) в течение 20 мин и перемешивают смесь в течение 1 часа. Добавляют раствор 4-фторбензоилхлорид (66 мл, 559 ммоль) в ТГФ (140 мл) по каплям, затем позволяют смеси нагреться до комнатной температуры. Гасят реакцию насыщенным водным раствором NH₄Cl (300 мл) и водой (200 мл) и разделяют слои. Органический слой промывают насыщенным водным раствором NH₄Cl (300 мл), сушат над безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют, с получением маслянистого остатка. Сырое коричневое масло фильтруют через силикагель, элюируя смесью МТВЕ/гексаны (1:1), с получением сырого продукта в виде желтого твердого вещества (84 г). Обрабатывают твердое вещество смесью 10% 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, элюируя смесью 10-40% EtOAc/гексаны, затем обрабатывают продукт 10% метилацетатом/гептаном (200 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч. 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. ИЭР/МС (m/z): 316,0 (M+H).

Способ получения 4.

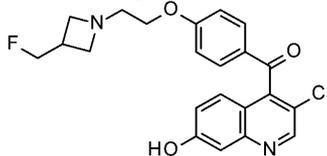
(3-Хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанон.



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 водного двухосновного фосфата калия (2 М, 700 мл) и воды (200 мл) при 0°C. Позволяют смеси нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 1 часа. Концентрируют раствор в вакууме для удаления органических растворителей, фильтруют, собирают фильтрат и сушат фильтрат в вакууме при 45°C в течение ночи. Обрабатывают 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 получением указанного в заголовке соединения (32 г, количественный выход) в виде светло-коричневого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 302,0 (M+H).

Способ получения 5.

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

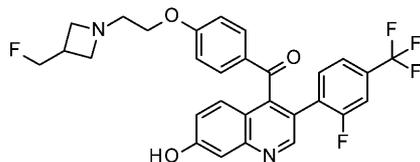


Добавляют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ола гидрохлорид (3,90 г, 23,0 ммоль) к перемешиваемому раствору (3-хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанона (5,00 г, 15,3 ммоль) в DMF (75 мл) с последующим добавлением гидрида натрия (60% в минеральном масле, 3,02 г, 76,8 ммоль). Перемешивают в атмосфере газообразного азота и нагревают до 40°C в течение 45 минут. Гасят раствор водой и концентрируют. Распределяют остаток между 20% iPrOH/CHCl₃ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и разделяют, водный раствор экстрагируют 2×20% 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 ве-

щества. ИЭР/МС (m/z): 415,0 (M+H).

Способ получения 6.

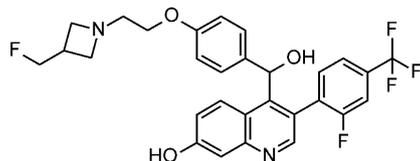
(4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанон.



Дегазируют с помощью газообразного азота (5×) 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°C на 2 часа. Распределяют остаток между МТВЕ и насыщенным водным раствором NH₄Cl. Разделяют слои и экстрагируют водную фазу МТВЕ. Объединяют органические экстракты, сушат безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют фильтрат с получением оранжевого остатка. Сырой материал очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя 5% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (205 мг, 78%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 543,2 (M+H).

Способ получения 7.

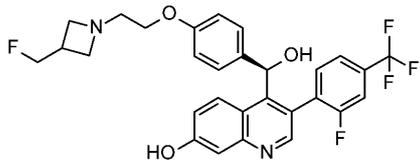
Рацемический 4-{2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидроксиметил)-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол.



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 ТГФ (1,5 л) вместе в атмосфере газообразного азота и охлаждают раствор до 0-5°C. По каплям добавляют триэтилборгидрид лития (1 М в ТГФ, 1,5 л, 1,5 моль). Перемешивают при 0-5°C в течение 1 часа. Добавляют воду (300 мл) по каплям и насыщенный водный раствор NH₄Cl (1 л). Смесь нагревают до комнатной температуры. Добавляют EtOAc (2 л) и собирают органический слой. Органический слой промывают рассолом (500 мл), сушат над безводным MgSO₄, 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. ИЭР/МС (m/z): 545,2 (M+H).

Способ получения 8.

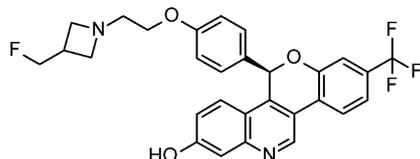
4-[(R)-[4-[2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-гидроксиметил]-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол.



Очищают рацемический 4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил(гидроксиметил)-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ол (5,5 г, 0,10 моль) с использованием хиральной хроматографии в следующих условиях: колонка Chiralpak® AD-H, 150×50 мм, расход 200 г/минута, УФ 270 нм, подвижная фаза 35% iPrOH с 0,5% DMEA/CO₂, температура колонки 35°C, с получением указанного в заголовке соединения (2,6 г, 47%). Подтверждают энантиомерное обогащение изомера 1 посредством хиральной аналитической СЖХ, >96% ee, t_(R) = 0,79 мин, колонка: 4,6×150 мм Chiralpak® AD-H, элюирование подвижной фазой 35% iPrOH с 0,5% DMEA в CO₂, расход 0,6 мл/мин, УФ-обнаружение на 350 нм.

Способ получения 9.

(5R)-5-[4-[2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-c]хинолин-2-ол.

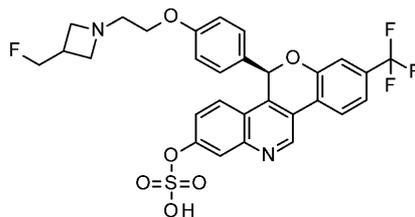


Добавляют гидрид натрия (60%-ная дисперсия в минеральном масле, 1,00 г, 15 ммоль) к переме-

шанному раствору 4-[(R)-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-гидроксиметил]-3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]хинолин-7-ола (2,60 г, 5 ммоль) в ТГФ (50 мл) и нагревают полученную смесь до 65°C в атмосфере газообразного азота. Через 1 час реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и впоследствии гасят водой (50 мл). Полученную смесь распределяют между EtOAc (50 мл) и насыщенным водным раствором NH₄Cl (50 мл). Разделяют слои и экстрагируют водную фазу свежим EtOAc (50 мл). Объединенные органические слои сушат над безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют с получением желтого твердого вещества. Сырую смесь очищают посредством колоночной хроматографии (4-6% MeOH/DCM) с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (1,98 г, 80%). ИЭР/МС (m/z): 525,2 (M+H).

Пример 1.

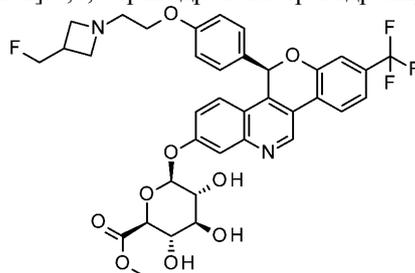
[(5R)-5-[4-[2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]гидросульфат.



Раствор метоксида натрия в MeOH (0,5 М, 0,6 мл, 0,3 ммоль) добавляют к раствору (5R)-5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ола (54 мг, 0,1 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 0,5 ч, каждый час добавляют комплекс триметиламина и триоксида серы (57 мг, 0,4 ммоль) четырьмя равными порциями в течение 4 ч. Впоследствии растворитель выпаривают в потоке газообразного азота и реакционную смесь разбавляют водой (5 мл). Добавляют водный раствор NaOH (1 М, 2 капли), доводя pH до 8. Раствор загружают непосредственно в автоматизированную хроматографическую систему Itechim (коллонка с обращенной фазой RediSep® Rf Gold C18, 30 г), элюируя градиентом от 10 до 90% ацетонитрила в воде, с получением указанного в заголовке продукта (46 мг, 74%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР/МС (m/z): 605,6 (M+H).

Способ получения 10.

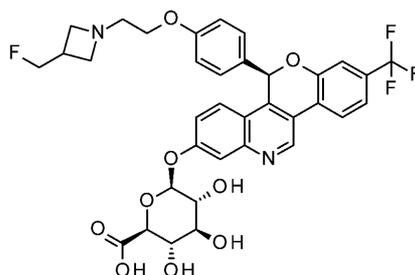
Метил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[[[(5R)-5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]окси]-3,4,5-тригидрокситетрагидропиран-2-карбоксилат.



Гидроксид лития (90,9 мг, 3,80 ммоль) добавляют к суспензии (5R)-5-[4-[2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ола (830,0 мг, 1,58 ммоль) в безводном MeOH (16 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивают до растворения исходного материала (примерно 20 мин). Добавляют сложный метиловый эфир ацетобром-α-D-глюкуроновой кислоты (1,19 г, 3,01 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч, после чего ЖХ/МС-анализ реакционной смеси указывает на 28% преобразование в желаемый продукт и 60% непрореагировавшего исходного материала. Добавляют дополнительное количество гидроксида лития (92,0 мг, 3,84 ммоль). После перемешивания в течение 10 мин добавляют дополнительное количество сложного метилового эфира ацетобром-α-D-глюкуроновой кислоты (1,19 г, 3,01 ммоль). Через еще 3 ч ЖХ/МС-анализ указывает на 35% преобразование в продукт и 50% непрореагировавшего исходного материала. Реакцию прерывают, и смесь используют на последующей стадии без очистки.

Пример 2.

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[[[(5R)-5-[4-[2-[3-(Фторметил)азетидин-1-ил]этокси]фенил]-8-(трифторметил)-5H-хромено[4,3-с]хинолин-2-ил]окси]-3,4,5-тригидрокситетрагидропиран-2-карбоновая кислота.



Реакционную смесь из способа получения 10 добавляют к раствору гидроксида лития (114,5 мг, 4,78 ммоль) в воде (10 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 часов, после чего ЖХ/МС-анализ реакционной смеси указывает на то, что гидролиз не завершен. Последовательно добавляют дополнительное количество гидроксида лития (114,5 мг, 4,78 ммоль) и MeOH (8 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часа, и ЖХ/МС-анализ указывает на то, что реакция гидролиза завершена. pH смеси доводят до pH 7 концентрированной уксусной кислотой и разделяют на две равные порции. Каждую порцию загружают в колонку с обращенной фазой C18 (колонка с обращенной фазой RediSep® Rf Gold C18, 275 г), элюируя градиентом от 0 до 100% ацетонитрила в воде. Фракции объединяют и концентрируют при пониженном давлении при 25°C. Остаток лиофилизируют с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-желтого твердого вещества (выход 80 мг, 7% за две стадии). ИЭР/МС (m/z): 701,6 (M+H).

Биологические анализы.

Доказательства взаимосвязи между экспрессией ER 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 SERD и считаются полезными при лечении рака.

Анализ разрушения ER α в клетках MCF7.

Целью следующего анализа разрушения ER α является измерение разрушения ER α тестируемым соединением в ER α -положительной клеточной линии рака молочной железы, такой как MCF7.

Культивируют клетки MCF7 (приобретенных 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, не содержащей феноловый красный (20 мкл), содержащей 10% очищенный от угля FBS. 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 последовательных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для последовательного разведения в планшет для 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 введения доз тестируемого соединения планшеты с клетками инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин 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 ч. Промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2 \times), 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 первичное антитело (20 мкл) (ER α (клон SP1) моноклональное антитело кролика № RM-9101-S, Thermo Scientific) в разведении в 1% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 на лунку, герметизируют планшеты и инкубируют в течение ночи при 4°C. На следующий день промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2 \times), и инкубируют с вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козий антикроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 мин при комнатной температуре. После промывания планшетов PBS (2 \times 20 мкл) добавляют RNКазу (Sigma) (20 мкл, 50 мкг/мл) и йодид пропидия, разведенный в PBS, 1:1000 на лунку (20 мкл). Герметизируют чашки и инкубируют 1 ч при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты с помощью ACUMEN EXPLORER™ (лазерного сканирующего флуоресцентного цитометра для планшетов, производимого TTP LABTECH LTD) для измерения Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. Определяют ER-положительные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % ER-положительных клеток. IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™. Относительные значения IC₅₀ для примеров 1 и 2 показаны в табл. 2. Результаты это-

го анализа демонстрируют разрушение ER α , индуцированное посредством примеров 1 и 2, как описано в настоящем документе, в клетках MCF7 рака молочной железы.

Таблица 2

Анализ разрушения ER α в клетках MCF7	
№ примера	Относительная IC ₅₀ (мкМ)
1	0,115 ± 0,0184, n = 4
2	0,211 ± 0,0692, n = 4

Индукционный анализ PR α в клетках MCF7.

Цель следующего индукционного анализа PR α заключается в определении того, обладает ли тестируемое соединение агонистической активностью в отношении рецептора ER 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, не содержащей 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 последовательных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки с добавлением тестируемого соединения (5 мкл) из планшета для последовательного 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 введения доз тестируемого соединения планшеты с клетками инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин 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 PR 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 PBS 0,05% TWEEN® 20 (2 x 20 мкл) и инкубируют со вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козье антитело к IgM кролика ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 минут при комнатной температуре. После промывания PBS (2x20 мкл) добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и йодид пропидия, разведенный в PBS, 1:1000 на лунку. Герметизируют планшеты и инкубируют 1 час при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты с помощью ACUMEN EXPLORER™ (лазерного сканирующего флуоресцентного цитометра для планшетов, производимого TTP LABTECH LTD) для измерения PR α . Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. Определяют PR-положительные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % PR-положительных клеток. IC₅₀ определяют 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 и 2 в клетках MCF7 рака молочной железы. 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 молочной железы. Эти результаты также демонстрируют, что приведенные в качестве примера тестируемые соединения являются антагонистами ER α в клетках MCF7 рака молочной железы (т.е. они обладают активностью SERD).

Анализ на ингибирование PR α (функциональный антагонизм ER α) в клетках MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR.

Цель следующего анализа на ингибирование PR α (функциональный антагонизм ER α) в клетках предназначен для определения антагонистической активности тестируемого соединения в отношении мутантного рецептора ER α Y537N. Ожидается, что антагонист в этом анализе блокирует функцию рецептора ER α . PR α является нижестоящей транскрипционной мишенью ER α , и, следовательно, ожидается, что антагонист ER α будет ингибировать экспрессию PR α .

Культивируют MCF7-ESR1 Y537N-682 (сгенерированный посредством редактирования гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон № 682) в среде DMEM с добавлением 10% FBS и 1% ан-

антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают клетки (до слипания на 70%) в 384-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 4000 клеток на лунку в среде DMEM, не содержащей фенолового красного и содержащей 10% FBS (объем 20 мкл) (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 последовательных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 мкМ до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для последовательного разведения в планшет для 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, 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 72 часов. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Промывают клетки PBS (1×20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 ч. Промывают клетки PBS (2×20 мкл), 0,05% TWEEN® 20, и блокируют 3% BSA в PBS, 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 PR 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°C.

На следующий день промывают клетки PBS 0,05% ® (2×20 мкл) и инкубируют со вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козье антитело к IgM кролика ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 мин при комнатной температуре. После промывания PBS (2×20 мкл) добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и йодид пропидия, разведенный в PBS, 1:1000 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 PRα. Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации положительных клеток. Определяют PR-положительные клетки по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % PR-положительных клеток. IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Относительные IC_{50s} примеров 1 и 2 в этом анализе показаны в табл. 3 ниже. Результаты этого анализа демонстрируют ингибирование PRα и функциональный антагонизм примеров 1 и 2 в клетках MCF7 (ESR1 Y537N, гетерозиготный мутант) рака молочной железы. PRα (PGR) также является мишенью транскрипции ERα, и результаты этого анализа демонстрируют ингибирование ERα-опосредованной транскрипции PRα.

Таблица 3

Анализ на ингибирование PRα (функциональный антагонизм ERα)
в клетках MCF7 Y537N 682 CRISPR

№ примера	Относительная IC ₅₀ (мкМ)
1	0,330 ± 0,116, n = 3
2	0,470 ± 0,058, 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.

Высевают клетки MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) с плотностью 2000 клеток на лунку в среде DMEM, не содержащей фенолового красного и содержащей 10% FBS (объем 20 мкл) (очищенный от угля) в 384-луночный планшет для культивирования клеток с прозрачным дном. Помещают MCF7-ESRY537N -682 (сгенерированный посредством редактирования гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон № 682) в среду DMEM 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 последовательных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 60 мкМ до 0,003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для последовательного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию 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, 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. Через семь дней после добавления тестируемого соединения вынимают планшеты из инкубатора и добавляют 96% холодного EtOH (65 мкл) в

каждую лунку. Через 30 мин удаляют среду и добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и раствор йодида 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 с помощью ACUMEN EXPLORER™ (лазерного сканирующего флуоресцентного цитометра для планшетов, производимого 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 с помощью предполагаемого количества клеток (рассчитывается с помощью параметра площади (отношение общей площади к общей популяции клеток (заданный диапазон пиковой интенсивности FL-1 (ПИ) и средней площади отдельных популяций 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 и 2 в клетках MCF7 ESR1 дикого типа и мутантных MCF7-ESR1 Y537N клеток показаны в таблице 4 ниже. Результаты этого анализа демонстрируют антипролиферативную активность и ингибирование роста клеток посредством примеров 1 и 2 в клетках MCF7 (ESR1 дикого типа) и MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака молочной железы. Относительные IC₅₀ приведенных в качестве примеров соединений находятся в диапазоне от примерно 0,0035 до 1,176 мкМ в MCF7 ESR1 дикого типа и от 0,014 до 1,86 мкМ в клетках MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака молочной железы, что указывает на то, что все приведенные в качестве примера соединения демонстрируют антипролиферативную активность и ингибирование роста клеток MCF7 (ESR1 дикого типа) и MCF7 (мутант ESR1 Y537N) рака молочной железы.

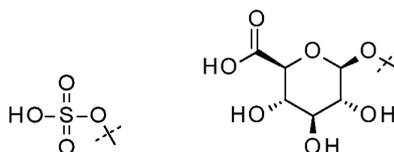
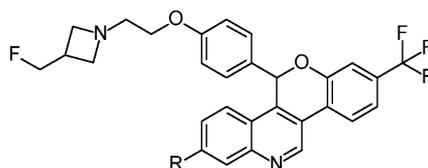
Таблица 4

Анализ пролиферации клеток в MCF7 и MCF7-ESR1Y537N-682

№ примера	Относительная IC ₅₀ (мкМ) MCF7 ESR1 дикого типа	Относительная IC ₅₀ (мкМ) мутантных клеток MCF7 ESR1 Y537N
1	0,518 ± 0,0499, n = 3	0,702 ± 0,389, n = 4
2	0,550 ± 0,238, n = 6	1,50 ± 0,966, n = 4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

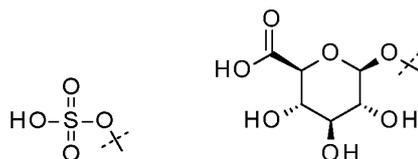
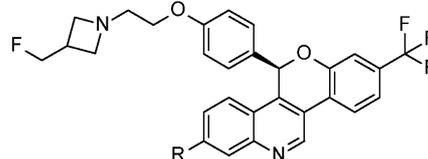
1. Соединение формулы



где R выбран из

или его фармацевтически приемлемая соль.

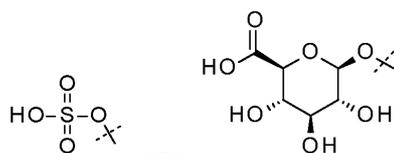
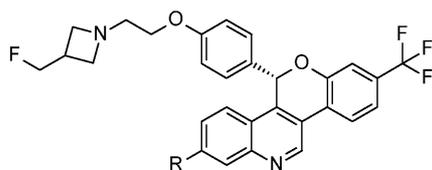
2. Соединение по п.1, представляющее собой



где R выбран из

или его фармацевтически приемлемая соль.

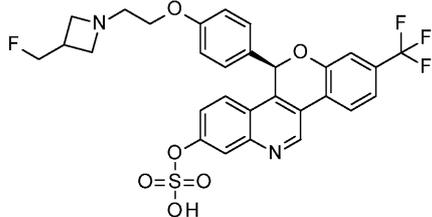
3. Соединение по п.1, представляющее собой



где R выбран из

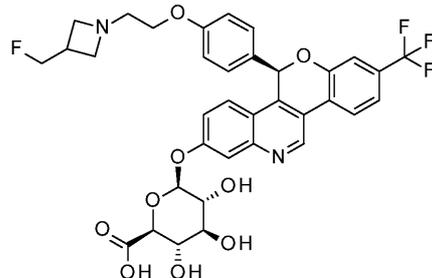
или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по любому из пп.1 или 2, представляющее собой



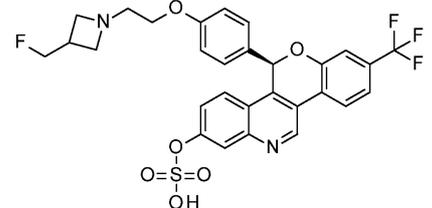
или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по любому из пп.1 или 2, представляющее собой

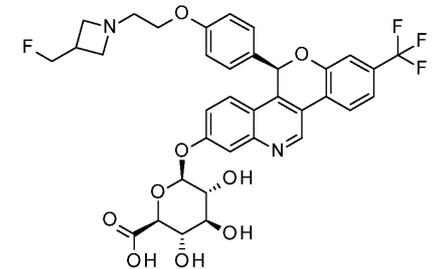


или его фармацевтически приемлемая соль.

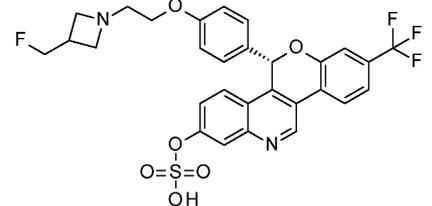
6. Соединение по любому из пп.1, 2 или 4, представляющее собой



7. Соединение по любому из пп.1, 2 или 5, представляющее собой

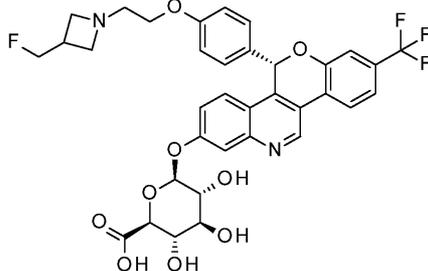


8. Соединение по любому из пп.1 или 3, представляющее собой



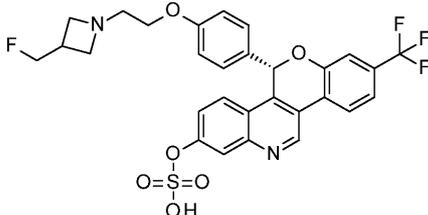
или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Соединение по любому из пп.1 или 3, представляющее собой

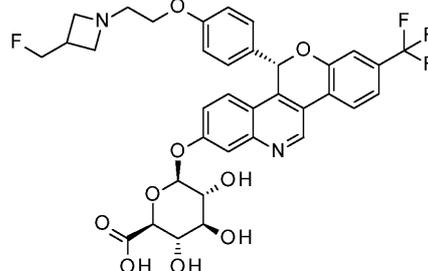


или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Соединение по любому из пп.1, 3 или 8, представляющее собой



11. Соединение по любому из пп.1, 3 или 9, представляющее собой



12. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-11 или его фармацевтически приемлемую соль с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, содержащая один или более других терапевтических агентов.

14. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по любому из пп.12 или 13, причем рак выбран из рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака матки, рака желудка или рака легких.

15. Способ по п.14, в котором рак молочной железы представляет собой положительный по эстрогеновому рецептору (ER) рак молочной железы.

16. Способ по п.14, в котором рак желудка представляет собой ER-положительный рак желудка.

17. Способ по п.14, в котором рак легких представляет собой ER-положительный рак легких.

18. Применение соединения по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по любому из пп.12 или 13 для лечения рака молочной железы, рака яичника, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака матки, рака желудка или рака легких.

19. Применение по п.18, причем рак молочной железы представляет собой ER-положительный рак молочной железы.

20. Применение по п.18, причем рак желудка представляет собой ER-положительный рак желудка.

21. Применение по п.18, причем рак легких представляет собой ER-положительный рак легких.

