

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034553**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.19

(21) Номер заявки
201891008

(22) Дата подачи заявки
2015.09.08

(51) Int. Cl. **C07D 401/06** (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМОВ, СВЯЗАННЫХ С АНТИАНДРОГЕННОЙ ТЕРАПИЕЙ

(31) 62/049,192

(32) 2014.09.11

(33) US

(43) 2018.09.28

(62) 201790220; 2015.09.08

(56) WO-A2-2008063867

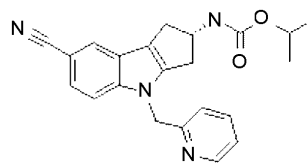
PING YI et al. Disposition and metabolism of LY2452473, a selective androgen receptor modulator, in humans. Drug metabolism & disposition, 2012, vol. 40, с. 2354-2364

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

(72) Изобретатель:
**Бенсон Чарльз Томас, Ю Ханна,
Ричей Рейчел (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю.,
Глухарёва А.О., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В. (RU)**

(57) Представлен способ лечения симптомов, связанных с андроген-депривационной терапией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I



Формула I

или его фармацевтически приемлемой соли.

B1

034553

034553

B1

Область техники и уровень техники

Настоящее изобретение относится к лечению симптомов, связанных с андроген-депривационной терапией, с применением изопропилового эфира (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение относится к области лечения симптомов, связанных с андроген-депривационной терапией. Андроген-депривационная терапия (ADT) или андроген-супрессивная терапия является стандартной терапией, используемой для уменьшения агрессивности рака предстательной железы в сочетании с другими методами лечения, направленными на уничтожение рака. Во время ADT уровень андрогенов, или мужских гормонов, в организме уменьшается, что предотвращает распространение раковых клеток предстательной железы. Андрогены, такие как тестостерон и дигидротестостерон (DHT), стимулируют рост раковых клеток предстательной железы. Однако было обнаружено, что раковые опухоли предстательной железы могут расти медленнее или даже сокращаться, если уровень андрогенов понижен. В Соединенных Штатах, по оценкам, приблизительно одна треть пациентов с раком предстательной железы получают ADT в некоторый момент лечения заболевания.

Существует несколько методов лечения, подходящих для снижения уровня андрогенов, таких как орхиэктомия или хирургическая кастрация, применение аналогов гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (LHRH), таких как лейпролид (продается в Соединенных Штатах как Lupron®, Eligard®), гозерелин (продается в Соединенных Штатах как Zoladex®), трипторелин (продается в Соединенных Штатах как Trelstar®) и хистрелин (продается в Соединенных Штатах как Vantas®), и антагонистов LHRH, таких как дегареликс (продается в Соединенных Штатах как Firmagon®) и абиратерон (продается в Соединенных Штатах как Zytiga®).

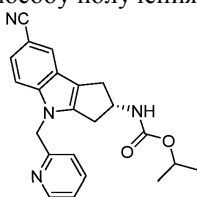
Большинство мужчин с раком предстательной железы на поздних стадиях хорошо отвечают на ADT. ADT, как правило, показана, когда рак предстательной железы распространяется за пределы капсулы предстательной железы на основе определения клинической стадии заболевания (T3 заболевание), когда терапию первой линии метастатического рака предстательной железы проводят с использованием агонистов/антагонистов GnRH или химической кастрации.

Возможны побочные эффекты, связанные с гормональной терапией, которые могут оказывать негативное влияние на качество жизни и увеличивать риск прекращения ADT терапии пациентом. Например, побочные эффекты могут включать снижение или отсутствие либидо, эректильную дисфункцию, сокращение мужских половых органов, приливы, остеопороз, анемию, снижение мышечной массы, снижение мышечной силы, увеличение жировых отложений, а также увеличение массы в связи с изменениями уровня гормонов тестостерона и эстрогена. Современные способы лечения побочных эффектов, связанных с ADT, известны в данной области техники. См. заявку на патент США 2009/0143344 (приливы - 5HT_{2A} или антагонист D_{2R}); заявку на патент США 2007/0281977 (приливы - антагонист мускариновых рецепторов); заявку на патент США 2008/0080143 (остеопороз, переломы костей, потеря BMD, приливы, гинекомастия, выпадение волос - торемифен). Однако в данной области техники существует потребность в разработке альтернативных способов лечения, позволяющих уменьшить некоторые побочные эффекты ADT. В действительности, до недавнего времени при рецидивирующей андрогенной депривации (IAD) было рекомендовано попытаться свести к минимуму побочные эффекты медицинской кастрации путем отмены лечения для пациентов, которые отвечали на ADT, а затем возобновления ADT, когда подтверждалось, что заболевание рецидивирует или прогрессирует. Однако в ходе испытаний на 1749 пациентах, рандомизированных для сравнения непрерывной ADT и IAD в течение среднего периода наблюдения 9,8 лет, было продемонстрировано, что непрерывная ADT лучше, чем IAD. Терапия для улучшения переносимости побочных эффектов ADT может приводить к улучшению соблюдения схемы лечения и может приводить к лучшим результатам лечения пациентов.

Было обнаружено, что селективные модуляторы андрогенного рецептора (SARM) демонстрируют дифференцированный профиль активности в андрогенных тканях. В частности, такие агенты предпочтительно демонстрируют агонистическую активность по отношению к андрогену в анаболических тканях, таких как мышцы или кости, но при этом являются лишь частичными агонистами или даже антагонистами в других андрогенных тканях, таких как предстательная железа или семенные везикулы. Таким образом, применение модуляторов андрогенных рецепторов (AR) может облегчить симптомы ADT у пациентов с раком предстательной железы.

Сущность изобретения

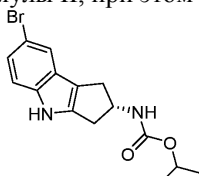
Настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы I



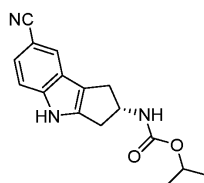
(Формула I),

включающему стадии

реакции $Zn(CN)_2$ с соединением формулы II, при этом получая соединение формулы III,

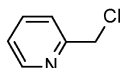


(Формула II),



(Формула III), и

образования соединения формулы I путем реакции соединения формулы III с соединением формулы IV



(Формула IV).

Согласно одному аспекту осуществления настоящего изобретения, реакция соединения формулы II с $Zn(CN)_2$ для получения соединения формулы III включает:

- (i) реакцию соединения формулы II с $Zn(CN)_2$, $Zn(OAc)_2$, Zn и $Pd(dppf)_2Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ в N,N-диметилацетамиде с образованием соединения формулы III в растворе;
- (ii) добавление воды для осаждения и выделения соединения формулы III из раствора;
- (iii) растворение осажденного и выделенного соединения формулы III в смеси трет-бутилметилового эфира и ацетона с образованием суспензии;
- (iv) фильтрование суспензии с получением фильтрата, содержащего соединение формулы III; и
- (v) обработку фильтрата, содержащего соединение формулы III, древесным углем, $MgSO_4$ и FLO-RISIL™.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения, соединение формулы III кристаллизуется в гептане.

Согласно еще одному аспекту осуществления настоящего изобретения, соединение формулы I получают способом, содержащим стадии:

- (i) реакция соединения формулы III с 2-пиколилхлорид гидроклоридом и K_2CO_3 в N,N-диметилацетамиде с получением соединения формулы I в растворе; и
- (ii) выделение соединения формулы I путем добавления воды в раствор, полученный на стадии (i), и фильтрации.

Согласно еще одному аспекту осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно содержит стадию перекристаллизации выделенного соединения формулы I в EtOH с получением кристаллической формы соединения формулы (I).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 иллюстрирует, что соединение примера 1 не приводило к сколько-нибудь значимому возрастанию массы семенных везикул после 8-недельной обработки у крысы, перенесшей орхидэктомию 8 недель назад, которая была гиперчувствительна к любой андрогенной стимуляции.

Фиг. 2 иллюстрирует, что соединение примера 1 приводило к значительному возрастанию минеральной плотности губчатой кости поясничного позвонка (LV-TBMD), и демонстрировало тенденцию к увеличению минерального содержания губчатой кости поясничного позвонка (LV-TBMC) и площади поперечного сечения (LV-TA) после 8-недельной обработки у крысы с орхидэктомией, проведенной 8 недель назад.

Фиг. 3 иллюстрирует, что комбинация тестостерон энантата (ТЕ) (1 мг/кг/сутки) с различными дозами соединения примера 1 позволяет предположить наличие тенденции к уменьшению влажной массы семенных везикул в мг, нормализованной к массе тела в граммах, которое индуцируется ТЕ, взятым в отдельности.

Фиг. 4 иллюстрирует, что совместная обработка крыс SD соединением примера 1 вместе с 1 мг/кг ТЕ приводит к дозозависимому уменьшению влажной массы предстательной железы в миллиграммах, нормализованной к массе тела в граммах.

Фиг. 5 иллюстрирует, что комбинация с ТЕ (1 мг/кг/сутки) и различных доз соединения примера 1 позволяет предположить наличие тенденции к уменьшению влажной массы семенных везикул в миллиграммах, нормализованной на массу тела в граммах, которое индуцируется ТЕ, взятым в отдельности.

Фиг. 6 иллюстрирует, что совместная обработка крыс SD соединением примера 1 вместе с 1 мг/кг ТЕ приводит к дозозависимому уменьшению влажной массы предстательной железы в миллиграммах, нормализованной к массе тела в граммах.

Фиг. 7 иллюстрирует увеличение области икроножных мышц согласно измерениям с помощью изображения на основе периферической компьютерной томографии икроножных связок (область икроножной мышцы) после введения соединения примера 1 здоровым людям-добровольцам.

Фиг. 8 иллюстрирует рост сухой мышечной массы во всем теле после введения соединения примера 1 здоровым людям-добровольцам согласно измерениям с помощью DEXA. Эффект у мужчин (синяя полоса) при уровне дозы 5 мг был статистически значимым по сравнению с 0 мг дозы плацебо с использованием теста Даннетта ($p < 0,05$).

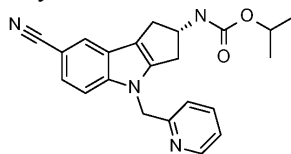
Фиг. 9 иллюстрирует отсутствие каких-либо существенных изменений относительно базового уровня простат-специфического антигена (SPA) по сравнению с плацебо в любой момент времени или при любой дозе соединения примера 1.

Фиг. 10 иллюстрирует снижение уровня тестостерона в сыворотке крови после введения соединения примера 1 у эугонадных здоровых людей-добровольцев. Снижение после обработки более выражено у мужчин с учетом их относительно более высокого уровня тестостерона в сыворотке. Таблица справа отражает оценку воздействия после исследования Ph1a в дозе 5 мг.

Фиг. 11 иллюстрирует положительную связь воздействие-ответ для N-концевого пропептида проколлагена типа 1 (PINP), являющегося биомаркером костного анаболизма, после введения соединения примера 1 эугонадным здоровым людям-добровольцам.

Подробное описание изобретения

Было показано, что соединение изопропилового эфира (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты, альтернативно представленное в виде 1-метилэтилового эфира N-[(2S)-7-циано-1,2,3,4-тетрагидро-4-(2-пиридинилметил)циклопент[b]индол-2-ил]карбаминовой кислоты со структурной формулой I, представляющее собой модулятор AR, увеличивает сухую мышечную массу и уменьшает жировую массу у здоровых добровольцев. Кроме того, у здоровых добровольцев не наблюдали каких-либо существенных изменений гематокрита или простат-специфического антигена (PSA) через 12 недель после обработки изопропиловым эфиром (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты. Кроме того, обработка крыс, перенесших орхидэктомию, изопропиловым эфиром (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты показала отсутствие существенного увеличения массы семенных везикул.



Формула I

Соответственно, в настоящем изобретении предложен способ лечения симптомов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным ADT, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I. В следующем варианте реализации настоящего изобретения, пациент представляет собой пациента с раком предстательной железы. В следующем

варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения потери костной массы, прочности кости, мышечной массы или мышечной силы в результате вторичного гипогонадизма, вызванного АДТ. В другом дополнительном варианте реализации, в настоящем изобретении предложен способ лечения потери либидо и приливов в результате вторичного гипогонадизма, вызванного АДТ.

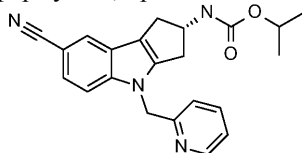
Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в терапии, в частности, для лечения симптомов АДТ у пациентов, нуждающихся в этом. В следующем варианте реализации, пациент представляет собой пациента с раком предстательной железы. Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для лечения симптомов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ. Более того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли при лечении симптомов АДТ у пациентов с раком предстательной железы. В следующем варианте реализации, в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения симптомов АДТ у пациентов с раком предстательной железы. В следующем варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения симптомов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в терапии, в частности, для лечения потери костной массы, прочности кости, мышечной массы или мышечной силы, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ. Более того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли при лечении потери костной массы, прочности кости, мышечной массы или мышечной силы в результате вторичного гипогонадизма, вызванного АДТ. В следующем варианте реализации, в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения потери костной массы, прочности кости, мышечной массы или мышечной силы в результате вторичного гипогонадизма, вызванного АДТ.

Кроме того, в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в терапии, в частности, для лечения потери либидо и для лечения приливов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ. Более того, в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли при лечении потери либидо и приливов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ. В следующем варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения потери либидо и приливов, обусловленных вторичным гипогонадизмом, вызванным АДТ.

Соединение формулы I, представляющее собой модулятор андрогенного рецептора, и способы получения и применения указанных соединений в качестве терапевтических агентов, подходящих для применения при терапевтических показаниях, таких как гипогонадизм, уменьшенная костная масса или плотность и уменьшенная мышечная масса или сила, описаны в заявке US-2010-0069404, опубликованной 18 марта 2010 г., включенной в настоящее описание посредством ссылки. См. также публикацию WO 2008/063867. Соединение формулы I - модулятор андрогенного рецептора (AR) - представляет собой мощный и селективный модулятор андрогенного рецептора.

Более конкретно, в настоящем изобретении предложен способ лечения симптомов АДТ у пациентов с раком предстательной железы, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I, представленного структурно в виде:



или его фармацевтически приемлемой соли.

Используемый в данном описании термин "пациент" относится к человеку.

Используемые в настоящем описании термины "лечение (treating)", "лечить" или "лечение (treatment)", включают торможение, замедление, прекращение, снижение или обращение вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, расстройства, состояния или заболевания.

Используемые в настоящем описании термины "T1-T4" относятся к T категории системы определения стадийности TNM Американского объединенного комитета по вопросам рака (AJCC) для описания того, как распространяется рак. Категория T указывает на наличие опухолей и описывает степень первичной опухоли. Более высокие числа указывают на увеличенный размер, масштаб или степень проникновения. Каждый тип рака имеет специфические особенности для классификации под номером. Для рака предстательной железы T1 указывает на то, что врач не может пальпировать опухоль или увидеть ее с

использованием системы визуализации, такой как трансректальное УЗИ. T2 указывает на то, что врач может пальпировать опухоль с помощью цифрового ректального исследования (DRE) или увидеть ее с помощью системы визуализации, такой как трансректальное УЗИ, но она по-прежнему, по всей видимости, ограничивается предстательной железой. T3 указывает на то, что опухоль начала расти и распространяться за пределы предстательной железы и может распространиться в семенные везикулы. T4 указывает на то, что опухоль выросла в ткани рядом с предстательной железой (кроме семенных везикул), такой как уретральный сфинктер (мышца, которая помогает контролировать мочеиспускание), прямая кишка, мочевого пузыря и/или стенка таза.

Используемый в настоящем описании термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, которое, при введении пациенту, обеспечивает целевой эффект у пациента при диагностике или лечении. При определении эффективного количества для пациента диагностом учитывается ряд факторов, в том числе, но не ограничиваясь ими, размеры пациента, возраст и общее состояние здоровья; конкретное имеющееся заболевание или расстройство; степень наличия или тяжести заболевания или расстройства; ответ индивидуального пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранная схема приема; использование сопутствующего лекарственного средства; и другие соответствующие обстоятельства.

Соединение формулы I и его фармацевтически приемлемые соли, как правило, эффективны в широком диапазоне доз. Например, суточные дозировки индивидуальных агентов обычно находятся в интервале примерно от 1 примерно до 1000 мг/сутки, предпочтительно примерно от 1 примерно до 500 мг/сутки, примерно от 1 примерно до 250 мг/сутки, примерно от 1 примерно до 100 мг/сутки, примерно от 1 примерно до 75 мг/сутки и примерно от 1 примерно до 25 мг/сутки. Наиболее предпочтительно, суточные дозировки индивидуальных агентов обычно находятся в интервале примерно от 1 примерно до 5 мг/сутки. Наиболее предпочтительно, соединение формулы I используют в суточной дозе, выбранной из 1, 5, 25 и 75 мг в сутки.

Соединение формулы I, представляющее собой модулятор андрогенного рецептора, предпочтительно получают в виде фармацевтической композиции, которую вводят любым способом, который делает соединение биологически доступным. Способ введения может варьироваться любым образом, будучи ограниченным физическими свойствами лекарственных средств и удобством для пациента и лица, осуществляющего уход или лечение. Предпочтительно соединение формулы I, представляющее собой модулятор андрогенного рецептора, готовят для перорального или парентерального введения, включая внутривенное или подкожное введение. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Предпочтительно соединение формулы I является свободным основанием.

Способы синтеза и пример

Следующие методы, способы синтеза и примеры дополнительно иллюстрируют изобретение и представляют собой типичный синтез соединения согласно настоящему изобретению. Реагенты и исходные материалы легко доступны или могут быть легко синтезированы обычным специалистом в данной области техники. Следует понимать, что способы синтеза и примеры приведены в качестве иллюстрации, а не ограничения, и что различные модификации могут быть сделаны обычным специалистом в данной области техники. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных путей могут быть объединены различными способами или в сочетании со стадиями из различных процедур для получения соединения формулы I или его солей. Продукты каждой стадии могут быть выделены обычными способами, хорошо известными в данной области, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрацию, растирание и кристаллизацию. Кроме того, все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее.

Если не указано иное, соединения, проиллюстрированные в настоящем описании, могут быть названы и пронумерованы с использованием Accelrys® Draw версии 4.0 (Accelrys, Inc., Сан-Диего, Калифорния), IUPACNAME ACDLABS или ChemDraw® Ultra 12.0. Конфигурация R или S соединения согласно изобретению может быть определена стандартными методами, такими как рентгеноструктурный анализ и корреляция со временем удерживания хиральной ВЭЖХ. Индивидуальные изомеры, энантиомеры и диастереомеры могут быть разделены или отделены обычным специалистом в данной области техники в любой удобный момент в процессе синтеза соединения формулы I методами, такими как методика селективной кристаллизации или хиральной хроматографии (см., например, 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). Обозначения "изомер 1" и "изомер 2" относятся к соединениям, которые элюируются при хиральной хроматографии первым и вторым, соответственно, и, если хиральная хроматография инициируется в начале синтеза, то же самое обозначение применяется для последующих промежуточных соединений и примеров. Кроме того, некоторые промежуточные продукты, описанные в следующих схемах, могут содержать одну или несколько защитных

групп атомов азота. Варьирующиеся защитные группы могут быть одинаковыми или различными в каждом случае в зависимости от конкретных условий реакции и особенностей преобразований, которые будут выполняться. Условия защиты и снятия защиты хорошо известны специалистам в данной области 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).

Реагенты и исходные материалы легко доступны для обычного специалиста в данной области техники. В патенте США № 7968587, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, описан синтез изопропилового эфира (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

Используемые в настоящем описании следующие термины имеют следующие значения: "ADME" относится к абсорбции, распределению, метаболизму и экскреции; "DMAC" относится к N,N-диметилацетамиду; "DMF" относится к диметилформамиду; "ЭКГ" относится к электрокардиографии; "ЭДТА" относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; "Эи" относится к энантиомерному избытку; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу; "HOAc" относится к уксусной кислоте; "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; "ЖХМС" относится к жидкостной хроматографии масс-спектрометрии; "LY" относится к примеру 1; "MeOH" относится к метанолу; "мин" относится к минутам; "МС" относится к масс-спектрометрии; "МТБЭ" относится к трет-бутилметиловому эфиру; "NOAEL" относится к не детектируемому уровню вредных эффектов; "ОРХ" относится к проведенной орхидэктомии; "SE" относится к стандартной ошибке; "TE" относится к тестостерон энантату; "ТФА" относится к трифторуксусной кислоте; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану; и "УФ" относится к ультрафиолету.

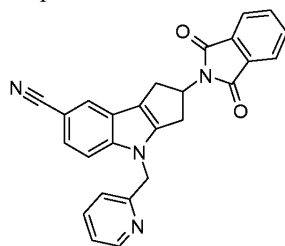
Промежуточное соединение 1.

(±)-2-(1,3-Диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрил.

Смешивали (±)-2-(3-оксоциклопентил)изоиндол-1,3-диона (12,7 г, 55,3 ммоль) и 4-цианофенилгидразина-HCl (8,53 г, 50,3 ммоль) в уксусной кислоте (HOAc) (200 мл) и 4N HCl в диоксане (50 мл). С использованием механического перемешивания нагревали реакционную смесь до 90°C в течение 18 ч, затем добавляли дополнительно 4N HCl в диоксане (20 мл). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 18 часов. Разбавляли реакционную смесь водой (600 мл) и собирали черное твердое вещество путем вакуумной фильтрации. Обрабатывали ультразвуком твердое вещество с MeOH (200 мл), затем собирали и сушили в вакуумной печи с получением 10,94 г (66%) продукта в виде серо-коричневого твердого вещества. МС (m/z): 328 (M+H), 326 (M-H).

Промежуточное соединение 2.

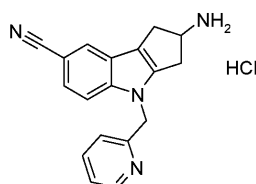
(±)-2-(1,3-Диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрил



Нагревали смесь 2-(1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрила (5 г, 15,3 ммоль) в DMF (25 мл) до 40°C. Добавляли карбонат цезия (10,4 г, 32,4 ммоль) и 2-бромметилпиридин гидробромид (4,05 г, 16 ммоль). Смесь перемешивали при 40°C в течение 24 ч. Добавляли смесь к воде (250 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Отфильтровывали твердые частицы и сушили собранный материал под вакуумом. Добавляли твердое вещество в EtOH (25 мл) и кипятили в течение 30 мин. Смесь охлаждали до 22°C и фильтровали. Сушили твердое вещество в вакууме до постоянной массы с получением 4,8 г (75%) целевого соединения. МС (m/z): 419 (M+H).

Промежуточное соединение 3.

(±)-2-Амино-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрил гидрохлорид



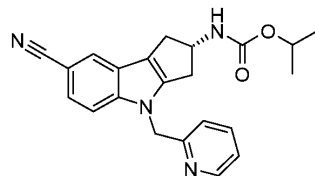
Добавляли

2-(1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-

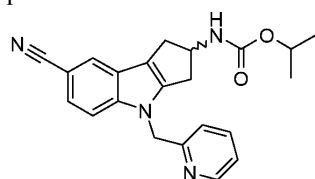
тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрила (77 г, 184 ммоль) в ТГФ (1,3 л) и EtOH (230 мл). Смесь перемешивали в течение 10 мин и затем добавляли моногидрат гидразина (20 мл, 400 ммоль). Смесь перемешивали при 22°C в течение 16 ч. Смесь фильтровали и упаривали маточный раствор. Остаток растворяли в дихлорметане (300 мл). Добавляли раствор 4 М HCl в диоксане (50 мл) и перемешивали смесь в течение 2 ч. Фильтровали и сушили выделенное твердое вещество под вакуумом до постоянной массы с получением 54 г (90%) целевого соединения. МС (m/z): 289 (M+H).

Пример 1.

Изопропиловый эфир (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты



Стадия 1. Изопропиловый эфир (±)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты



К раствору (±)-2-амино-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрила (2,32 г, 8,05 ммоль) и диизопропилэтиламина (9,65 ммоль, 1,68 мл) в дихлорметане (10 мл) добавляли изопропилхлорформиат (8,86 ммоль, 8,9 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Разбавляли этилацетатом и промывали 10% раствором K₂CO₃ (2×). Сушили органическую часть над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением 3,3 г. Очищали с помощью колоночной хроматографии (0-100% этилацетат/дихлорметан) с получением 2,48 г (82%) рацемического продукта. ЖХМС 375.2 (M+H).

Альтернативная процедура.

Добавляли (±)2-амино-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрила (35 г, 108 ммоль) к смеси дихлорметана (350 мл) и пиридина (70 мл). Перемешивали смесь в атмосфере азота и охлаждали до 5°C. Добавляли изопропилхлорформиат (1 М раствор в толуоле, 162 мл, 162 ммоль). Убирали ледяную баню и перемешивали смесь при 22°C. Через 16 ч растворитель упаривали. Добавляли полученный остаток к воде (350 мл) и перемешивали 2 ч. Фильтровали и сушили собранное твердое вещество под вакуумом при 45°C. Добавляли твердое вещество к этилацетату (400 мл) и нагревали смесь до температуры кипения. Затем охлаждали до 22°C и фильтровали твердое вещество. Добавляли влажное твердое вещество к этилацетату (200 мл) и нагревали до кипения в течение 30 мин. Охлаждали смесь до 22°C в течение одного часа и затем охлаждали до 0-5°C в течение 5 мин. Смесь фильтровали и сушили выделенное твердое вещество под вакуумом до постоянной массы с получением 23 г (62%) целевого соединения. МС (m/z): 374 (M+H).

Стадия 2. Изопропиловый эфир (R)- и (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

Разделяли энантимеры соединения примера 1 с помощью препаративной хиральной хроматографии с использованием колонки Chiralpak AD (8×33 см), элюируя с помощью 100% этанола при 375 мл/мин и 250 нм. Изомер 1 (R): 1,14 г, 99,9% ЭИ (аналитические условия: Chiralpak AD-H колонка, элюировали смесью 100% EtOH/0,2% диметилэтиламин; ЖХМС 375,2 (M+H)). Изомер 2 (S): 1,67 г, 99,4% ee; ЖХМС 375,2 (M+H).

Альтернативный путь получения соединения примера 1, Изомер 2: изопропиловый эфир (S)-(7-Циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

Добавляли изопропиловый эфир (S)-7-циано-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (13 г, 41,3 ммоль) к ДМФ (100 мл) и нагревали раствор до 40°C. Добавляли карбонат цезия (42 г, 129 ммоль) одной частью и перемешивали смесь в течение 30 мин при температуре 40°C. Добавляли по частям 2-бромметилпиридина гидробромид (21 г, 83 ммоль) в течение 4 ч. Смесь перемешивали при 40°C в течение 18 ч. Добавляли смесь в охлажденную воду (1 л) при температуре от 0 до 5°C и перемешивали в течение 30 мин. Выделяли твердое вещество путем фильтрации и сушили под вакуумом до постоянной массы. Пропускали материал через слой силикагеля, элюируя смесью CH₂Cl₂/EtOAc (7/3). Объединяли фракции, содержащие продукт, и упаривали растворитель с получением бледно-коричневого твердого вещества. Перекристаллизовывали из этилацетата с получением 15,3 г (77%) целевого соединения. ЖХМС (m/z) 375 (M+H).

Второй альтернативный путь.

(ВЭЖХ условия - колонка: Zorbax® SB-Фенил, быстрое разделение, 4,6×75 мм, 3,5 мкм; растворитель: 10% ацетонитрил/90% вода с 0,05% TFA; УФ при 230 нм).

Стадия 1. трет-Бутиловый эфир (±)-(7-циано-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

Оснащали 3-горлую круглодонную колбу на 12 л верхним перемешиванием, термопарой, капельной воронкой, впускным отверстием для азота и охлаждающей баней. Загружали в колбу (±)-2-(1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрил (500 г, 1,53 моль) и ТГФ (5 л). Перемешивали полученную суспензию при температуре окружающей среды. Добавляли моногидрат гидразина (185,6 мл, 3,82 моль) в медленном потоке из капельной воронки в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи (примерно 18 ч). Добавляли холодную воду в баню и загружали капельную воронку ди-трет-бутилбутилдикарбонатом (875,1 г, 4,01 моль; предварительно расплавленным до жидкого состояния). Добавляли к реакционной смеси в течение 2 ч, поддерживая температуру бани ниже 30°C. Через 15 мин анализировали с помощью ВЭЖХ, чтобы выявить полное расхождение промежуточного амина. Реакционную смесь фильтровали через полипропиленовую набивку в настольном фильтре с корпусом из нержавеющей стали и промывали полученный фильтрат этилацетатом (2×1 л). Фильтрат концентрировали в вакууме для удаления большей части ТГФ. Очищали полученную смесь (примерно 1 л) над пробкой из силикагеля (4 кг Kieselgel-60), элюируя этилацетатом. Концентрировали извлеченный элюент в вакууме до темного масла. Добавляли гептан (2 л) и этилацетат (350 мл) и осаждали содержимое на роторном испарителе при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Добавляли лед в баню и осаждали полученную суспензию при 5°C в течение еще 2 ч. Фильтровали твердые вещества, промывали смесью 90/10 гептан/этилацетат (2×500 мл) и сушили под вакуумом при 35°C. Получали целевое соединение в виде светло-коричневого твердого вещества с выходом 91,6%.

Стадия 2. трет-Бутиловый эфир (±)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

Оснащали колбу на 20 л нижним выходным отверстием с верхним перемешиванием, термопарой и входным отверстием для азота. Загружали в колбу трет-бутиловый эфир (±)-(7-циано-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (500 г, 1,68 моль) и дихлорметан (5 л). Начинали перемешивание и добавляли гидросульфат тетра-н-бутиламмония (58,9 г, 0,168 моль) с последующим добавлением гидробромида 2-(бромметил)пиридина (510,4 г, 2,02 моль). Добавляли деионизированную воду (2 л) с последующим добавлением 50%-ного раствора NaOH (445,3 мл, 8,41 моль). Полученную смесь энергично перемешивали в течение ночи (примерно 21 ч). Останавливали перемешивание, позволяли слоям разделиться и отбрасывали водный (верхний) слой. Промывали органический слой с помощью деионизированной воды (3×4 л), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме до примерно 500 мл. Очищали сырой материал через слой силикагеля (7 кг Kieselgel 60) с использованием в качестве элюента смесь 1:1 этилацетат/гептан. Концентрировали элюент в вакууме с получением 560 г целевого соединения в виде желтоватого твердого вещества (81,4%).

Стадия 3. Изомер 1, (R)- и изомер 2 (S)-трет-бутилового эфира (7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты.

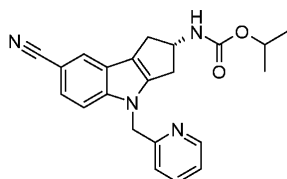
Использовали следующий аналитический метод хиральной ВЭЖХ для анализа энантиомеров: колонка 4,6×150 мм Chiralpak AD-H (Chiral Technologies), подвижная фаза 20:80:0,2 ацетонитрил/денатурированный этанол класса 3A/диметилэтиламин, скорость потока 0,6 мл/мин, УФ-детектирование при 255 нм. Энантиомер 1 элюировали на 4 мин., и энантиомер 2 элюировали на 5,2 мин. 8% примесей (255 нм) элюировали на 3,6 мин. Очищали трет-бутиловый эфир (±)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (528 г) с помощью препаративной хиральной ВЭЖХ с использованием следующих условий: колонка 8×33 см Chiralpak AD, такая же подвижная фаза как аналитическая, скорость потока 375 мл/мин, УФ-детектирование при 270 нм. Расворяли 108 г образца в подвижной фазе при конечной концентрации 75 мг/мл. Загружали 4 г/на инъекцию с элюированием фракции энантиомера 1 в интервале 3,5-5,5 мин и энантиомера 2 в интервале 6-10 мин. Устанавливали конечное время прогона на 7,5 мин/на инъекцию с частичной укладкой профиля элюирования энантиомер 2 сразу после каждой инъекции для уменьшения потребления растворителя. Очищали оставшиеся 420 г через пробку из силикагеля с использованием Merck 9385 60 ангстрем 230-400 меш силикагеля, элюируя смесью системы растворителей 1:2:7 дихлорметан/гептан/метил-трет-бутиловый эфир. Использовали 3,5 кг слоя силикагеля с вакуумной фильтрацией при 140 г образца/на пробку. Рацемат начинал появляться после 5 объемов колонки. Использовали 100% метил-трет-бутиловый эфир с последующим добавлением 100% ацетона, чтобы протолкнуть оставшийся рацемат из пробки. Таким образом получали в сумме 358,5 г 98 +% чистого рацемата. Разделяли этот материал, как описано выше, с помощью препаративной хиральной ВЭЖХ. Получали 208,8 г (99,9% эи) энантиомера 1 (R - изомер) и 197 г (99,6%) энантиомера 2 (изомера S).

Стадия 4. Гидрохлорид (S)-2-амино-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-

7-карбонитрила.

Оснащали 3-горлую круглодонную колбу на 3 л нагревательной рубашкой, воздушной мешалкой, датчиком температуры, отверстием для выпуска азота и капельной воронкой. Загружали в колбу трет-бутиловый эфир (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (85,0 г, 0,22 моль) и этанол (850 мл). Добавляли одной частью концентрированную HCl (180 мл, 2,20 моль). Нагревали полученный раствор до 45- 50°C и перемешивали в течение 90 мин, после чего анализировали с помощью ВЭЖХ, чтобы выявить полное расходование исходного материала. Переносили смесь в колбу Buchi, разбавляли деионизированной водой (595 мл) и концентрировали в вакууме для удаления этанола. Добавляли EtOAc двумя частями (2×170 мл) и повторно отгоняли, чтобы удалить как EtOAc, так и остаточный этанол. Переносили водный концентрат в реакционную колбу объемом 5 л и охлаждали до 10-15°C. Поддерживая температуру реакционной смеси на уровне <30°C, доводили pH раствора до 11-12 путем капельного добавления 5 М NaOH (950 мл). Экстрагировали полученную смесь с помощью CH₂Cl₂ (1300 мл, 800 мл). Промывали объединенные CH₂Cl₂-экстракты деионизированной водой (500 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением целевого соединения в виде светло-зеленого твердого вещества (65,0 г, 103%).

Стадия 5. Изопропиловый эфир (S)-(7-циано-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты

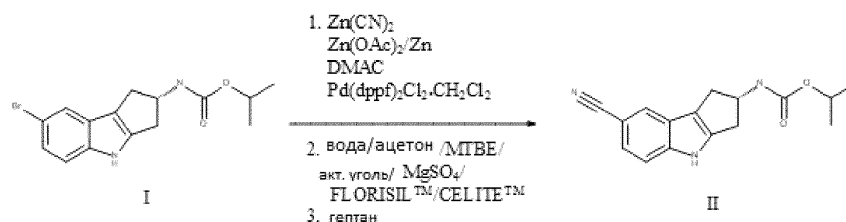


Оснащали реакционную колбу на 2 л охлаждающей баней, воздушной мешалкой, датчиком температуры и капельной воронкой. Загружали в колбу гидрохлорид (S)-2-амино-4-пиридин-2-ил-метил-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-7-карбонитрила (62,8 г, 0,218 моль), ДМФ (188 мл) и триэтиламин (33,4 мл, 0,240 моль). Охлаждали полученный раствор до 0°C, используя ледяную/ацетоновую баню. Поддерживая температуру на уровне <10°C, добавляли изопропилхлорформиат (218 мл, 0,218 моль, 1 М и толуоле) по каплям через капельную воронку. После завершения добавления удаляли охлаждающую баню и позволяли смеси нагреться до температуры окружающей среды. Через 1 ч анализировали с помощью ВЭЖХ, чтобы выявить завершение реакции, и приливали смесь в раствор деионизированной воды (1256 мл) и EtOAc (1884 мл). Разделяли слои, фильтровали органический слой и повторно промывали смесью вода/солевой раствор 1:1, затем сушили над Na₂SO₄. Концентрировали в вакууме при 55°C до примерно 15 объемов и позволяли полученному продукту охладиться до температуры окружающей среды с получением белого осадка. Добавляли гептан (628 мл) и перемешивали в течение 20 мин. Смесь снова концентрировали примерно до 15 объемов. Фильтровали твердые вещества, промывали гептаном и сушили с получением целевого соединения в виде рыхлого белого твердого вещества (68,9 г, 84,5%).

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆), δ 8,49 (дд, 1H), 7,86 (д, 1H, J=1,5), 7,71-7,75 (м, 1H), 7,60 (д, 1H, J=9,0), 7,57 (д, 1H, J= 9,0), 7,36 (дд, 1H), 7,28-7,26 (м, 1H), 7,14 (д, 1H, J=7,5), 5,44 (с, 2H), 4,79-4,72 (м, 1H), 4,71-4,66 (м, 1H), 3,22-3,20 (м, 1H), 3,16-3,12 (м, 1H), 2,73-2,66 (м, 2H), 1,16 (дд, 6H).

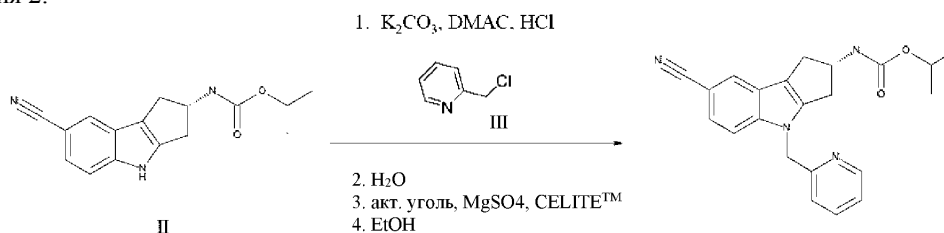
3-й альтернативный синтез.

Стадия 1.



Обрабатывали изопропиловый эфир (7-бром-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (I) с помощью Zn(CN)₂, Zn(OAc)₂, Zn, и Pd(dppf)₂Cl₂·CH₂Cl₂ в DMAC с получением изопропилового эфира (7-циано-1,2,3,4-тетрагидроциклопента[b]индол-2-ил)карбаминовой кислоты (II). Добавляли воду для осаждения соединения технического класса II. Повторно растворяли промежуточное соединение II в смеси МТБЭ и ацетона и фильтровали полученную суспензию для удаления неорганических компонентов. Обрабатывали фильтрат, содержащий II с древесным углем, MgSO₄, и FLORISIL™ перед выделением II в виде кристаллического твердого вещества после кристаллизации из гептана.

Стадия 2.



Проводили реакцию промежуточного соединения II с 2-пиколилхлоридом гидрохлоридом (III) и K_2CO_3 в DMAC с получением соединения примера 1 технического класса. Выделяли соединение примера 1 технического класса путем добавления воды и фильтрации. Перекристаллизовывали три раза из EtOH с получением соединения примера 1.

Анализы, *in vivo* исследования и клинические исследования.

Анализ крыс, перенесших орхидэктомию.

Использовали всего 86 девственных самцов крыс линии Спрег-Доули (крыс SD) (Sprague-Dawley) (Harlan Sprague Dawley Inc.). 14 крыс были ложноперирированными (ЛО) и 72 крысы были кастрированы в возрасте 6 месяцев (Орх). Крыс держали на 12-часовом цикле свет/темнота при $22^\circ C$ со свободным доступом к пище (TD 89222 с 0,5% Ca и 0,4% P, Teklad, Madison, WI) и воде. Орх-крысам отводили 2 месяца на потерю костной массы, их взвешивали и рандомизировали на группы обработки, как подробно описано в табл. 1 ниже. Животных групп 1 и 2 умерщвляли в первый день в качестве исходного контроля, группам 3 и 4, контроль ЛО и Орх, вводили носитель (0,25% СМС/Twin80). Группа 5 получала РТН (1-38) подкожно в виде инъекции. Группам 6-13 вводили перорально SARMs через желудочный зонд. Все обработки осуществляли один раз в день в течение 2-х месяцев.

Таблица 1

Группа No	Группа обработки	8 месяц День 0	10 месяц День 60	Путь доставки
1	ЛО		7	Перорально
2	Орх		6	Перорально
3	Пре-ЛО		7	Перорально
4	Пре-Орх		7	Перорально
5	Орх + РТН (10 мкг/кг/сут)		6	Подкожно
6	Орх + Пример 1 (1 мг/кг/сут)		6	Перорально
7	Орх + Пример 1 (3 мг/кг/сут)		7	Перорально
8	Орх + Пример 1 (10 мг/кг/сут)		7	Перорально
9	Орх + Пример 1 (20 мг/кг/сут)		7	Перорально

Для динамической гистоморфометрии все крысы, за исключением базовых линий, получали ксиленовый оранжевый 90 мг/кг подкожно в первый день начала обработок. Все крысы получали кальцеин 10 мг/кг подкожно в дни 14, 13 и в дни 4, 3 до умерщвления.

Подготовка образцов.

РТН (1-38) (Zeneca (Cambridge Research Biochemicals) Ссылка # - DG-12-14071, партия 14071): подкисленный солевой носитель с 2% инактивированной крысиной сывороткой.

Пример 1: 1% СМС/ 0,25% Tween 80 0,5 мл на крысу на основе массы тела.

Ожидаемый результат и измеряемые параметры.

1. Масса тела: перед введением и два раза в неделю, объем дозирования корректировали соответствующим образом.

2. ЯМР: в начале и в конце исследования.

3. Мышцы: влажные массы получали из левой икроножной, четырехглавой мышцы, камбаловидной, леватора, семенных везикул (СВ), предстательной железы и сердца, затем собирали для анализа РНК или гистологии.

4. Забор конечных образцов сыворотки проводили у всех животных и хранили при $-80^\circ C$ в 1×100 мкл (OCN), 2×150 (IGF-1 и хранение), 1×300 мкл (Chem 18), 2×500 мкл (один для BSALP, и для хранения).

5. Забор костной массы: Одну бедренную кость и поясничный позвонок фиксировали (в смеси этанол/физиологический раствор 50:50) для КТ и биомеханических испытаний; Одну большую берцовую кость брали для анализа на PALP/кальцеин с удаленным эпифизом (в 70% этаноле), другую большеберцовую кость брали для гистоморфометрических анализов (70% этанол).

6. Определение фармакокинетики (ФК): За несколько дней до записи результатов у 3 крыс в каждой группе дозирования (n=3, вводили только тестируемый препарат) проводили забор крови из хвостовой вены с получением приблизительно 0,2 мл крови в пробирки с ЭДТА в следующие моменты времени:

0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч. Образцы переносили в ADME для анализа концентрации в плазме.

Таблица 2

Группа No	Группа обработки	Масса семенных везикул (СВ), % ЛО
2	Орх	5,7
5	Орх + РТН (10 мкг/кг/сутки)	5,6
6	Орх + Пример 1 (1 мг/кг/сутки)	5,6
7	Орх + Пример 1 (3 мг/кг/сутки)	5,5
8	Орх + Пример 1 (10 мг/кг/сутки)	6,0
9	Орх + Пример 1 (20 мг/кг/сутки)	6,1

В соответствии с протоколом по существу описанным выше соединение примера 1 не приводило к сколько-нибудь значимому возрастанию массы семенных везикул после 8-недельной обработки у крысы, перенесшей орхидэктомия 8 недель назад, которая была сверхчувствительна к любой андрогенной стимуляции.

Таблица 3

Группа No	Группа обработки	LV-ТВМС (мг) ±SD (стандартное отклонение)	LV-ТВМД (мг/см ³) ±SD	LV-ТА (см ²) ±SD
1	ЛО	1,7871 ± 0,0509	574,471 ± 13,385	0,3463 ± 9,71E-03
2	Орх	1,5814 ± 0,0521	508,314 ± 13,037	0,3456 ± 7,61E-03
3	Орх + Пример 1 (1 мг/кг/сутки)	1,54 ± 0,0256	507,4 ± 6,931	0,3378 ± 7,08E-03
4	Орх + Пример 1 (3 мг/кг/сутки)	1,79 ± 0,095	549 ± 15,965	0,362 ± 0,0138
5	Орх + Пример 1 (10 мг/кг/сутки)	1,7757 ± 0,0607	562,843 ± 16,104	0,3521 ± 0,0125
6	Орх + Пример 1 (20 мг/кг/сутки)	1,6943 ± 0,0264	529,357 ± 10,052	0,3563 ± 0,0102

SD - стандартное отклонение.

Обработка с помощью соединения примера 1 приводила к значительному возрастанию минеральной плотности костной ткани поясничного позвонка трабекулярной кости (LV-ТВМД) и продемонстрировала тенденцию к увеличению содержания минералов поясничного позвонка трабекулярной кости (LV-ТВМС) и площади поперечного сечения (LV-ТА) после 8-недельной обработки у крысы, с орхидэктомией, проведенной 8 недель назад, как показано на фиг. 2 и в табл. 3.

In vivo исследование для изучения прямого антагонистического эффекта соединения примера 1 в присутствии ТЕ.

Всего использовали 36 ОРХ и 6 ложнопериорированных самцов крыс линии Wistar (перенесших орхидэктомию в возрасте 8 недель и которые могли погибнуть в течение 4 недель). Крыс держали на 12ч цикле свет/темнота при 22°C со свободным доступом к пище (TD 5001 с 0,95% Са и 0,67% Р, Teklad, Madison, WI) и к воде. Крыс повторно рандомизировали и помещали в группы обработки (n=6) в зависимости от массы тела. Путь введения для всех групп, кроме ТЕ, был пероральным. ТЕ вводили подкожно. В конце 8 недели ежедневного введения крыс умерщвляли, взвешивали и проводили забор ткани. У каждого животного проводили забор леватора, предстательной железы и семенных везикул. Результаты представлены как среднее значение ± SE (стандартная ошибка).

Таблица 4

Группа No	Группа обработки	3 месяц День 0	5 месяц День 60	Путь доставки, Пр. 1	Путь доставки, ТЕ
1	ЛО		6	перорально	подкожно
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки		6	перорально	подкожно
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки		6	перорально	подкожно
4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки		6	перорально	подкожно
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки		6	перорально	подкожно

Комбинация тестостерон энантата (1 мг/кг/сутки) с различными дозами соединения примера 1 позволяет предположить наличие тенденции к уменьшению влажной массы семенных везикул в мг, нормализованной по отношению к массе тела в граммах, которое индуцируется только с помощью ТЕ, как показано на фиг. 3 и в табл. 4.

Сравнения средних значений влажной массы семенных везикул.

Сравнения с контролем с использованием метода Даннетта.

Контрольная группа = d-ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сут.

d	Альфа
2,69715	0,05

Таблица 5

Группа No	Группа	Абс(Разл.)- LSD	p-значение
1	ЛО	0,979	<,0001
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки	-0,52	1,0000
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки	-0,34	0,8628
4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,078	0,0187
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки	0,536	<,0001
6	ОРХ + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	1,411	<,0001
7	ОРХ, Носитель	1,422	<,0001

LSD - минимальное значимое различие.

Термин "p-значение" используют для указания вероятности, которую рассчитывают после указанного исследования.

Положительные значения показывают пары средних значений, которые значительно различаются.

Совместная обработка соединением примера 1 крыс SD вместе с 1 мг/кг ТЕ приводила к дозозависимому уменьшению влажной массы предстательной железы в миллиграммах, нормализованной по отношению к массе тела в граммах, как показано на фиг. 4 и в табл. 5.

Сравнения средних значений массы предстательной железы.

Сравнения с контролем с использованием метода Даннетта.

Контрольная группа = d-ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сут.

d	Альфа
2,69715	0,05

Таблица 6

Группа No	Группа	Абс(Разл)-LSD	p-значение
1	ЛО	0,509	<,0001*
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки	-0,15	1,0000
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки	-0,11	0,9774

d) Альфа

4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки	0,025	0,0167*
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,036	0,0099*
6	ОРХ, Носитель	0,356	<,0001*
7	ОРХ + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,357	<,0001*

Положительные значения показывают пары средних значений, которые значительно отличаются от группы введения только ТЕ.

Таблица 7

Группа No	Группа обработки	Масса СВ, % ЛО	Масса предстательной железы, % ЛО (ложная операция)
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки	58,5	45,5
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки	53,5	42,7
4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	42,0	30,3
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки	29,2	31,2

Таблица 8

	hAR Ki (нМ)	LnCAP Экспрессия гена EC50 (нМ)		
		PSA	AR	CLUSTERIN
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Пример 1	1,95	2,64	1,64	>100

CLUSTERTN - многофункциональный белок.

Сравнения соединения примера 1 с синтетическим тестостероном, R1881, демонстрируют, что *in vitro* при использовании человеческих клеток рака предстательной железы соединение примера 1 менее андрогенно, чем R1881. Напротив, биохимическая аффинность связывания с человеческим андрогенным рецептором (Ki в нМ) лишь незначительно уменьшается.

Четырехнедельное исследование токсичности на крысах при пероральном введении.

Это исследование проводили для оценки потенциальной токсичности и токсикокинетических характеристик соединения примера 1 на крысах через 4 недели воздействия. Трём группам обработки из 10 самцов и 10 самок крыс CD® [CrI:CD®(SD)] вводили тестируемый препарат с соответствующим уровнем дозы, составляющим 15, 150 и 1500 мг/кг/сутки. Ещё одна группа из 10 животных/на каждый пол служила в качестве контроля и получала носитель, 5% витамин Е TPGS, 1% гидроксипропилцеллюлозу, 0,05% антиспениватель Dow Corning 1510-US в воде, очищенной обратным осмосом. Тестируемый препарат или носитель вводили всем группам через желудочный зонд один раз в день в течение 28 последовательных дней при объёме дозы 15 мл/кг. Кроме того, три группы из 18 животных/на пол/на группу служили в качестве токсикокинетических (ТК) животных и получали тестируемый препарат таким же образом и в таком же объёме дозы, как основные исследуемые группы с соответствующим уровнем дозы 15, 150 и 1500 мг/кг/сутки. Ещё одна группа из трёх животных/на пол служила в качестве токсикокинетического контроля и получала носитель таким же образом и в том же объёме дозы, как и группы, подвергнутые обработке.

Наблюдения за заболеваемостью, смертностью, повреждениями, а также за наличием пищи и воды проводили два раза в день для всех животных. Наблюдения за клиническими признаками проводили

еженедельно только для животных основного исследования. Массу тела измеряли и регистрировали еженедельно для всех видов животных и потребление пищи измеряли и записывали еженедельно для животных основного исследования. Офтальмоскопию проводили перед тестом всем животным и перед конечной аутопсией только животным основного исследования. Во время аутопсии проводили забор образцов крови для клинической оценки патологии у всех животных основного исследования. Забор образцов мочи проводили в последний день введения. Забор образцов крови для определения плазменной концентрации тестируемого препарата проводили у ТК-животных в определенные моменты времени в 1-й и 28-й день. После конечного забора крови ТК животных умерщвляли, и тушки исключали из дальнейшей оценки. Забор образцов печени для анализа индукции печеночных ферментов проводили при конечной аутопсии у животных основного исследования. По окончании исследования проводили оценку аутопсии, регистрировали массу органа и проводили оценку ткани предстательной железы и семенных везикул с помощью микроскопии. Дополнительное микроскопическое исследование осуществляли на левом яичке у первых пяти самцов крыс/на группу при аутопсии. Яичники, матка с шейкой матки, влагалище и молочные железы самок определяли как органы-мишени.

Следуя протоколу, по существу описанному выше, системное действие ($AUC_{0-24 ч}$) сильно варьировалось и увеличивалось у самок менее дозозависимым образом, чем наблюдали у самцов. Отсутствовали какие-либо доказательства индукции печеночного микросомального фермента после 28 дней дозирования.

Внеплановых случаев смерти во время исследования не происходило, и клинических признаков, связанных с тестируемым препаратом, не было выявлено. Масса тела и потребление пищи было выше среди самок, получавших ≥ 150 мг/кг/сутки, по сравнению с контрольной группой. Эти эффекты не влияли на общее состояние здоровья животных и не считаются неблагоприятными. У самцов не наблюдали никакого влияния массы тела или потребления пищи.

Не было обнаружено влияния, связанного с тестируемым препаратом, на параметры гематологии, коагуляции или анализа мочи у обоих полов, и никакого влияния, связанного с тестируемым препаратом, на клинические химические параметры у самцов. Влияние, связанное с тестируемым препаратом, на клинические химические параметры у самок были ограничены увеличением щелочной фосфатазы в дозах 150 и 1500 мг/кг/сутки (1,33- и 1,45-кратное увеличение, соответственно), уменьшением суммарного белка в дозах 150 и 1500 мг/кг/сутки (9% и 10% уменьшение, соответственно), уменьшением альбумина в дозах 150 и 1500 мг/кг/сутки (12% уменьшение в обеих дозировках) и уменьшением глобулинов только при 1500 мг/кг/сутки (11% уменьшение по сравнению с контролем). Эти изменения имеют минимальное значение и не считаются неблагоприятными.

Не наблюдали никаких связанных с тестируемым препаратом макроскопических изменений или изменений массы органов у обоих полов и никаких связанных с тестируемым препаратом микроскопических изменений у самцов. Связанные с тестируемым препаратом микроскопические изменения присутствовали у самок в молочной железе и яичниках при дозах ≥ 15 мг/кг/сутки, а в матке (с шейкой матки) и влагалище при дозах ≥ 150 мг/кг/сут. Эти микроскопические изменения, которые согласуются с дозозависимой пролонгацией репродуктивного цикла у самок крыс при дозах ≥ 150 мг/кг/сутки, считаются связанными с фармакологией тестируемого препарата и не считаются неблагоприятными.

На основании результатов, изложенных выше, считается, что NOAEL для этого исследования составляет 1500 мг/кг/сутки, самая высокая доза введения. Среднее установившееся системное воздействие ($AUC_{0-24 ч}$) в дозе NOAEL 1500 мг/кг/сутки составило 102337 нг·ч/мл у самцов и 216853 нг·ч/мл у самок.

Шестимесячное исследование токсичности на крысах при пероральном введении.

Целью данного исследования было изучение токсичности и определение токсикокинетики соединения примера 1 на крысах линии Sprague-Dawley после ежедневного перорального введения через зонд в течение 26 недель, и оценка обратимости каких-либо выводов после 12-недельного восстановительного периода. Обработанные животные получали соединение примера 1 в растворе 5% витамина E TPGS, 1% гидроксипропилцеллюлозы, 0,05% антивспениватель Dow Corning 1510-US в очищенной воде, перорально через зонд в суточных дозах 15, 150 или 1500 мг/кг/сут. Контроль растворителем (15 крыс/на каждый пол в основном исследовании и 5 крыс/на каждый пол в исследовании на чувствительность) проводили ежедневно перорально через зонд в дозе 5% витамина E TPGS, 1% гидроксипропилцеллюлозы, 0,05% Dow Corning антивспениватель 1510-US в очищенной воде. Пятнадцать самцов и 15 самок включали в состав группы основного исследования для каждой обработки. Пять самцов и 5 самок были включены в состав для исследования на чувствительность для группы контроля растворителем и получали 150 мг/кг/сутки. Дополнительные вспомогательные группы по 6 крыс/на пол для группы контроля растворителем и 12 крыс/на пол для групп обработки соединением примера 1 повторно оценивали на предмет токсикокинетики. Все введения проводили в дозе 15 мл/кг.

После ежедневного перорального введения через желудочный зонд воздействие соединением примера 1 сильно варьировалось при всех дозах, хотя не перекрывающиеся средние значения AUC (0-24 ч) наблюдали как у самцов, так и у самок в интервале между самыми низкими и самыми высокими дозами, особенно на 91 и 182 день. Как правило, воздействие однократной дозы и многократных доз (C_{max} и AUC

(0-24 ч)) увеличивалось менее чем пропорционально от 15 до 1500 мг/кг/сутки как для самцов, так и для самок. Самки во все дни демонстрировали более высокую подверженность воздействию, чем самцы. На 1-й день самки подвергались воздействию до 7 раз сильнее, чем самцы, но эта разница уменьшалась до 1-3 раз после 182 дня. После многократных доз не наблюдали накопления соединения примера 1 до 182 дня для группы любой дозы.

В соответствии с протоколом, по существу, как описано выше, в ходе исследования не было случаев гибели, приписываемых введению соединения примера 1. Не наблюдали никаких связанных с соединением примера 1 эффектов в отношении параметров офтальмологии или параметров анализа мочи.

Связанные с соединением примера 1 клинические признаки были отмечены в дозозависимой манере у подвергнутых обработке самок и состояли из увеличения случаев проявления маслянистого меха и снижения случаев тонкого покрова меха. В течение первых 6 недель восстановительного периода маслянистый мех был также отмечен у самок, ранее подвергнутых обработке с помощью 150 мг/кг /сутки, но больше не присутствовал у этих животных во второй половине 12-недельного периода восстановления. Не было разницы в частоте случаев тонкого покрова меха у подвергнутых обработке и у контрольных самок в конце периода восстановления.

У самцов, подвергнутых обработке соединением примера 1, наблюдали снижение массы тела при всех уровнях дозы, достигая -12% по сравнению с контрольными самцами в конце периода обработки. У самок наблюдали противоположную тенденцию - подвергнутые обработке самки достигали массы тела на 22% выше, чем масса тела сопутствующих контрольных особей в конце периода обработки. Изменения отмечали только в конце периода восстановления у самцов, но не у самок.

Подвергнутые обработке самцы демонстрировали более низкое потребление пищи, а подвергнутые обработке самки в целом демонстрировали более высокий уровень потребления пищи по сравнению с контролями на протяжении всего исследования, коррелируя с эффектами, связанными с обработкой, в отношении массы тела. Потребление пищи для подвергнутых обработке самцов оставалось ниже, чем у контролей в течение периода восстановления, но величина разницы стала незначительной в конце 12-недельного периода. Не было обнаружено различия в потреблении пищи у подвергнутых обработке самок по сравнению с контролями в течение периода восстановления.

Введение соединения примера 1 при дозах ≥ 150 мг/кг/сутки было связано с увеличением числа нейтрофилов, абсолютного количества ретикулоцитов, щелочной фосфатазы, калия и со снижением глобулинов у самок. У самцов наблюдали увеличение аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы и суммарного билирубина при 1500 мг/кг/сутки. Минимальное уменьшенное количество суммарного белка и альбумина наблюдали у самок при всех уровнях дозы. После 12-недельного восстановительного периода не было обнаружено различий в гематологии, клинической биохимии и параметрах анализа мочи у крыс, получавших 150 мг/кг/сутки, что указывает на обратимость этих результатов.

Полученные результаты, связанные с обработкой соединением примера 1, в основном были связаны с мужскими и женскими репродуктивными тканями и в целом были отнесены к фармакологии молекулы. Неблагоприятные результаты были ограничены яичками и имели место во всех группах, подвергнутых обработке соединением примера 1. Наблюдали уменьшение массы яичек и придатков при 1500 мг/кг /сутки, а у индивидуальных самцов, получавших 15 или 150 мг/кг/сутки, наблюдали тестикулярные поражения. Макроскопические результаты в мужских репродуктивных тканях, связанные с введением соединения примера 1, наблюдали в яичках и придатках. Мягкие и/или небольшие яички и небольшие придатки наблюдали у самцов, получавших ≥ 50 мг/кг /сутки, и у одного самца, получавшего 15 мг/кг/сутки. Результаты микроскопического исследования в яичках, которые наблюдали при всех уровнях дозы, имели дегенеративный характер и включали истощение растягивающихся сперматид, атрофию интерстициальных клеток и, в одном случае, некроз клеток сперматоцитов. Тестикулярные результаты согласовывались с уменьшением циркулирующего лютеинизирующего гормона (ЛН), приводя к снижению передачи сигналов ЛН на уровне интерстициальных клеток. Кроме того, снижение уровня циркулирующего ЛН приводило к снижению секреции тестостерона яичками, тем самым снижая передачу сигналов через андрогены на уровне семенных канальцев. Обработка соединением примера 1 также была связана со снижением массы предстательной железы у самцов, получавших ≥ 150 мг/кг/сут. Эти репродуктивные и эндокринные изменения у самцов могут быть связаны с фармакологической активностью соединения примера 1, но ранее не идентифицировались в 4-недельном исследовании. Не смотря на согласованность с фармакологией, связанной с соединением примера 1, морфологические результаты в яичках, наблюдаемые при всех уровнях доз, на основе своей величины считались неблагоприятными. Воздействие на мужские репродуктивные ткани и на ЛН и тестостерон становилось обратимым к концу 12-недельного периода восстановления.

Введение соединения примера 1 было связано со снижением массы яичников и макроскопически малыми яичниками у самок при всех уровнях дозы. Снижение гипофизарной массы и уровня циркулирующего ЛН наблюдали у самок, получавших ≥ 150 мг/кг/сут. Микроскопические результаты наблюдали в женских репродуктивных тканях, связанные с введением соединения примера 1. Микроскопические

результаты в матке и влагалище наблюдали при уровне дозы ≥ 150 мг/кг /сутки, в то время как результаты в яичниках и молочной железе наблюдали при всех уровнях дозы. Микроскопические результаты, наблюдаемые в женских репродуктивных тканях, и снижение уровня циркулирующего ЛН вероятно связаны с фармакологической активностью соединения примера 1. Результаты в женских репродуктивных тканях, в том числе в молочной железе, согласовывались с теми, о которых ранее сообщалось в 4-недельном исследовании токсичности повторных доз. Женские репродуктивные изменения, вероятно, влияли на репродуктивную способность, но не на общее состояние здоровья животных. Воздействие на женские репродуктивные ткани и ЛН становились обратимыми к концу 12-недельного периода восстановления.

Введение соединения примера 1 было связано со снижением массы тимуса у самок при всех уровнях дозы, а у самцов, получавших ≥ 150 мг/кг/сут. Макроскопические результаты в виде малого тимуса наблюдали у самцов, получавших 1500 мг/кг/сут. Наблюдали дополнительные микроскопические результаты, связанные с введением соединения примера 1, в печени, селезенке, тимусе (самцы) и коже (самки) при дозах ≥ 150 мг/кг/сут. Микроскопические результаты в коже наблюдали при всех уровнях дозы. Все эти изменения отсутствовали в конце 12-недельного периода восстановления. Не наблюдали никаких других микроскопических результатов, изменений массы органов и макроскопических результатов, связанных с введением соединения примера 1.

В заключение, введение соединения примера 1 путем ежедневного перорального введения через зонд в дозах 0, 15, 150 и 1500 мг/кг/сутки в течение 26 недель было связано с морфологическими и гормональными изменениями в мужских и женских репродуктивных тканях, которые в целом были отнесены к фармакологии молекулы, и становились обратимыми через 12 недель у животных, ранее получавших 150 мг/кг /сутки. Неблагоприятные результаты были ограничены яичками и имели место во всех группах, подвергнутых обработке соединением примера 1. На основании величины этих дегенеративных изменений яичников в данном исследовании не смогли установить никакого наблюдаемого уровня вредного воздействия (NOAEL), и поэтому считали, что он составляет <15 мг/кг/сут.

Фертильность самцов и токсикокинетическое исследование на крысах.

Целью данного исследования является определение потенциальных неблагоприятных эффектов в репродуктивном процессе, обусловленных обработкой самцов крыс до и во время периода спаривания. Оно включает идентификацию функциональных репродуктивных эффектов у самцов. Кроме того, проводили токсикокинетическую оценку уровня в плазме соединения примера 1 у вспомогательных животных.

Соединение примера 1 вводили перорально с помощью желудочного зонда в дозах 0, 3, 30 и 1000 мг/кг. Самцов крыс (20/на группу) подвергали обработке ежедневно в течение 10 недель до спаривания, в течение всего 3-недельного периода спаривания и продолжали до дня умерщвления (суммарно от 100 до 101 доз). Самок крыс не подвергали обработке. Всех животных наблюдали два раза в день на предмет агонального состояния и смертности. Клинические наблюдения регистрировали ежедневно для самцов крыс; массу тела и потребление пищи регистрировали для самцов два раза в неделю. Всех самцов умерщвляли через 1 день после последнего введения дозы. Сперматогенные конечные оценки, проведенные на всех самцах, включали моторику и морфологию и концентрацию эпидидимальной спермы. Яички, придатки, предстательную железу и семенные везикулы/свёртывающую железу/жидкость от всех самцов взвешивали и сохраняли. Яички, придатки, предстательную железу и семенные везикулы, и свёртывающую железу из выживших самцов исследовали под микроскопом. Лапарогистерэктомию осуществляли на 15 гестационный день для каждой самки с признаками спаривания. Еще 3, 18, 18 и 18 самцов, у которых определяли токсикокинетические фазы, получали соединение в дозах 0, 3, 30 и 1000 мг/кг, соответственно, и проводили забор образцов для токсикокинетических оценок через соответствующие промежутки времени после введения дозы на 0 и 70 дни исследования.

После ежедневного перорального введения соединения примера 1, время до C_{\max} составляло от 2 до 8 ч в день 0 и от 0,5 до 2 ч в день 70. Средние воздействия (измеренные с помощью AUC₀₋₂₄ ч) увеличивали от 3 до 30 мг/кг приблизительно в 7,8 раза и в 4,5 раза в день 0 и 70, соответственно, но оставались сходными между дозами в интервале 30 и 1000 мг/кг, что предполагает плато воздействия выше 30 мг/кг. Воздействия, как правило, сходны между однократными и многократными дозами.

Следуя протоколу, по существу, как описано выше, один самец в группе 30 мг/кг токсикокинетической фазы и 1 самец в контрольной группе основной фазы были найдены мертвыми в дни исследования 24 и 70 соответственно. При отсутствии смертности в группе 1000 мг/кг, считали, что гибель при дозе 30 мг/кг не связана с соединением. На ежедневных осмотрах заметили увеличение числа случаев появления красного вещества вокруг 1 или обоих глаз у 4 самцов в группе 30 мг/кг и у 3 самцов в группе 1000 мг/кг, начиная уже с 8-го и 20-го дня исследования соответственно. Никакие другие связанные с соединением клинические результаты не были отмечены у самцов в группах 3, 30 и 1000 мг/кг на ежедневных осмотрах или приблизительно через 1 ч после введения дозы. Средние массы тела, прирост массы тела и потребление пищи не зависели от введения соединения при всех уровнях дозировки.

Было отмечено дозозависимое снижение абсолютной и относительной (по отношению к массе тела

и мозга) массы репродуктивных органов самцов, включая яички, придатки (интактные и хвостообразные), предстательную железу и семенные везикулы/свертывающую железу/вспомогательные жидкости, в группах 30 и 1000 мг/кг. Эффекты в отношении массы органов, наблюдаемые в яичках, соответствовали гистологическим изменениям, характеризующимся атрофией интерстициальных клеток Лейдига и зародышевого эпителия. Эти данные наряду с сокращением популяции зрелых спермиев в придатках в обеих группах и снижением секреции во вспомогательных половых железах, как отмечено в группе 1000 мг/кг, были признаны согласующимися с отрицательной регуляцией синтеза андрогена (тестостерона) и/или с секрецией клетками Лейдига или с ингибированием рецепторов гормонов в органах-мишенях. Эффекты, отмеченные в репродуктивных органах в группе 1000 мг/кг, соответствовали снижению репродуктивной функции. В группах 30 и 1000 мг/кг эффекты массы органов, отмеченные во вспомогательных половых железах (предстательной железе, семенных везикулах и свертывающей железе), считались связанными с фармакологией соединения.

Эффекты, связанные с соединением, в отношении ожидаемых сперматогенных результатов были отмечены в группе 1000 мг/кг. Уменьшение массы придатка яичка были отмечены в группе 1000 мг/кг и соответствовали более низкой средней эпидидимальной концентрации спермы в этой группе. Кроме того, наблюдали связанное с соединением уменьшение доли морфологически нормальной спермы при 1000 мг/кг в результате большего числа сперматозоидов с отсутствующей головкой или отдельно от жгутика. Эти эффекты коррелировали с более низким количеством спаривания, более низкой фертильностью и индексами сокоупления у самцов в группах 1000 мг/кг. Кроме того, немного более длинный предкоитальный интервал наблюдался в группе 1000 мг/кг по сравнению с контрольной группой. Ожидаемые сперматогенные результаты и репродуктивные характеристики в группах 3 и 30 мг/кг не зависели от введения соединения.

Внутриматочная выживаемость эмбрионов не была подвержена влиянию введения соединения для самцов при уровне доз 3, 30 и 1000 мг/кг.

В заключение, не наблюдали никакого влияния на массу тела самцов или потребление пищи или неблагоприятных клинических результатов, связанных с соединением, при любом уровне дозировки. Неблагоприятные эффекты, связанные с соединением, в отношении репродуктивных тканей самцов и сперматогенных параметров проявлялись при 30 и 1000 мг/кг. Снижение массы репродуктивных органов самцов проявлялось при 1000 мг/кг и соответствовало эффектам в отношении эпидидимальной концентрации спермы и морфологии. Кроме того, наблюдали микроскопические изменения в яичках, придатках, предстательной железе, семенных везикулах и в свертывающей железе при 1000 мг/кг, что соответствовало снижению спаривания, фертильности и индексов сокоупления в этой группе. Хотя снижение репродуктивных характеристик в целом коррелировало с гистологическими изменениями в репродуктивной ткани самцов на групповой основе, корреляция на индивидуальной основе у животного не всегда была очевидной. В группе 30 мг/кг было отмечено снижение массы репродуктивных органов и микроскопические изменения в яичках и придатках. Не отмечали соответствующих эффектов в отношении репродуктивной функции при дозе 30 мг/кг, из чего можно предположить, что фармакологический сигнал, пока он присутствует, недостаточно силен, чтобы повлиять на функциональную репродукцию. Основываясь на этих результатах, NOAEL для репродуктивной токсичности и системной токсичности самцов составила 3 мг/кг. Уровень дозы 3 мг/кг соответствует значению воздействия (AUC_{0-24 ч}) на день исследования 70, 10,954 нг·ч/мл.

Четырехнедельные исследования токсичности на собаках при пероральном введении.

Это исследование проводили с целью оценки потенциальной токсичности и токсикокинетики соединения примера 1, селективного модулятора андрогенного рецептора (SARM) у собак после перорального капсульного введения два раза в день в течение 4 недель. Трех группам обработки из трех самцов и трех самок собак породы бигль вводили тестируемый препарат в соответствующих уровнях дозы, составляющих 6, 60 или 300 мг/кг/сут. Одна дополнительная группа из трех животных/на пол служила в качестве контроля и получала носитель, 80% ПЭГ 3350/20% витамин E TPGS (об./об.) посредством пероральных капсул. Тестируемый препарат или носитель вводили всем группам с помощью пероральных капсул два раза в день в течение 28 последовательных дней, при объеме дозы 1,5 мл/кг/доза.

Наблюдения за смертностью, заболеваемостью, повреждениями, а также за наличием пищи и воды проводили два раза в день для всех животных. Подробные клинические наблюдения проводили еженедельно. Массу тела измеряли и регистрировали на следующий день после приема, до рандомизации и еженедельно в ходе исследования. Потребление пищи измеряли и регистрировали еженедельно. Офтальмоскопию проводили перед тестированием и до терминальной аутопсии. Физический осмотр проводили перед тестированием. Неврологический осмотр проводили в течение 1 и 4 недель. ЭКГ проводили два раза до начала приема препарата, а также перед и приблизительно через 2 ч (± 15 мин) после введения тестируемого препарата утром на 3 и 26 день. Забор образцов крови проводили дважды перед тестированием, и забор образцов крови и мочи для клинической оценки патологии проводили у всех животных перед терминальной аутопсией. Проводили забор образцов крови для определения концентраций в плазме тестируемого препарата у всех животных в определенные моменты времени, соответствующие дням 1

и 28. Токсикокинетические параметры определяли для тестируемого препарата на основе данных концентрации-времени в тестируемых образцах. По окончании исследования проводили аутопсию, регистрировали массу органов, и проводили исследование яичек, придатков и предстательной железы с помощью микроскопии. Потенциал соединения примера 1 для индукции цитохромов P450 определяли путем анализа замороженных образцов печени на суммарное содержание цитохрома P450.

В соответствии с протоколом, по существу, как описано выше, не обнаружили поддающейся измерению (<1 нг/мл) концентрации соединения примера 1 ни в одном из образцов плазмы контрольных животных. Не отмечено каких-либо различий в концентрациях в плазме соединения примера 1 между самцами и самками, что указывает на отсутствие тендерного влияния на воздействие соединения. Концентрация соединения примера 1 повышалась менее дозопропорциональным образом у животных, получавших 6 и 60 мг/кг/сутки и, по всей видимости, достигала плато при 60 мг/кг/сутки, при том, что концентрации в плазме были аналогичны концентрациям при 300 мг/кг/сутки.

52-недельное исследование токсичности и токсикокинетики на собаках.

Цель данного исследования заключается в оценке токсичности и определении токсикокинетики тестируемого препарата, соединения примера 1, при ежедневном введении посредством капсул собакам в течение по меньшей мере 52 недель, а также в оценке обратимости, устойчивости или замедленного проявления каких-либо эффектов после 13-недельного восстановления.

Самцов и самок собак породы бигль делили на группы и вводили им дозы в соответствии с таблицей 9 посредством пероральных капсул, содержащих 1 мл/кг 0 [1% (мас./об.) карбоксиметилцеллюлозы натрия (низкая вязкость/25-50 сП), 0,5% (мас./об.) лаурилсульфата натрия и 0,05% (об./об.) Dow Corning® антивспениватель 1510 США в воде, очищенной обратным осмосом] 3, 10 или 100 мг соединения примера 1/кг массы тела. Все животные получали одинаковое количество капсул, и животные группы 1 получали капсулы, содержащие только растворитель, применявшийся в качестве контроля. Трое животных каждого пола из групп 1 и 4 обозначали как животные восстановления (recovery animals).

Таблица 9

Группа	Количество животных		Уровень дозы	Концентрация дозы
	Самцы	Самки	(мг соед. Примера 1/кг)	(мг соед. Примера 1/кг)
1 (Контроль)	7	7	0	0
2 (Низкая)	4	4	3	3
3 (Средняя)	4	4	10	10
4 (Высокая)	7	7	100	100

Оценка токсичности была основана на смертности, клинических признаках, массе тела и изменении массы тела, потреблении пищи, офтальмологических и неврологических оценках, измерениях ЭКГ, на анализе гормонов (тестостерона, прогестерона, лютеинизирующего гормона и фолликулостимулирующего гормона), на оценке семенной жидкости (объем эякулята и количество спермы, плотность, морфология и подвижность), а также на клинико-анатомической патологии. Забор образцов крови проводили для исследовательского анализа метаболитов и токсикокинетических оценок.

В соответствии с протоколом, по существу описанным выше, системное воздействие соединения примера 1 увеличивалось с увеличением уровня дозы от 3 до 100 мг/кг.

Увеличение среднего значения $C_{\text{макс}}$ и $AUC_{0-24 \text{ ч}}$, как правило, было меньше дозопропорционального. Не наблюдали существенных связанных с полом различий токсикокинетических параметров. Накопление соединения примера 1 наблюдали у собак после многократных введений соединения примера 1.

Все животные дожили до запланированного умерщвления. Связанные с соединением клинические признаки представляют собой более частое наблюдения слезотечения у животных, получавших дозу > 3 мг/кг, и снижение или отсутствие течки у самок, получавших дозу > 3 мг/кг.

Не было отмечено каких-либо токсикологически важных различий в средней массе тела, в приросте массы тела и в потреблении пищи. Не выявлено офтальмологических или неврологических нарушений.

Пролонгированный интервал QT и скорректированный интервал QT (QTc) был отмечен перед введением дозы и через 2 часа после введения дозы в дни 3, 86, и 359 фазы дозирования у животных обоих полов, получавших 100 мг/кг. Величина увеличения среднего интервала QTc у животных обоих полов, получавших 100 мг/кг, во всех интервалах фаз дозирования находилась в диапазоне от 14 до 21 мс (от 6 до 9%) по сравнению со средними значениями для контрольных животных. Никаких связанных с соединением изменений интервалов QT или QTc не было отмечено на 88 день фазы восстановления у животных обоих полов, получавших 100 мг/кг, или в дни 3, 86, или 359 фазы дозирования у животных, получавших 3 или 10 мг/кг. Не наблюдали связанных с соединением примера 1 изменений PR-интервала, длительности QRS, интервала RR, или частоты сердечных сокращений на 3, 86 день, или на 359 день фазы дозирования у животных, получавших 3, 10 или 100 мг/кг, или 88 фазы восстановления у живот-

ных, получавших 100 мг/кг. Не соотносили никаких аномалий ритма или качественных изменений ЭКГ с соединением примера 1 в ходе качественной оценки электрокардиограммы.

Связанное с соединением примера 1 дозозависимое снижение общего количества сперматозоидов происходило во время фазы дозирования для самцов при всех уровнях дозы, и оно было соотнесено с уменьшением массы эякулята. При оценке на 52-й неделе (дни 355 и 360 фазы дозирования), общее количество сперматозоидов по сравнению с контролями уменьшалось > 55, > 50 и > 91% для самцов, которым вводили 3, 10 или 100 мг/кг соответственно. Влияние на общее количество спермы полностью становилось обратимым во время фазы восстановления. Не отмечали ни для одной группы связанных с соединением примера 1 эффектов в отношении средней плотности спермы, подвижности или морфологии.

Гормональные изменения были отмечены у самцов и самок, получавших > 3 мг/кг. Изменения согласовывались с фармакологией тестируемого препарата и коррелировали с микроскопическими изменениями. У самцов наблюдали снижение тестостерона и увеличение ЛН. Повышение ЛН и снижение прогестерона у самок согласовывалось с анэструсом, и уменьшение желтых тел было отмечено микроскопически. Гормональный уровень возвращался к контрольному во время фазы восстановления.

Связанные с соединением клинические патологические эффекты ограничивались от минимально до умеренно повышенной аланинаминотрансферазной активности для самцов и самок при всех уровнях дозы (самки, получавшие 100 мг/кг, были наиболее подвержены воздействию), и от минимально до умеренно пониженного уровня холестерина у самцов и самок, получавших 3 или 10 мг/кг (животные, получавшие 3 мг/кг, были наиболее подвержены воздействию). Эффект в отношении активности аланинаминотрансферазы при дозе 100 мг/кг демонстрировал обратимость после фазы восстановления. Обратимость эффекта в отношении концентрации холестерина при 3 и 10 мг/кг нельзя было оценить, так как ни одно животное при этих уровнях дозы не находилось в фазе восстановления. Ни один из этих эффектов не был связан с корреляционными микроскопическими исследованиями.

Не отмечали фармакологически ожидаемых изменений, связанных с соединением, в репродуктивных тканях самцов и самок. Связанное с соединением и обратимое уменьшение массы предстательной железы, придатков и печени/желчного пузыря происходило у самцов, которое, за исключением изменений в желчном пузыре, коррелировало с микроскопическими данными. В предстательной железе, у самцов, получавших > 3 мг/кг, наблюдали обратимую акцинарную эпителиальную атрофию предстательной железы. У самцов, получавших > 3 мг/кг, был обратимо уменьшенный диаметр протоки хвостобразного (хвост) придатка, а у самцов, получавших 100 мг/кг, имела место обратимая эпителиальная атрофия протоков придатков. У самок, получавших > 3 мг/кг, наблюдали уменьшение/отсутствие желтых тел со стадией анэструса цикла в яичниках. Это изменение, как правило, сопровождалось отсутствием лобулярного развития в молочной железе, а также ожидаемыми реакциями вторичных репродуктивных тканей на анэструс: матка, шейка матки, влагалище и молочные железы имели характерные для этой стадии особенности атрофии, сопоставимой с длительным анэструсом.

В совокупности эти данные для самок согласуются с нарушением нормального репродуктивного цикла, связанным с соединением. В фазе восстановления, у 2/3 самок, получавших 100 мг/кг, был диэструс, стадия репродуктивного цикла, и лобулярное развитие молочных желез, что указывает на возвращение к нормальной циклической активности, хотя никаких клинических признаков репродуктивного цикла не было отмечено во время фазы восстановления.

Кроме того, наблюдали связанные с соединением и обратимые микроскопические результаты в надпочечниках и коже/подкожно. В надпочечниках у самцов, получавших > 10 мг/кг, и у самок, получавших 100 мг/кг, имела место уменьшенная вакуолизация пучковой зоны и сетчатки. В коже у животных, получавших > 3 мг/кг, была отмечена уменьшенная вакуолизация сальной железы.

Таким образом, ежедневное введение соединения примера 1 с помощью капсул собакам в течение 52 недель с уровнем дозы 3, 10 или 100 мг/кг не приводило к неблагоприятным результатам, связанным с соединением. Изменения в репродуктивной функции у самцов (снижение количества сперматозоидов и объема эякулята) и у самок (уменьшается/отсутствует эстральный цикл) имели место во всех группах обработки соединением примера 1 и коррелировали с результатами микроскопии. Эти изменения не влияли на общее состояние здоровья животных; и согласовывались с фармакологическим действием тестируемого препарата; и были обратимыми. Таким образом, NOAEL составляет 100 мг/кг. Через 361 день дозирования доза 100 мг/кг соответствовала средним значениям $Stax$ 1496 и 1885 нг/мл, и значениям $AUC_{0-24 ч}$ 22582 и 31505 нг·ч/мл у самцов и самок соответственно.

Таблица 10

Краткое изложение результатов по предстательной железе крыс и собак, подвергнутых обработке соединением примера 1

Крысы

Продолжительность обработки (месяцы)	7 ^a			6 ^a			Фертильность самцов (3 мс) ^a		
	15	150	1500	15	150	1500	3	30	1000
Масса предстательной железы (среднее значение % уменьшения)	—	—	—	—	↓30%	↓34%	—	↓23%	↓39%
Атрофия предстательной железы (не влияло /не исследовали)	—	—	—	—	—	4/15	—	—	—
Группа самцов среднее значение AUC _{0-24ч} , около терминации (нг*ч/мл)	35733	72283	102337	15902	34132	82690	10954	49734	56009

- Наблюдаемые эффекты отсутствовали.

¹ Носитель 5% Витамин Е TPGS, 1% гидроксиметилцеллюлоза, 0,05% DC анти-вспениватель 1510-US в очищенной воде.

Собаки

Продолжительность обработки (месяцы)	1 ^a			6 ^a			12 ^b		
	3	30	150	3	30	300	3	10	100
Масса предстательной железы (среднее значение % уменьшения)	—	—	—	↓63%	↓66%	↓75%	↓60%	↓62%	↓80%
Атрофия предстательной железы (не влияло /не исследовали)	—	—	1/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	4/4
Группа самцов среднее значение AUC _{0-24ч} , около терминации (нг*ч/мл)	17984	61674	46528	6492	44448	53032	3621	13408	22582

- Нет наблюдаемого эффекта.

^a Носитель 80% ПЭГ 1350, 20% Витамин Е TPGS (об./об.).

^b Носитель 1% (мас./об.) карбоксиметилцеллюлоза натрия, 0,5% (мас./об.) лаурилсульфат натрия, 0,05% (об./об.) Dow Corning* антивспениватель 1510-US в воде, очищенной обратным осмосом.

Обработка с помощью соединения примера 1 интактных крыс или собак в течение периода от 1 до 12 месяцев приводила к значительному уменьшению размера предстательной железы, что служит дополнительным указанием того, что указанная обработка не повышает андрогенный риск гиперплазии предстательной железы с течением времени.

In vivo исследования для изучения какого-либо прямого антагонистического эффекта соединения примера 1 в присутствии ТЕ

Всего использовали 36 перенесших орхидэктомию (ОРХ) и 6 ложнооперированных самцов крыс линии Wistar (орхидэктомию в возрасте 8 недель и возможность гибели в течение 4 недель). Крыс держали на 12ч цикле свет/темнота при 22°C со свободным доступом к пище (TD 5001 с 0,95% Са и 0,67% Р, Teklad, Madison, WI) и воде. Крыс рандомизировали и размещали по группам обработки (n=6) в зависимости от массы тела. Путь введения для всех групп, кроме ТЕ, был пероральным. ТЕ вводили подкожно. В конце 8-недельного ежедневного приема крыс умерщвляли, взвешивали и проводили забор тканей. У каждого животного проводили забор леватора, предстательной железы и семенных везикул. Результаты представлены в виде среднего значения ± SE.

Сравнения средних значений влажных масс семенных везикул.

Сравнения с контролем с использованием метода Даннетта.

Контрольная группа = d-ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сут.

|d| Альфа
2,69715 0,05

Таблица 11

Группа No	Группа	Абс(Разл)-LSD	p-значение
1	ЛО	0,979	<,0001
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки	-0,52	1,0000
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки	-0,34	0,8628
4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,078	0,0187
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки	0,536	<,0001
6	ОРХ + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	1,411	<,0001
7	ОРХ, Носитель	1,422	<,0001

Положительные значения показывают пары средних значений, которые значительно различаются.

Комбинация тестостерон энантата (1 мг/кг/сутки) с различными дозами соединения примера 1 позволяет предположить наличие тенденции к уменьшению влажной массы семенных везикул в мг, нормализованной к массе тела в граммах, которое индуцируется только с помощью ТЕ, как показано на фиг. 5 и в табл. 11.

Сравнения средних значений масс предстательной железы.

Сравнения с контролем с использованием метода Даннетта.

Контрольная группа = d-ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сут.

|d| Альфа
2,69715 0,05

Таблица 12

Группа No	Группа	Абс(Разл)-LSD	p-значение
1	ЛО	0,509	<,0001*
2	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки	-0,15	1,0000
3	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 3 мг/кг/сутки	-0,11	0,9774
4	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 30 мг/кг/сутки	0,025	0,0167*
5	ОРХ + ТЕ, 1 мг/кг/сутки + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,036	0,0099*
6	ОРХ, Носитель	0,356	<,0001*
7	ОРХ + Пример 1, 10 мг/кг/сутки	0,357	<,0001*

Положительные значения показывают пары средних значений, которые значительно отличаются от группы, получавшей только ТЕ.

Совместная обработка соединением примера 1 крыс SD вместе с 1 мг/кг ТЕ приводила к дозозависимому уменьшению влажной массы предстательной железы в мг, нормализованной к массе тела в граммах, как показано на фиг. 6 и в табл. 12.

Таблица 13

	hAR Ki (нМ)	LnCAP Экспрессия гена EC50 (нМ)		
		PSA	AR	CLUSTERIN
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Пример 1	1,95	2,64	1,64	>100

Сравнения соединения примера 1 с синтетическим тестостероном R1881 продемонстрировали, что при *in vitro* использовании человеческих клеток рака предстательной железы соединение примера 1 является менее андрогенным, чем R1881. Напротив, биохимическая аффинность связывания с человеческим андрогенным рецептором (hAg; Ki в нМ) лишь незначительно уменьшается.

Фаза Ia исследования на здоровых добровольцах.

Данная фаза I исследования представляет собой рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое, однодозовое, неполное-перекрестное исследование, модель эскалации доз, которое про-

водили в 3-х группах дозирования, состоящих из здоровых мужчин и женщин в постменопаузе. Тридцать объектов (10 на группу) случайным образом относили к каждой группе дозирования.

В течение обоих периодов дозирования объектов допускали в клинические научно-исследовательские подразделения (CRU) для ночевки. Объекты получали дозу перорально после завтрака в 1-й день и оставались в CRU в течение примерно 24 ч после введения дозы. В каждой группе, период вымывания между периодами дозирования составлял в диапазоне от 14 до 45 дней. Исследование для выписки происходило приблизительно через 5 дней после последней дозы, Период 2. Целесообразность эскалации дозы определяли путем измерения безопасности на каждой стадии эскалации. Объект-исследовательскую, двойную слепую, перекрестную модель использовали для этого исследования, чтобы обеспечить межгрупповые данные для всех измерений безопасности и переносимости. Такая модель облегчает объективную оценку АЕ.

Протокол по существу, как описано выше, был следующим. В результате неполной перекрестной модели приблизительно 50% объектов получали однократную дозу соединения примера 1 и дозу плацебо с целью улучшения обнаружения значимых сигналов безопасности или переносимости. Приблизительно 50% объектов получали соединение примера 1 с 2 уровнями дозы, что позволило провести внутригрупповой анализ дозовой зависимости ФК параметров и других конечных результатов. Выбирали минимальный 5-дневный период интервала дозирования, чтобы свести к минимуму остаточные эффекты между периодами обработок.

Планируемый диапазон доз для данного исследования составил от 5 до 1000 мг для соединения примера 1, и был основан на *in vivo* эффективности у крыс, используя предположение о том, что воздействие, необходимое для получения 80% эффекта для костей (средняя промежуточная нагрузка и нагрузка шейки бедра) у крыс такое же, как необходимое воздействие у человека. На основе аллометрически предсказанного человеческого клиренса (33 л/ч, 90% доверительный интервал [ДИ]: от 24 до 46 л/ч) и биодоступности (49%), такой ответ в организме человека, как ожидается, произойдет в дозах около 71 мг/сутки (90% ДИ: от 29 до 321 мг/сут).

Эти данные демонстрируют увеличение области икроножных мышц, как было определено с помощью периферической компьютерной томографии на основе изображения икроножных связок (область икроножных мышц) после введения соединения примера 1 здоровым добровольцам, как показано на фиг. 7.

Таблица 14

Краткое изложение изменения относительно базового уровня для сухой мышечной массы с помощью дозы в 28-й день - мужчины

Группа обработки	n	Среднее значение LS [95% CI]	Сравнение с плацебо Различие [95% CI] [P-значение]
Плацебо	7	-873,45[-2318,30, 571,39]	
1 мг LY	7	675,52 [-762,14, 2113,18]	1548,971-491,08, 3589,02] [.130]
5 мг LY	8	587,66 [-757,35,1932,67]	1461,11 [-510,41, 3432,63] [.139]
15 мг LY	2	2329,08 [-453,16, 5111,33]	3202,54 [100,93, 6304,14] [.044]
25 мг LY	2	956,18 [-1773,88, 3686,23]	1829,63 [-1281,37, 4940,62][.236]
75 мг LY	4	-1557,21 [-3500,36, 385,94]	-683,7 [-3129,22, 1761,70] [.569]

Среднее значение LS - среднее значение, полученное методом наименьших квадратов.

Доверительный интервал (CI) с 95% означает, что в 95% случаев значение параметра можно найти в пределах этого доверительного интервала.

Смешанная модель: $chg = \text{базовая доза} \cdot ddfm = kr$;

Единица=г;

Программа: Home/lillyce/pxd/ly24S2473/12n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smim_update.sas.

Таблица 15

Краткое изложение изменения относительно базового уровня
для сухой мышечной массы с помощью дозы в 28-й день - женщины

Группа обработки	n	Среднее значение LS [95% CI]	Сравнение с плацебо Различие [95% CI] [P-значение]
Плацебо	3	-742,27 [-3136,75, 1652,21]	
5 мг LY	3	1555,95 [-1092,94, 4204,84]	2298,22 [-2183,05,6779,50] [-271]
15 мг LY	2	2919,58 [-679,64, 6518,81]	3661,85 [-1742,10, 9065,81] [,157]
25 мг LY	4	1482,24 [-1013,85, 3978,33]	2224,51 [48,22, 4400,81] [,046]
75 мг LY	2	1583,65 [-506,14, 3673,45]	2325,92 [-1178,94, 5830,78] [,164]

Смешанная модель: chg=базовая доза ddfm=kr;

Единица=г;

Программа: Home/lillyce/prxd/ly24S2473/12n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smim_update.sas.

Эти данные демонстрируют увеличение сухой мышечной массы всего тела после введения соединения примера 1 здоровым добровольцам согласно измерениям с помощью DEXA. Эффект у мужчин (синяя полоса) при уровне дозы 5 мг был статистически значимым по сравнению с 0 мг дозы плацебо, с использованием теста Даннетта ($p < 0,05$), как показано на фиг. 8 и в табл. 14 и 15.

Таблица 16

Краткое изложение изменения относительно базового уровня
для простат-специфического антигена в зависимости от дозы и времени - мужчины

Группа обработки	Время/день	n	Среднее значение LS [95% CI]	Сравнение с плацебо Различие [95% CI] [P-значение]
Плацебо	14	7	0,04 [-0,11,0,20]	
	28	7	0,05 [-0,11,0,20]	
	35	7	0,03 [-0,13,0,16]	
1 мг LY	14	7	-0,06 [-0,21,0,09]	-0,10[-0,31,0,12][,362]
	28	7	-0,05 [-0,20,0,10]	-0,09[-0,31,0,12][,390]
	35	7	0,02 [-0,13,0,17]	-0,01[-0,22,0,21][,940]
5 мг LY	14	8	0,20 [0,06,0,34]	0,161-0,05,0,37[,140]
	28	8	-0,00 [-0,15, 0,14]	-0,05[-0,26, 0,16] [,635]
	35	8	0,20 [0,06, 0,34]	0,17[-0,04, 0,39] [,106]
15 мг LY	14	2	-0,11 [-0,40,0,17]	-0,16 [-0,46, 0,16] [,331]
	28	2	-0,27 [-0,55, 0,01]	-0,31 [-0,63, 0,01] [,055]
	35	2	0,25 [-0,03, 0,53]	0,22 [-0,10, 0,54] [,174]
25 мг LY	14	2	-0,15 [-0,43, 0,13]	-0,19 [-0,51, 0,13] [,243]
	28	2	-0,22 [-0,50, 0,06]	-0,27 [-0,59, 0,05] [,097]
	35	2	-0,14 [-0,42, 0,14]	-0,17 [-0,49,0,15] [,295]
75 мг LY	14	4	-0,13 [-0,33, 0,07]	-0,17 [-0,43, 0,09] [,185]
	28	3	0,07 [-0,15,0,30]	0,03 [-0,25,0,30] [,851]
	35	4	0,03[-0,17,0,23]	0,00 [-0,26,0,26] [-997]

Смешанная модель: chg=базовая доза VTSITDY доза *VTSITDY/ddfm=kr; повторный VTSITDY/объект = тип объекта=cs;

Единицы= мкг/л;

Программа: Home/lillyce/prd/ly2452473/12n_mc_gpbc/final/program_stat/gpbc_emlab_update.sas.

Эти данные, представленные на фигуре, демонстрируют, что не существует каких-либо существенных изменений относительно базового уровня простат-специфического антигена (SPA) по сравнению с плацебо в любой момент времени, или при любой дозе соединения примера 1, как показано на фиг. 9 и в табл. 16.

Фаза Ib исследования здоровых добровольцев.

Данная фаза 1 представляет собой рандомизированное, плацебо-контролируемое, объект- и исследователь-слепое, многодозовое, с эскалацией дозы, параллельное исследование соединения примера 1 на здоровых объектах. Данное исследование проводили в 6 группах обработки, и объекты были рандомизированы для получения ежедневных доз либо соединения примера 1, либо плацебо в течение 4-х недель.

Оценку безопасности и переносимости проводили перед каждой эскалацией дозы. Основные критерии включения/исключения для данного исследования представляют собой такие, что объектами могут быть здоровые мужчины или здоровые женщины в постменопаузе, в возрасте от 30 до 80 лет включительно; с индексом массы тела (ИМТ) от 18 до 32 кг/м² включительно.

Объектов включали в исследование и рандомизировали после скрининга. На 1 и 29 день объекты были госпитализированы в отделение клинических исследований (CRU). На 1, 2 и 28 день объектам вводили дозу перорально после завтрака. Безопасный забор всех анализов проводили до завтрака и после ночного голодания в течение по меньшей мере 12 ч.

После дня 1 объектов отпускали на 2-й день после запланированных процедур, завтрака и введения дозы (приблизительно через 24 часа после дозы в день 1). После 28-го дня объектов отпускали на 29-й день после запланированных процедур, завтрака и введения дозы (приблизительно через 24 часа после дозы в день 28).

Эти данные демонстрируют снижение уровня тестостерона в сыворотке после введения соединения примера 1 эугональным здоровым людям-добровольцам. Снижение после обработки более выражено у мужчин, с учетом их относительно более высокого уровня тестостерона в сыворотке. Таблица справа отражает оценку воздействия после исследования Ph1a в дозе 5 мг, как показано на фиг. 10.

Таблица 17

Краткое изложение изменения относительно базового уровня для пропептида проколлагена типа 1N (P1NP) в зависимости от дозы и времени - мужчины

Группа обработки	Время/день	n	Среднее значение LS [95% CI]	Сравнение с плацебо Различие [95% CI] [P-значение]
Плацебо	14	7	-1,15 [-7,55, 5,24]	
	28	7	-1,32 [-7,72, 5,07]	
	35	7	-3,44 [-9,83, 2,96]	
1 мг LY	14	7	-3,55 [-9,70, 2,59]	-2,40 [-11,09, 6,29] [,580]
	28	7	0,16 [-5,98, 6,30]	1,49 [-7,20, 10,17] [,731]
	35	7	-5,70 [-11,84, 0,45]	-2,26 [-10,94, 6,43] [,602]
5 мг LY	14	8	2,11 [-3,66, 7,88]	3,271-5,56,12,09][,458]
	28	8	2,88 [-2,90, 8,65]	4,20 [-4,62, 13,02] [,341]
	35	8	-2,31 [-8,08, 3,46]	1,13 [-7,70, 9,95] [,797]
15 мг LY	14	2	1,34 [-10,64, 13,32]	2,49 [-11,62, 16,60] [,723]
	28	2	2,09 [-9,89, 14,07]	3,41 [-10,70, 17,52] [,627]
	35	2	-3,41 [-15,39, 8,57]	0,03 [-14,08, 14,14] [,997]
25 мг LY	14	2	-2,07 [-13,70, 9,56]	-0,92 [-14,54, 12,70] [,892]
	28	2	1,43 [-10,20, 13,06]	2,75 [-10,86, 16,37] [,685]
	35	2	-2,97 [-14,60, 8,66]	0,47 [-13,15, 14,08] [,945]
75 мг LY	14	4	-4,96 [-13,02, 3,09]	-3,81 [-14,06, 6,44] [,457]
	28	3	1,48 [-7,27, 10,24]	2,81 [-8,02, 13,64] [,604]
	35	4	-1,09 [-9,15, 6,97]	2,35 [-7,90, 12,60] [,646]

Смешанная модель: chg=базовая доза VTSITDY доза *VTSITDY/ddfm=kr; повторный VTSITDY/объект = тип объекта=cs;

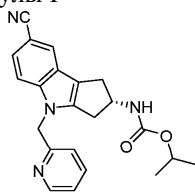
Единицы= мкг/л;

Программа: Home/lillyce/prd/ly2452473/12n_mc_gpbc/final/program_stat/gpbc_emlab_update.sas.

Эти данные демонстрируют положительную зависимость воздействия-отклика для N-концевого пропептида проколлагена типа 1 (P1NP), биомаркера костного анаболизма, после введения соединения примера 1 эугональным здоровым людям-добровольцам, как показано на фиг. 11 и в табл. 16.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

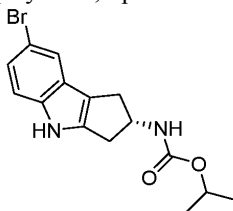
1. Способ получения соединения формулы I



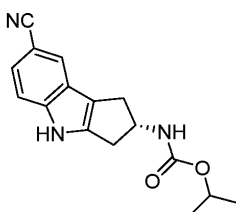
(Формула I),

включающий стадии

реакции $Zn(CN)_2$ с соединением формулы II, при этом получая соединение формулы III,

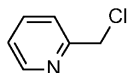


(Формула II),



(Формула III); и

образования соединения формулы I путем реакции соединения формулы III с соединением формулы IV



(Формула IV).

2. Способ по п.1, в котором реакция соединения формулы II с $Zn(CN)_2$ для получения соединения формулы III включает:

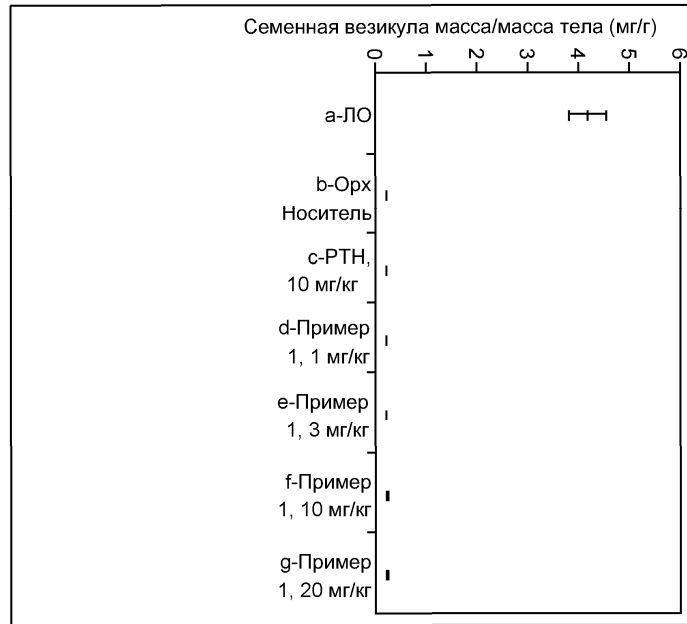
- (i) реакцию соединения формулы II с $Zn(CN)_2$, $Zn(OAc)_2$, Zn и $Pd(dppf)_2Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ в N,N-диметилацетамиде с образованием соединения формулы III в растворе;
- (ii) добавление воды для осаждения и выделения соединения формулы III из раствора;
- (iii) растворение осажденного и выделенного соединения формулы III в смеси трет-бутилметилового эфира и ацетона с образованием суспензии;
- (iv) фильтрование суспензии с получением фильтрата, содержащего соединение формулы III; и
- (v) обработку фильтрата, содержащего соединение формулы III, древесным углем, $MgSO_4$ и FLO-RISIL™.

3. Способ по п.2, в котором соединение формулы III кристаллизуется в гептане.

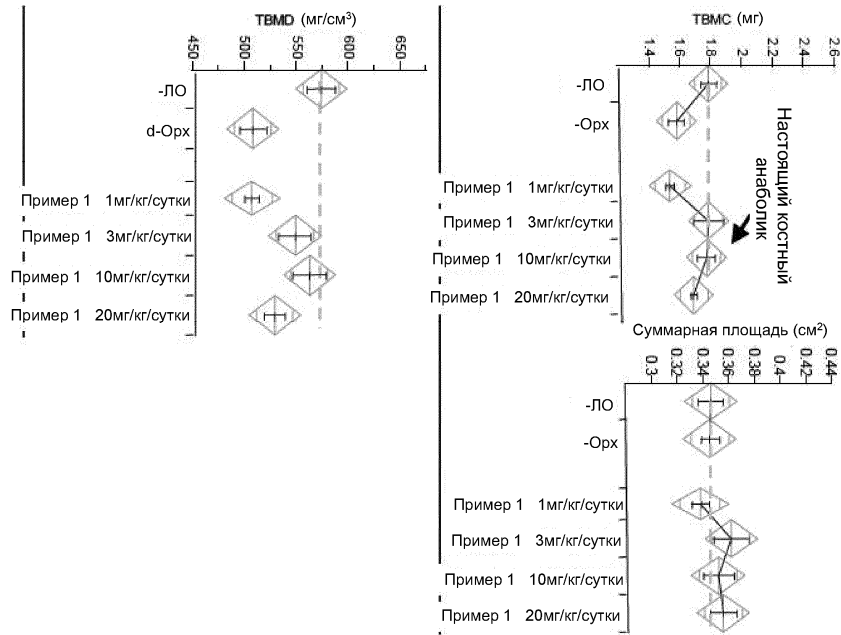
4. Способ по любому из пп.1-3, в котором соединение формулы I получают способом, содержащим стадии:

- (i) реакция соединения формулы III с 2-пиколилхлорид гидрохлоридом и K_2CO_3 в N,N-диметилацетамиде с получением соединения формулы I в растворе; и
- (ii) выделение соединения формулы I путем добавления воды в раствор, полученный на стадии (i), и фильтрации.

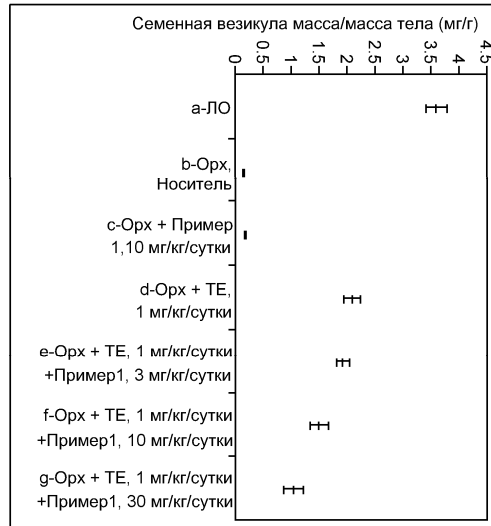
5. Способ по п.4, дополнительно содержащий стадию перекристаллизации выделенного соединения формулы I в EtOH с получением кристаллической формы соединения формулы (I).



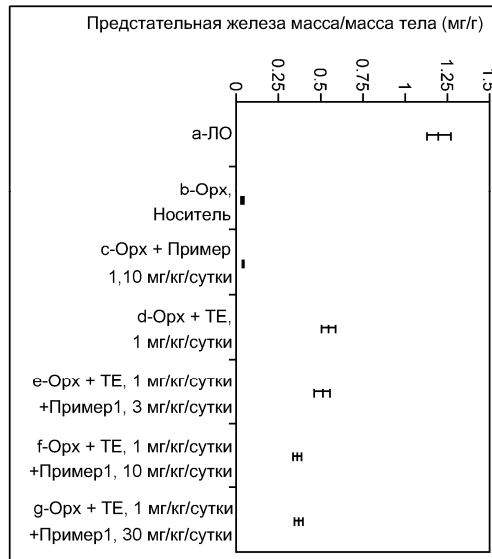
Фиг. 1



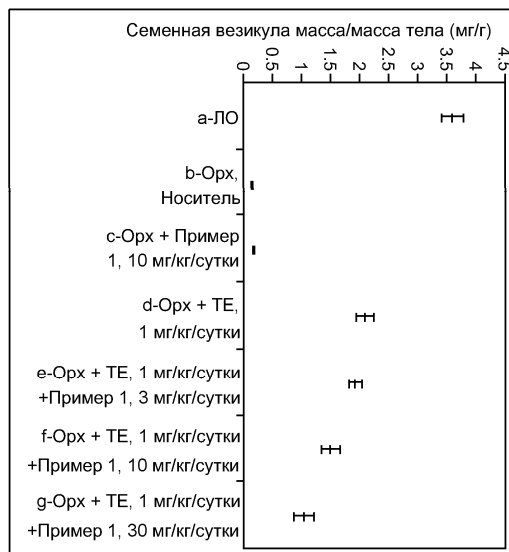
Фиг. 2



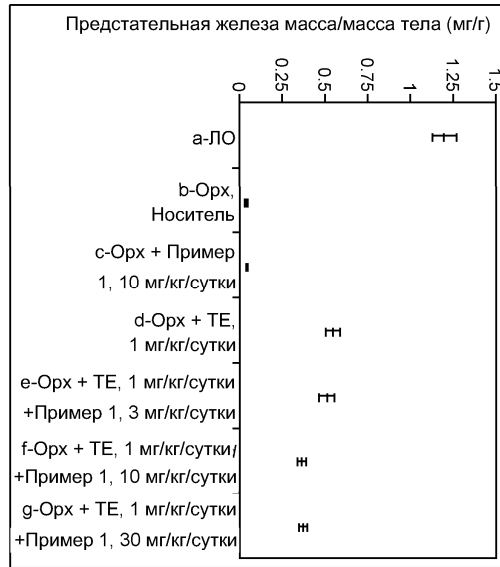
Фиг. 3



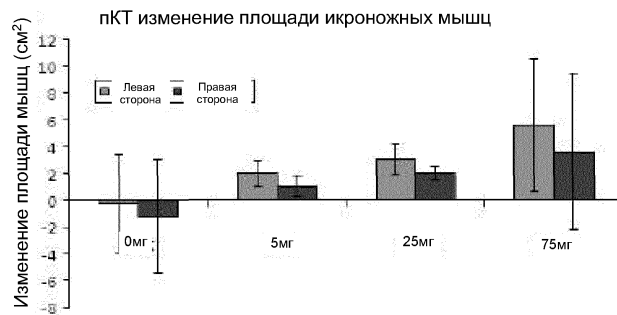
Фиг. 4



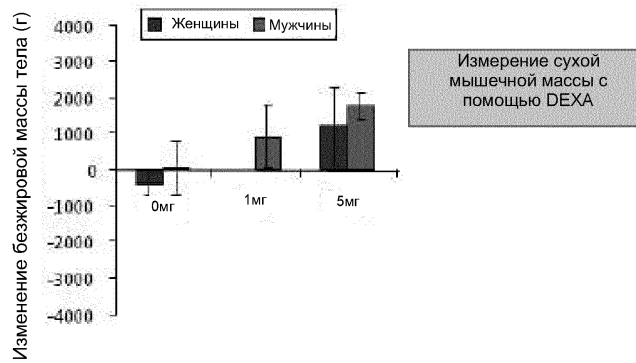
Фиг. 5



Фиг. 6

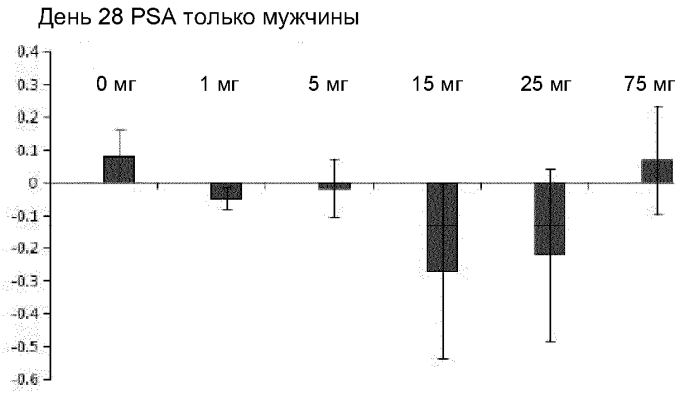


Фиг. 7

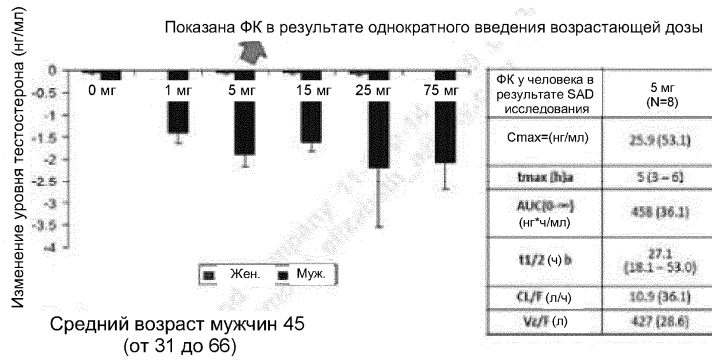


Фиг. 8

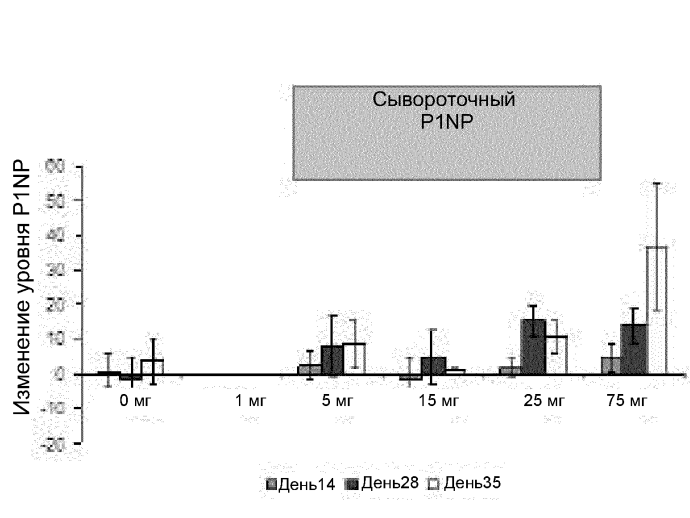
Изменение относительно базового уровня (мкг/л)



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

