

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190146 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.27(22) Дата подачи заявки
2019.07.01

(51) Int. Cl. *A61K 31/34* (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
C07D 307/78 (2006.01)
C07D 307/82 (2006.01)
C07D 307/83 (2006.01)

(54) АКТИВАТОРЫ РЕАКЦИИ НА НЕСЛОЖЕННЫЕ БЕЛКИ

(31) 62/693,641

(32) 2018.07.03

(33) US

(86) PCT/US2019/040058

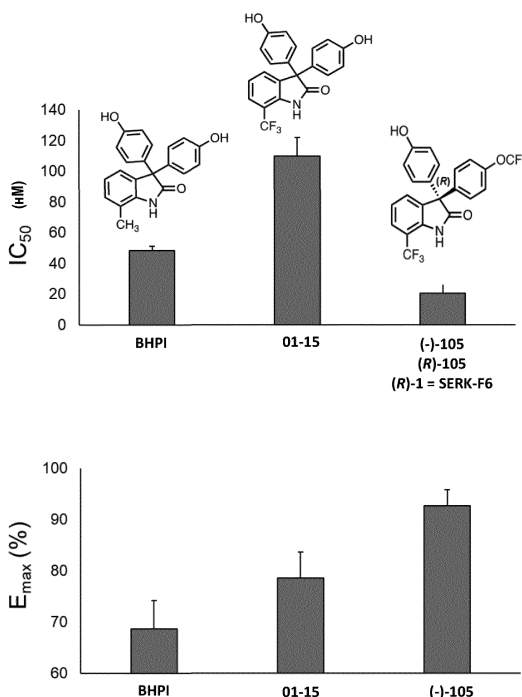
(87) WO 2020/009958 2020.01.09

(71) Заявитель:
ТЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ТЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС
(US)

(72) Изобретатель:
Шапиро Дэвид Дж., Хергенротер Пол
Дж., Будро Мэттью У. (US)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Набор небольших молекул ERα биомодуляторов, которые убивают резистентные к лечению ERα положительные клетки рака молочной железы, яичников и эндометрия. Эти небольшие молекулы имеют увеличенный терапевтический потенциал в связи с увеличенной способностью убивать резистентные к лечению клетки рака молочной железы по сравнению с ВНРІ и другими общепринятыми лечениями (эндокринные лечения, тамоксифен и фулвестрант/ICI). Новые соединения не только ингибируют пролиферацию раковых клеток, но действительно их убивают, что предотвращает реактивацию опухолей через несколько лет.



A1

202190146

202190146

A1

АКТИВАТОРЫ РЕАКЦИИ НА НЕСЛОЖЕННЫЕ БЕЛКИ

5

Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. §119(e) по предварительной заявке на патент США № 62/693,641, поданной 3 июля 2018 г., которая включена в настоящую заявку путем ссылки.

10

Государственная поддержка

Настоящее изобретение было осуществлено с государственной поддержкой согласно Гранту № RO1DK071909, присужденным Национальным институтом здравоохранения США. Государство имеет определенные права на изобретение.

15

Предпосылки создания изобретения

Приблизительно 70% раков молочной железы являются ER α -положительными. Эндокринные (гормональные) терапии для этих опухолей включают ингибиторы ароматазы, которые блокируют продукцию эстрогена, тамоксифен, который конкурирует с эстрогенами за связывание с ER α и фулвестрант/Фаслодекс/ICI 182,780, которые оба конкурируют с эстрогенами и способствуют ER α разложению. Несмотря на то, что они эффективны на начальном этапе, иногда развивается резистентность в первичных опухолях и практически всегда при терапии метастаз. Несмотря на то, что механизмы резистентности разнообразны, проведенные в последнее время исследования продемонстрировали, что приблизительно 30% этих метастатических опухолей заякоривают ER α мутации, чаще всего ER α D538G и ER α Y537S. Существуют многочисленные данные о том, что эти опухоли проявляют эстроген-независимую пролиферацию и, следовательно, они являются резистентными к действию ингибиторов ароматазы, которые блокируют продукцию эстрогена. Они также в большинстве случаев резистентны к тамоксифену и частично резистентны к фулвестранту. Примечательно, что пациенты, метастатические опухоли которых содержат ER α D538G мутацию, имеют более короткое на 6

месяцев время выживания, а те, которые имеют ER α Y537S мутацию, имеют более короткое на 12 месяцев время выживания, по сравнению с пациентами, метастатические опухоли которых содержат немутированный ER α дикого типа. Следовательно, предпринимаются значительные и интенсивные попытки

5 разработать химиотерапевтические средства, нацеленные на клетки рака молочной железы, содержащие эти мутации.

Патология ER α положительного рака молочной железы является необычной. В то время как 5-ти летние коэффициенты выживаемости являются очень хорошими, опухоли часто рецидивируют через 10-20 после постановки

10 первоначального диагноза. Полагают, что это обусловлено реактивацией пролиферации дремлющих клеток рака молочной железы. Следовательно, чрезвычайно важным является действительно убить опухолевые клетки, и не позволить им остаться дремлющими и чувствительными к реактивации. Существующие в настоящее время эндокринные терапии являются

15 цитостатическими, а не цитотоксическими, и, таким образом, не убивают остаточные клетки рака молочной железы. Это предоставляет возможность клеткам находиться в дремлющем состоянии и реактивироваться в дальнейшем. Возможные методы лечения для этих рекуррентных опухолей являются плохими и большинство смертельных исходов при раке молочной железы происходят у

20 пациентов с ER α положительными опухолями.

Рак яичников обычно присутствует на прогрессирующей стадии. Опухоли часто повторно развиваются после хирургического вмешательства. Несмотря на то, что 30-70% опухолей яичников являются ER α положительными, и ER α экспрессия связана с неблагоприятным исходом, эндокринная терапия

25 неэффективна и рекуррентные опухоли обычно лечат с применением химиотерапии препаратами платины и паклитакселом. Несмотря на первоначальный ответ, после нескольких циклов лечения, опухоли повторно развиваются в виде резистентного рака яичников, с плохими возможностями лечения. Больше половины пациентов с раком яичников умирает в течение 5 лет.

30 При раке яичников, наиболее распространенным механизмом для резистентности к паклитакселу и другим химиотерапевтическим средствам является множественная лекарственная резистентность; энергетически зависимый эффлюкс лекарственных средств, вызываемый сверхэкспрессией

АТФ-зависимых эффлюксных насосов, в особенности белка множественной лекарственной резистентности 1 (MDR1)/P-гликопротеина/ABCB1. Несмотря на интенсивные попытки, эффективные нетоксичные MDR1 ингибиторы являются труднодостижимыми.

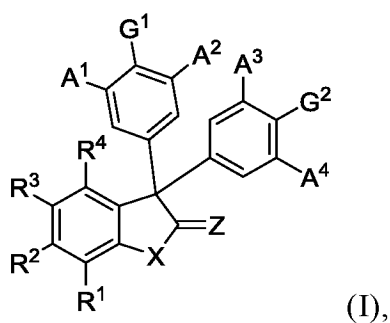
5 Несмотря на то, что различные злокачественные новообразования эндометрия матки являются ER α положительными, эндокринная терапия работает плохо.

Таким образом, важной терапевтической задачей является, следовательно, идентификация новых небольших молекул, которые являются
10 цитотоксическими, а не только цитостатическими, и разработка соответствующих терапевтических способов.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает преимущество небольших молекул с
15 улучшенной способностью действительно убивать резистентные к терапии клетки рака молочной железы, которые имеют значительно увеличенный терапевтический потенциал. Специфически, для предотвращения рецидивирования, является чрезвычайно важным разрушать всю популяцию растущих и дремлющих резистентных к терапии клеток рака молочной железы.
20 По сравнению с ВНРІ, и с эндокринными терапиями с применением тамоксифена и фулвестранта/ICI, активный энантиомер (-)C-105 имеет значительно увеличенную способность убивать клетки рака молочной железы. Следовательно, соединение (-)C-105 имеет существенно увеличенный терапевтический потенциал (Фигура 4А-4С).

25 Настоящее изобретение обеспечивает соединение Формулы I:



или его соль или сольват;

где

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой каждый независимо H, гало, $-OR^A$, $-SR^A$, $-N(R^A)_2$, алкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил;

A^1 , A^2 , A^3 и A^4 представляют собой каждый независимо H, гало, или алкил;

G^1 представляет собой гало, $-OR^B$, $-SR^B$, $-S(=O)_2R^B$, или алкил;

G^2 представляет собой гало, $-OR^C$, $-SR^C$, $-S(=O)_2R^C$, или алкил;

X и Z представляют собой каждый независимо O, S, или $-NR^D$; и

R^A , R^B , R^C и R^D представляют собой каждый независимо H или

алкил, где, если присутствуют, $-OR^B$ и $-OR^C$ оба не представляют собой $-OH$;

где каждый алкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещены одним или несколькими заместителями.

Вышеуказанное соединение может связываться с альфа-рецептором эстрогена ($ER\alpha$) и убивать или ингибировать рост раковых клеток путем гиперактивации реакции на несложные белки (UPR) в эндоплазматическом ретикулуме.

Дополнительно, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения рака, включающий введение субъекту с $ER\alpha$ положительным раком, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества вышеуказанного соединения, таким образом осуществляя лечения рака у субъекта.

Изобретение обеспечивает новые соединения Формул I-IV, промежуточные соединения для синтеза соединений Формул I-IV, а также способы получения соединений Формул I-IV. Изобретение также обеспечивает соединения Формул I-IV, которые пригодны в качестве промежуточных соединений для синтеза других пригодных соединений. Изобретение обеспечивает применения соединений Формул I-IV для приготовления лекарственных средств, пригодных для лечения рака у млекопитающего, такого как человек.

Изобретение обеспечивает применение композиций, описанных в настоящей заявке, для применения в лекарственной терапии. Лекарственная терапия может представлять собой лечение рака, например, рака молочной железы, рака яичников, рака матки, карциномы шейки матки, рака эндометрия, рака легких, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы или рака

ободочной кишки. Изобретение также обеспечивает применение композиции, как описано в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у млекопитающего, например, рака у человека.

Лекарственное средство может включать фармацевтически приемлемый разбавитель, наполнитель или носитель.

Краткое описание фигур

Последующие фигуры составляют часть описания и включены для дополнительной демонстрации определенных вариантов осуществления или различных аспектов изобретения. В некоторых случаях, варианты осуществления в соответствии с изобретением могут наилучшим образом пониматься со ссылкой на приложенные иллюстрации в комбинации с подробным описанием, представленным в настоящей заявке. Описание и приложенные иллюстрации могут подчеркивать определенный специфический пример или определенный аспект изобретения. Тем не менее, квалифицированный специалист в данной области техники будет понимать, что часть примера или аспекта можно использовать в комбинации с другими примерами или аспектами изобретения.

Фигура 1. Исследование зависимости доза-эффект влияния (±)-105 на ERα положительные и ERα отрицательные раковые клетки человека. Осуществляли 24-часовой анализ гибели с применением аламарового синего для определения IC₅₀ соединения 105.

Фигура 2. Исследование зависимости доза-эффект для сравнения способности ВНРІ и (±)-105 убивать ERα положительные T47D клетки. Соединение (±)-105 эффективно индуцирует гибель клеток рака молочной железы.

Фигура 3. Сравнение способности (±)-105 убивать ERα положительные и его неспособности убивать ERα отрицательные клетки.

Фигура 4. (-)-105 эффективно и количественно убивает раковые клетки. MCF7 (ER+) клетки, инкубация в течение 24 часов, считывание данных с помощью флуоресценции аламарового синего, Контроль гибели: Раптинал, n = 3 (A, B). (-)-105 эффективен при пероральном введении (C). Ортоптические мышинные ксенотрансплантаты рака молочной железы для TYS клеток, Визуализация с помощью биолюминисцентного изображения. Обработка: 40

мг/кг в сутки (-)-105 в течение 3 дней либо через желудочный зонд или путем внутрибрюшинной инъекции.

Фигура 5. Хиральное разделение ($\pm$)-105 продемонстрировало разделение индивидуальных энантиомеров.

5 **Фигура 6.** ($\pm$)-105 трек хиральной ВЭЖХ продемонстрировал разделенные пики.

Фигура 7. (-)-105 Трек хиральной ВЭЖХ выделенного энантиомера.

Фигура 8. (+)-105 Трек хиральной ВЭЖХ другого выделенного энантиомера.

10 **Фигура 9.** (-) энантиомер из 105 является активным и (+) энантиомер является неактивным в T47D клеточной линии.

Фигура 10. (-)-105 индуцирует дозозависимую гибель MCF-7 клеток; (+)-105 является неактивным.

15 **Фигура 11.** Исследование зависимости доза-эффект продемонстрировало, что (-)-105 является лучше по сравнению с ВНPI для уничтожения T47D клеток.

Фигура 12. Исследование зависимости доза-эффект продемонстрировало, что (-)-105 является лучше по сравнению с ВНPI для уничтожения MCF-7 и TYS клеток.

20 **Фигура 13.** Исследование зависимости доза-эффект продемонстрировало, что (-)-105 является лучше по сравнению с ВНPI и существующими в настоящее время эндокринными терапиями для уничтожения TDG-Luc клеток.

Фигура 14. Исследования зависимости доза-эффект для определения IC₅₀ для уничтожения раковых клеток с помощью (-)-105.

25 **Фигура 15.** В долгосрочных экспериментах (-)-105, но не ВНPI, убивает 100% TYS-Luc клеток.

Фигура 16. В долгосрочных экспериментах, которые воспроизводят терапию, (-)-105, но не ВНPI, ликвидирует, летальные, резистентные к терапии клетки рака молочной железы.

30 **Фигура 17.** Биолюминесцентная визуализация (BLI) с применением люциферазы продемонстрировала практическую ликвидацию резистентных к лечению TYS-luc опухолей молочной железы у мышей.

Фигура 18. (-)-105 убивает клетки рака молочной железы, резистентные к уничтожению с помощью ВНPI.

Фигура 19. (-)-105 потенциально активирует UPR, как показано путем индукции сплайсов ХВР-1 мРНК.

Фигура 20. (-)-105 является лучше по сравнению с ВНРІ для ингибирования синтеза белка в резистентных к лечению Caov-3 ER α

5 положительных клетках рака яичников.

Фигура 21. Блокирование эффлюкса кальция из эндоплазматического ретикулума с применением 2-APB ингибирует (-)-105-индуцированную смерть раковых клеток.

10 **Фигура 22.** -105 уменьшает внутриклеточные уровни АТФ; это уменьшение уровней АТФ блокируется путем инактивации SERCA насоса эндоплазматического ретикулума с помощью тапсигаргина.

Фигура 23. Блокирование снижения уровней АТФ с помощью тапсигаргина ингибирует -105 индуцированную смерть клеток.

15 **Фигура 24.** Сравнение способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать TDG клетки.

Фигура 25. Сравнение способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать TYS клетки.

Фигура 26. Сравнение способности тестируемых соединений 4, 6, 105 и ВНРІ убивать TYS клетки.

20 **Фигура 27.** Сравнение способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать T47D клетки.

Фигура 28. Ни тестируемые соединения, ни ВНРІ не убивают ER α отрицательные не образующие опухоли MCF-10A клетки молочной железы.

25 **Фигура 29.** Оценка способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать T47D клетки.

Фигура 30. Исследования зависимости доза-эффект для сравнения способности ВНРІ и тестируемых соединений ингибировать пролиферацию T47D, TYS и TDG клеток.

30 **Фигура 31.** (-)105 является чрезвычайно селективным по отношению к ER+ раковым клеткам, включая отн. смертельных ER+ мутантов.

Фигура 32. (-)105 имеет такой же механизм действия (МОА), как и ВНРІ.

Фигура 33. 105, но не ВНРІ, убивает резистентные к лечению CaOV-3 клетки рака яичников. ($\pm$)-105; Анализ клеточной смерти: Автоматизированное вытеснение трипанового синего. (24 часа после ($\pm$)-105)

Фигура 34. (-)105 практически уничтожает ER⁺ резистентные к лекарственным средствам опухоли. Модель ортотопического рака молочной железы, TYS-Luc клетки, 40 мг/кг (-)-105 в/б, ежедневно. Изображение через 7 дней после инъекции имеет более длительную экспозицию с большим усилением, чем изображение перед инъекцией.

Фигура 35. Экстра PPT препараты (-)-105 являются лучшими по сравнению с ВНPI в долгосрочных экспериментах симулирующей противораковой терапии. Клетки: T47D-люцифераза.

Фигура 36. Открытие **SERK-F6** (также известное как, C(-)-105, (-)-105, (R)-105, (-)-1, или (R)-1), соединение, которое убивает ER α -положительные раковые клетки. **a**, Химические структуры ВНPI и рацемического соединения **1** (то есть ($\pm$)-**1**), и их цитотоксическая активность на T47D клетках рака молочной железы после инкубаций в течение 24 часов с концентрациями, как указано в нМ. Клетки окрашивали с применением аннексина V-FITC и PI красителей перед анализом с помощью проточной цитометрии. Планки погрешности представляют С.О.С. 3 независимых повтора. **b**, **SERK-F6** является цитотоксическим по отношению к ER α -положительной клеточной линии, MCF-7, но имеет минимальные влияния на ER α -отрицательную клеточную линию, MDA-MB-231. Клетки инкубировали с **SERK-F6** или положительным контролем, Раптиналом, в течение 24 часов и затем окрашивали с применением аннексина V-FITC и PI красителей и анализировали с помощью проточной цитометрии. Планки погрешности представляют С.О.С. 3 независимых повтора. **c**, IC₅₀ значения для **SERK-F6** после инкубации в течение 24 часов на панели раковых клеточных линий, сгруппированных по их описанному ER α статусу. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью флуоресценции аламарового синего и устанавливали относительно контрольного наполнителя и количественного контроля гибели, леченных с применением Раптинала. Планки погрешности представляют С.О.С. 3 независимых экспериментов. **d**, Окрашивание T47D клеток с применением кристаллического фиолетового после инкубаций в течение 24 часов с соединениями и концентрациями, как указано. Изображения является репрезентативным для 2 независимых экспериментов. **e, f**, Долгосрочный эксперимент в культуре клеток с применением T47D, TDG, и TYS клеток. Клетки инкубировали в течение 2 недель с соединениями (1 мкМ), с

последующей промывкой соединения, и клетки культивировали в течение 2 месяцев. Число клеток определяли с помощью MTS.

Фигура 37. SERK-F6 является активным продуктом, который приводит к уничтожению ER α -положительных клеток. **a**, Исследование вытеснения трипанового синего после ингибирования в течение 24 часов с соединением для панели ER α -положительных клеточных линий. **b**, Долгосрочный эксперимент в культуре клеток с MCF-7, MDG, и MYS клетками, инкубированными с 1 мкМ ВНРІ или **SERK-F6**.

Фигура 38. SERK-F6 активирует ожидаемое заранее UPR. **a**, Индукция sp-XBP1 мРНК в T47D клетках в результате лечения с применением соединения после указанных периодов времени. ВНРІ и **SERK-F6** дозировали в количестве 1 мкМ. мРНК уровни количественно определяли с помощью ОТ-ПЦР. Планки погрешности представляют С.О.С. 6 биологических повторов. **b**, Внутриклеточные АТФ истощение (более подробно обсуждаемое в настоящей заявке), также необходимы данные T47D в настоящей заявке **c**, лечение с применением **SERK-F6** (1 мкМ) приводит к быстрому ингибированию синтеза белка в T47D клетках.

Фигура 39. SERK-F6 уничтожает ER α опухоли дикого типа с помощью гиперактивации aUPR. **a**, MCF-7 ортотопические опухоли перевивали Nu/J мышам после овариэктомии, дополненные с помощью 60-дневного E2 конгломерата клеток (0,36 мг) и выращивали до $\sim 400 \text{ мм}^3$ (28 дней до приживления), рандомизировали, после этого лечили с применением наполнителя ежедневно ($n = 3$), наполнителя еженедельно ($n = 3$), фульв. еженедельно (5 мг/мышь, п/к, $n = 6$), **SERK-F6** ежедневно (10 или 40 мг/кг п/о). Группы с наполнителем усредняли. p значения: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ****: $p \leq 0,0001$. Изображения опухолей отбирали после окончания исследования (день 21) и они были репрезентативными для всех опухолей ($n = 6$). **b-e**, MCF-7 клетки были ортотопически билатерально перевиты и опухоли росли до тех пор, пока общая опухолевая нагрузка не составляла $\sim 400 \text{ мм}^3$ перед ежедневным лечением с применением наполнителя или **SERK-F6** (40 мг/кг п/о). Мыши ($n = 5$ на группу) умертвляли через 3 дня (**b,c**) и 7 дней (**d,e**) и опухоли собирали. Опухолевая нагрузка представляли в виде суммы обеих опухолей (**b,d**). **c,e**, анализ вестерн-блотинг UPR маркеров, P-PERK и P-EIF2 α , а также ER α . Винкулин (Вин) использовали в качестве контроля нагрузки.

Представленные вестерн-блотинги являются репрезентативными для 4 технических повторов. E2 конгломераты клетки присутствуют во время осуществления всех представленных экспериментов. Планки погрешности представляют С.О.С.

5 **Фигура 40. SERK-F6** является переносимым, достигает биологически релевантных концентраций, и проникает через гематоэнцефалический барьер *in vivo*. **a**, Концентрации в сыворотке **SERK-F6** после указанных доз, пути введения и времени. Концентрацию определяли с помощью ЖХ/МС/МС анализа. Среднее 24-х часовое IC₅₀ для **SERK-F6** составляет 42 нМ. **b**, Рассчитанные
10 фармакокинетические параметры для **SERK-F6**. AUC: Площадь под фармакокинетической кривой, C_{max}: максимальная концентрация, t_{1/2}: период полувыведения. **c,d**, Мышей (CD-1) лечили с применением указанных доз и временных диапазонов, затем умертвляли и собирали их сыворотку и головной мозг. Концентрации определяли с помощью ЖХ/МС/МС анализа. Среднее
15 количество крови на мышь приблизительно составляло 58,5 мл/кг. **f-j**, лечение с применением **SERK-F6** мышей, несущих ортотопическую MCF-7 опухоль. **f**, Изменения опухоли в процентах при сравнении опухоли в День 0 и День 21 измерений. Леченные группы: наполнитель ежедневно (n = 3), наполнитель еженедельно (n = 3), фульв. еженедельно (5 мг/мышь, п/к, n = 6), **SERK-F6**
20 ежедневно (10 или 40 мг/кг п/о). Группы с наполнителем объединяли. **g**, Масса опухолей, собранных у мышей. **i**, наблюдаемый вес мыши во время этого MCF-7 исследования (n = 6). **i,j**, Измерения опухоли для MCF-7 билатеральной ортотопической модели (n = 4-5).

Фигура 41. SERK-F6 уничтожает мутантный ERα первичный и
25 метастатический рак молочной железы. **a-c**, TYS-luc. ортотопические опухоли перевивали NSG мышам после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, 60 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано (n = 5-6). **b**, репрезентативные примеры биолюминесцентных изображений мышей, леченных с применением **SERK-F6** (7 дней). **d,e**, TDG-luc. ортотопические опухоли
30 перевивали NSG мышам после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, 120 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано (n = 4-5). **e**, Биолюминесцентное изображение мышей, леченных с применением **SERK-F6**, с TDG-luc. опухолевой нагрузкой через 7 дней. **f**, MYS-luc. ортотопические опухоли у NSG мышей после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, 45

дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано ($n = 4-5$). **g**, MDG-luc. ортотопические опухоли у NSG мышей после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, 45 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано ($n = 4-5$). **h**, Метастатическая модель с MDG-luc. клетками, 5 инъекцированными в хвостовую вену NSG мышей после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, 1,5 месяца до приживления) и мышам дозировали ежедневно, как указано ($n = 4-5$).

Фигура 42. Результаты показывают, что **SERK-F6**-опосредованное уничтожение мутантных ER α зависит от количественной смерти клеток. **a**, 10 Лечение останавливали после 21 ежедневных доз **SERK-F6** (40 мг/кг в/б) и мышиную опухолевую нагрузку отслеживали с помощью биолуминесценции. **b, c** Вес мышей, несущих TYS опухоль, во время лечения с применением **SERK-F6**. **d**, У мышей с TYS опухолями, леченными с применением более низкой дозы **SERK-F6** (10 мг/кг п/о), происходил повторный рост опухоли, тем не менее 15 повторное лечение с применением **SERK-F6** при более высокой дозе (40 мг/кг п/о) приводило к полной регрессии. **e**, наблюдаемый вес мышей во время TDG модели. **f**, Мышей, несущих TDG, лечили в течение 14 календарных дней, и лечение приостанавливали, предоставляя возможность для наблюдения за 20 повторных ростом опухоли с помощью биолуминесцентной визуализации. **g**, TDG-luc., ортотопические опухоли перевивали NSG мышам после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, ~120 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано ($n = 5-6$). **h**, Мышей с TDG-luc. опухоли лечили с применением более низкой дозы **SERK-F6** (10 мг/кг п/о) повторный рост опухоли через 2 месяца отсутствия лечения, тем не менее, повторное лечение с 25 применением **SERK-F6** при более высокой дозе (40 мг/кг в/б) приводило к полной регрессии. Указанные планки погрешности представляют С.О.С.

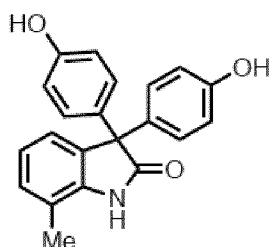
Фигура 43. **SERK-F6**-опосредованное уничтожение MYS/MDG опухолей зависит от количественной смерти клеток. **a-b**, MYS-luc. ортотопические 30 опухоли перевивали NSG мышам после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, ~45 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано ($n = 5-6$). **b**, Лечение MYS-luc. опухолей останавливали после 21 ежедневных доз **SERK-F6** и мышиную опухолевую нагрузку отслеживали с помощью биолуминесценции. В день 60, повторно выросшие опухоли лечили дозами **SERK-F6** (40 мг/кг в сутки в/б). **c**, репрезентативные биолуминесцентные

изображения. **c-d**, MDG-luc. ортотопические опухоли перевивали NSG мышам после овариэктомии (нет E2 конгломератов клеток, ~45 дней до приживления) и дозировали ежедневно, как указано ($n = 5-6$). Объем опухоли отслеживали с помощью общего потока фотонов. **d**, MDG-luc. Опухоли, леченные с применением 40 мг/кг **SERK-F6** п/о ежедневно, повторно вырастали после остановки лечения. Повторно выросшие опухоли повторно лечили с применением 40 мг/кг **SERK-F6** в/б и наблюдали регрессию опухоли.

Подробное описание изобретения

Раковые клетки могут оставаться покоящимися в течение длительного периода времени и затем реактивироваться. Следовательно, является желательным убивать опухолевые клетки, а не только предотвращать их пролиферацию. Это раскрытие также обеспечивает описание различных исследований для тестирования соединений относительно их способности убивать раковые клетки, такие как клетки рака молочной железы.

В настоящей заявке также были идентифицированы новые соединения, которые являются более эффективными по сравнению с ВНРІ для уничтожения клеток рака молочной железы, экспрессирующих как рецептор эстрогена дикого типа α ($ER\alpha$), так и $ER\alpha$ мутации, которые являются широко распространенными при метастатическом раке молочной железы. Эти мутации также связаны с резистентностью к существующим в настоящее время терапиям. Также в настоящей заявке идентифицированы соединения, активные по отношению к клеткам рака яичников, клеткам рака матки и другим раковым клеткам, которые содержат $ER\alpha$.



(ВНРІ)

Открытие соединения C(-)-105 структурно связано с ВНРІ. Было установлено, что абсолютная конфигурация левовращающего энантиомера открытого соединения 105 имеет (*R*)-конфигурацию (то есть, (*R*)-105). Было идентифицировано, что оно является цитотоксическим для раковым клеткам, но

не только путем ингибирования роста раковых клеток. Фенотип (R)-105 убивает раковые клетки и, в свою очередь, опухоли. Это открытие является неожиданным с учетом соединений ВНРІ, фулвестранта, тамоксифена и 01-15, поскольку они не убивают раковые клетки. Эти соединения только замедляют
 5 рост раковых клеток, то есть, они являются цитостатическими. Таким образом, (R)-105 был идентифицирован по его отличающемуся цитотоксическому профилю и способности количественно убивать раковые клетки *in-vitro*. Данные, собранные на основании дополнительных исследований *in-vivo*, подтверждают эффективность соединения по отношению к регрессии опухоли.

Определения

Следующие определения включены для обеспечения ясного и согласующегося понимания описания изобретения и пунктов формулы изобретения. Как используется в настоящей заявке, перечисленные термины
 15 имеют следующие значения. Все другие термины и фразы, используемые в настоящем описании, имеют их общепринятое значение, как понимается квалифицированным специалистом в данной области техники. Такие общепринятые значения можно найти в технических словарях по ссылкам, таких как *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* 14-ое издание, под ред. R.J. Lewis,
 20 John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001.

При ссылках в описании на "один вариант осуществления", "вариант осуществления", и т.д., указывается, что описанный вариант осуществления может включать предпочтительный аспект, характерный признак, структуру, часть или характеристику, но каждый вариант осуществления необязательно
 25 будет включать этот аспект, характерный признак, структуру, часть или характеристику. Кроме того, такие фразы могут относиться, необязательно, к такому же варианту осуществления, упоминаемому в других частях описания. Кроме того, если предпочтительный аспект, характерный признак, структура, часть или характеристика описан (а) в связи с вариантом осуществления, то в
 30 компетенции квалифицированного специалиста в данной области техники задействовать или связать такой аспект, характерный признак, структуру, часть или характеристику с другими вариантами осуществления, если они конкретно описаны или не описаны.

Признаки, представленные в единственном числе, включают множественное число, если из контекста очевидно не следует другое. Таким образом, например, ссылка на "соединение" включает множество таких соединений, например, соединение X включает множество соединений X.

5 Следует дополнительно отметить, что пункты формулы изобретения могут составляться для исключения любого необязательного элемента. Как таковое, это указание предназначено для того, чтобы находиться в качестве предшествующего основания для применения исключительной терминологии, такой как "исключительно," "только," и другие, в связи с любым элементом, 10 описанным в настоящей заявке, и/или раскрытия элементов пункта или применения "негативных" ограничений.

Термин "и/или" обозначает любой один из признаков, любую комбинацию признаков, или все такие признаки, которые связаны с этим термином. Фразы "один или несколько" и "по меньшей мере один" понятны квалифицированному 15 специалисту в данной области техники, в особенности при прочтении контекста, в котором они упоминаются. Например, фраза может обозначать один, два, три, четыре, пять, шесть, десять, 100 или любой верхний предел приблизительно в 10, 100, или 1000 раз выше, чем процитированный нижний предел. Например, один или несколько заместителей на фенильном кольце относится к одному - 20 пяти заместителям на кольце.

Как понятно квалифицированному специалисту в данной области техники, все числа, включая те, которые представляют количества компонентов, свойства, такие как молекулярный вес, условия реакции и т.д., являются 25 приблизительно величинами и понимаются как необязательно модифицированы во всех случаях с помощью термина "приблизительно." Эти значения могут изменяться в зависимости от желательных свойств, которые, по мнению квалифицированных специалистов в данной области техники, должны быть получены при использовании сведений, раскрытых в настоящей заявке. Также полагают, что такие значения в действительности содержат вариации, 30 обязательно возникающие вследствие стандартных отклонений, обнаруженных при их соответствующих тестирующих измерениях. Если значения представлены в виде приближений, путем применения предшествующего "приблизительно", то следует понимать, что конкретное значение без модификатора "приблизительно" также составляет дальнейший аспект.

Термины "приблизительно" и "около" используются взаимозаменяемо.

Оба термина могут относиться к вариации $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, или $\pm 25\%$ указанного значения. Например, "приблизительно 50" процентов в некоторых вариантах осуществления может нести вариацию от 45 до 55 процентов, или как в других случаях определяется в конкретном пункте формулы изобретения. Для диапазонов целых чисел, термин "приблизительно" может включать одно или два целых числа, больше и/или меньше указанного целого числа в каждом конце диапазона. Если специально в настоящей заявке не указано иначе, то термины "приблизительно" и "около" предназначены для охватывания значений, например, проценты по весу, находящиеся вблизи указанного диапазона, которые являются эквивалентными в контексте функциональности индивидуального компонента, композиции, или варианта осуществления. Термины "приблизительно" и "около" также могут модифицировать конечные точки указанного диапазона, как обсуждалось выше в данном абзаце.

Как понимается квалифицированным специалистом в данной области техники, для любой и всех целей, в особенности терминов, представленных в описании, все указанные диапазоны, процитированные в настоящей заявке, также охватывают любой и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов, а также индивидуальные значения, составляющие диапазон, в особенности целочисленные значения. Таким образом, следует понимать, что также охватывается каждая единица между двумя предпочтительными единицами. Например, если указано от 10 до 15, то 11, 12, 13 и 14 также охватываются, индивидуально, и в виде части диапазона. Указанный диапазон (например, проценты по весу или углеродные группы) включают каждое специфическое значение, целое число, десятичное число или единичный элемент в пределах диапазона. Любой перечисленный диапазон легко может быть распознан как в достаточной степени описывающий и предоставляющий возможность разбития указанного диапазона на по меньшей мере равные половины, трети, четверти, пятые или десятые части. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, обсуждаемый в настоящей заявке, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть, и т.д. Как также понятно для квалифицированного специалиста в данной области техники, все выражения, такие как "вплоть до", "по меньшей мере", "больше чем", "меньше чем", "более чем", "или более", и другие, включают

указанное число и такие термины относятся к диапазонам, которые впоследствии могут быть разбиты над поддиапазоны, как обсуждалось выше. Аналогичным образом, все соотношения, процитированные в настоящей заявке, также включают все под-соотношения, подпадающие под более широкое соотношение. Следовательно, специфические значения, указанные для радикалов, заместителей и диапазонов представлены только с целью иллюстрации; они не исключают другие определённые значения или другие значения в пределах определенных диапазонов для радикалов и заместителей. Также следует принять во внимание, что конечные точки каждого из диапазонов являются важными как в отношении с другой конечной точкой, так и независимо от другой конечной точки.

Квалифицированный специалист в данной области техники также легко распознает, что в тех случаях, когда представители сгруппированы вместе общепринятым образом, например, как в группе Маркуша, то изобретение охватывает не только цельную перечисленную группу в целом, но и каждый представитель группы индивидуально и все возможные подгруппы основной группы. Дополнительно, для всех целей, изобретение охватывает не только основную группу, но также и основную группу, в которой отсутствует один или несколько представителей группы. Следовательно, изобретение охватывает явно указанное исключение любого одного или нескольких представителей указанной группы. Таким образом, могут применяться специальные условия к любым указанным категориям или вариантам осуществления, посредством чего любой один или несколько процитированных элементов, видов или вариантов осуществления, могут быть исключены из таких категорий или вариантов осуществления, например, для применения в точно сформулированном отрицательном ограничении.

Термин "контактирование" относится к действию соприкосновения, осуществления контакта, или приведения в непосредственную или очень тесную близость, включая на клеточном или молекулярном уровне, например, для реализации физиологической реакции, химической реакции, или физиологического изменения, например, в растворе, в реакционной смеси, *in vitro*, или *in vivo*.

"Эффективное количество" относится к количеству, эффективному для лечения заболевания, нарушения и/или состояния, или для реализации

указанного эффекта. Например, эффективное количество может представлять собой количество, эффективное для уменьшения прогрессирования или тяжести состояния или симптомов, подвергаемых лечению. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции квалифицированных специалистов в данной области техники. Термин "эффективное количество" охватывает количество соединения, описанного в настоящей заявке, или количество комбинации соединений, описанных в настоящей заявке, например, которое эффективно для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, или для лечения симптомов заболевания или нарушения, у хозяина. Таким образом, "эффективное количество" в целом обозначает количество, которое обеспечивает желательный эффект.

Альтернативно, термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", как используется в настоящей заявке, относятся к достаточному количеству агента или композиции или комбинации композиций, которое (ые) вводят, которые будут облегчать до некоторой степени один или несколько симптомов заболевания или состояния, подвергаемого лечению. Результатом может являться уменьшение и/или облегчение признаков, симптомов или причин заболевания, или любое желательное изменение биологической системы. Например, "эффективное количество" для терапевтических применений представляет собой количество композиции, содержащей соединение, как описано в настоящей заявке, необходимое для обеспечения клинически достоверного снижения симптомов заболевания. Подходящее "эффективное" количество в любом индивидуальном случае может быть определено, используя методики, такие как исследование эскалации дозы. Дозу можно вводить за одно или несколько введений. Однако точное определение, какую дозу можно принимать за эффективную дозу, может основываться на факторах, индивидуальных для каждого пациента, включая, но не ограничиваясь только ими, возраст пациента, размер, тип или степень выраженности заболевания, стадию заболевания, путь введения композиций, тип или степень используемой дополнительной терапии, прогрессирования существующего заболевания и тип желательного лечения (например, агрессивное отн. общепринятого лечения).

Термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" включают (I) предотвращение возникновения заболевания, патологического или

медицинского состояния (например, профилактику); (II) ингибирование заболевания, патологического или медицинского состояния или остановку его развития; (III) облегчение заболевания, патологического или медицинского состояния; и/или (IV) ослабление симптомов, связанных с заболеванием, патологическим или медицинским состоянием. Таким образом, термины "лечить", "лечение", и "осуществление лечения" могут охватывать профилактику и могут включать предотвращение, предупреждение, профилактику, снижение, остановку или обратное развитие прогрессирования или тяжести состояния или симптомов, подвергаемых лечению. Как таковой, термин "лечение" может включать медицинское, терапевтическое и/или профилактическое введение, если это является подходящим.

Как используется в настоящей заявке, "субъект" или "пациент" обозначает особь, имеющую симптомы, или риск развития заболевания или другой злокачественной патологии. Пациентом может быть человек или не принадлежащий к человеческому роду и может включать, например, виды животных или типы, используемые в качестве "модельных систем" для исследовательских целей, такая мышинная модель, как описано в настоящей заявке. Аналогичным образом, пациент может включать либо взрослых особей или молодых особей (*например*, детей). Кроме того, пациент может обозначать любой живой организм, предпочтительно млекопитающее (*например*, человек или не принадлежащий к человеческому роду), который может получать преимущество от введения композиций, раскрытых в настоящей заявке.

Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваясь только ими, любой представитель класса млекопитающих: люди, нечеловеческие приматы, такие как шимпанзе, и другие виды высших обезьян и обезьян; сельскохозяйственные животные, такие как крупный рогатый скот, кони, овцы, козы, свиньи; домашние животные, такие как кролики, собаки и коты; лабораторные животные, включая грызунов, такие как крысы, мыши и морские свинки и др. Примеры немлекопитающих включают, но не ограничиваясь только ими, птицы, рыбы и другие. В одном варианте осуществления способов, описанных в настоящей заявке, млекопитающее представляет собой человека.

Как используется в настоящей заявке, термины "обеспечение", "введение," "интродуцирование" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к помещению заявленных композиций в субъект с

помощью способа или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации композиции в желательном сайте. Композиции могут вводиться с помощью любого подходящего пути, который приводит к доставке в желательную локализацию у субъекта.

5 Композиции, описанные в настоящей заявке, могут вводиться с дополнительными композициями для пролонгирования стабильности и активности композиций, или в комбинации с другими терапевтическими лекарственными средствами.

10 Термины "ингибировать", "ингибирование" и "ингибирующее" относятся к замедлению, остановке или предотвращению роста или прогрессирования заболевания, инфекции, состояния или группы клеток. Ингибирование может быть больше, чем приблизительно 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, или 99%, например, по сравнению с ростом или прогрессированием, которое происходит при отсутствии лечения или контактирования.

15 Термин "по существу", как используется в настоящей заявке, является широким термином и используется в его общепринятом значении, включая, без ограничений, большую часть, но не обязательно полностью указанный признак. Например, термин может относиться к числовому значению, которое может не составлять 100% полного числового значения. Полное числовое значение может
20 быть меньше на приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, или приблизительно 20%.

Настоящее изобретение обеспечивает способы получения соединений и
25 композиций согласно изобретению. Соединения и композиции могут быть получены с помощью любой из приемлемых технологий, описанных в настоящей заявке, необязательно в комбинации со стандартными технологиями органического синтеза. Многие технологии, такие как этерификация и эстерификация хорошо известны в данной области техники. Тем не менее,
30 многие из этих технологий описаны в Compendium of Organic Synthetic Methods (John Wiley & Sons, New York), том 1, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1971; том 2, Ian T. Harrison и Shuyen Harrison, 1974; том 3, Louis S. Hegedus and Leroy Wade, 1977; том 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; том 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; и том 6; а также стандартных органических ссылочных текстах, таких как March's

Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5-ое изд., под ред. M. B. Smith and J. March (John Wiley & Sons, New York, 2001);

Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. в 9 томах, Barry M. Trost, главный редактор (Pergamon Press, New York, опубликовано в 1993 г.); Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, Второе издание, Cary and Sundberg (1983);

Формулы и соединения, описанные в настоящей заявке, могут быть модифицированы, используя защитные группы. Подходящие amino и карбокси защитные группы известны квалифицированным специалистам в данной области техники (см., например, Protective groups in Organic Synthesis, Второе издание, Greene, T. W., и Wutz, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, и ссылках, процитированных в этом источнике; Philip J. Kocienski; Protective groups (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994), и ссылках, процитированных в этом источнике); и Comprehensive Organic Transformations, Larock, R. C., Второе издание, John Wiley & Sons, New York (1999), и ссылках, процитированных в этом источнике.

Как используется в настоящей заявке, термин "замещенный" или "заместитель" предназначен для обозначения того, что один или несколько (например, 1-20 в различных вариантах осуществления, 1-10 в других вариантах осуществления, 1, 2, 3, 4 или 5; в некоторых вариантах осуществления 1, 2 или 3; и в других вариантах осуществления 1 или 2) водородов на группе, указанной в выражении, используя "замещенный" (или "заместитель") заменены выбором из указанной (ых) группы (групп), или на подходящую группу, известную квалифицированным специалистам в данной области техники, при условии, что нормальная валентность указанного атома не превышает, и что замещение приводит к образованию стабильного соединения. Подходящие указанные группы включают, например, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, гало, галоалкил, гидроксид, гидроксидалкил, арил, гетероарил, гетероцикл, циклоалкил, алканонил, алкоксикарбонил, амино, алкиламино, диалкиламино, трифторметилтио, дифторметил, ациламино, нитро, трифторметил, трифторметокси, карбокси, карбоксиалкил, кето, тиоксо, алкилтио, алкилсульфинил, алкилсульфонил, и циано. Дополнительно, неограничивающие примеры заместителей, которые могут быть связаны с замещенным углеродом (или другим) атомом, включают F, Cl, Br, I, OR', OC(O)N(R')₂, CN, CF₃, OCF₃, R', O, S, C(O), S(O), метилendiокси,

этилендиокси, $N(R')_2$, SR' , SOR' , SO_2R' , $SO_2N(R')_2$, SO_3R' , $C(O)R'$, $C(O)C(O)R'$, $C(O)CH_2C(O)R'$, $C(S)R'$, $C(O)OR'$, $OC(O)R'$, $C(O)N(R')_2$, $OC(O)N(R')_2$, $C(S)N(R')_2$, $(CH_2)_{0-2}NHC(O)R'$, $N(R')N(R')C(O)R'$, $N(R')N(R')C(O)OR'$, $N(R')N(R')CON(R')_2$, $N(R')SO_2R'$, $N(R')SO_2N(R')_2$, $N(R')C(O)OR'$, $N(R')C(O)R'$, $N(R')C(S)R'$,
 5 $N(R')C(O)N(R')_2$, $N(R')C(S)N(R')_2$, $N(COR')COR'$, $N(OR')R'$, $C(=NH)N(R')_2$, $C(O)N(OR')R'$, или $C(=NOR')R'$, где R' может представлять собой водород или компонент на основе углерода, и где компонент на основе углерода сам может быть дополнительно замещен. Если заместитель является моновалентным, такой как, например, F или Cl, он связывается с атомом путем замещения единичной
 10 связи. Если заместитель является больше, чем моновалентным, такой как O, который является двухвалентным, то он может связываться с атомом путем замещения его больше одной связи, то есть, двухвалентный заместитель связывается с помощью двойной связи; например, C, замещенный с помощью O, образует карбонильную группу, $C=O$, где C и O связаны двойной связью.

15 Альтернативно, двухвалентный заместитель, такой как O, S, $C(O)$, $S(O)$, или $S(O)_2$, может быть связан с помощью двух простых связей с двумя различными атомами углерода. Например, O, двухвалентный заместитель, может быть связан с каждым из двух смежных атомов углерода с образованием эпоксидной группы, или O может образовывать мостиковую эфирную группу между смежными или
 20 несмежными атомами углерода, например, соединяя мостиком 1,4-углероды циклогексильной группы с образованием [2.2.1]-оксабицикло системы. Кроме того, любой заместитель может быть связан с углеродом или другим атомом с помощью линкера, такого как $(CH_2)_n$ или $(CR'_2)_n$, где n представляет собой 1, 2, 3 или больше, и каждый R' выбирают независимо.

25 Термин "гало-" или "галогенид" относится к фтор-, хлор-, бром- или йод-. Подобным образом, термин "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду.

Термин "алкил" относится к разветвленному или неразветвленному углеводороду, имеющему, например, 1-20 атомов углерода, и часто 1-12, 1-10, 1-8, 1-6 или 1-4 атомов углерода. Как используется в настоящей заявке, термин
 30 "алкил" также охватывает "циклоалкил", определенный ниже. Примеры включают, но не ограничиваясь только ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил (*изо*-пропил), 1-бутил, 2-метил-1-пропил (*изобутил*), 2-бутил (*втор*-бутил), 2-метил-2-пропил (*трет*-бутил), 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил,

2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил, 3,3-диметил-2-бутил, гексил, октил, децил, додецил, и др. Алкил может быть незамещенным или замещенным, например, с помощью заместителя, описанного ниже. Алкил также может быть
 5 необязательно частично или полностью ненасыщенным. Как таковые, перечисление алкильной группы может включать как алкенильные, так и алкинильные группы. Алкил может представлять собой моновалентный углеводородный радикал, как описано и проиллюстрировано примерами выше, или он может представлять собой двухвалентный углеводородный радикал (то
 10 есть, алкилен).

Термин "циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, например, от 3 до 10 атомов углерода, имеющим единственное циклическое кольцо или множественные конденсированные кольца. Циклоалкильные группы включают, в качестве примера, однокольцевые структуры, такие как
 15 циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил, и др., или структуры с множественными кольцами, такие как адамантил, и др. Циклоалкил может быть незамещенным или замещенным. Циклоалкильная группа может быть моновалентной или двухвалентной и необязательно может быть замещена, как описано для алкильных групп. Циклоалкильная группа необязательно может
 20 включать один или несколько сайтов ненасыщенности, например, циклоалкильная группа может включать один или несколько углерод-углеродных двойных связей, такие как, например, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-цилогекс-1-енил, 1-цилогекс-2-енил, 1-цилогекс-3-енил, и др.

Термин "гетероциклоалкил" или "гетероциклил" относится к насыщенному или частично насыщенному моноциклическому, бициклическому или полициклическому кольцу, содержащему по меньшей мере один гетероатом, выбранный из азота, серы, кислорода, предпочтительно от 1 до 3 гетероатомов в по меньшей мере одном кольце. Каждое кольцо предпочтительно имеет от 3 до
 30 10 членов, более предпочтительно от 4 до 7 членов. Примеры подходящих гетероциклоалкильных заместителей включают пирролидил, тетрагидрофурил, тетрагидротииофуранил, пиперидил, пиперазил, тетрагидропиранил, морфолино, 1,3-диазапан, 1,4-диазапан, 1,4-оксазепан, и 1,4-оксатиапан. Группа может быть концевой группой или мостиковой группой.

Термин "ароматический" относится либо к арильной или гетероарильной группе или заместителю, как описано в настоящей заявке. Дополнительно, ароматический компонент может представлять собой бисароматический компонент, трисароматический компонент, и т.д. Бисароматический компонент имеет простую связь между двумя ароматическими компонентами, такой как, но не ограничиваясь только ими, бифенил, или бипиридин. Подобным образом, трисароматический компонент имеет простую связь между каждым ароматическим компонентом.

Термин "арил" относится к ароматической углеводородной группы, полученной при удалении по меньшей мере одного атома водорода из единственного атома углерода родительской ароматической кольцевой системы. Сайт присоединения радикала может находиться на насыщенном или ненасыщенном атоме углерода родительской кольцевой системы. Арильная группа может иметь от 6 до 30 атомов углерода, например, приблизительно 6-10 атомов углерода. В других вариантах осуществления, арильная группа может иметь от 6 до 60 атомов углерода, от 6 до 120 атомов углерода, или от 6 до 240 атомов углерода. Арильная группа может иметь единственное кольцо (например, фенил) или множественные конденсированные (сопряженные) кольца, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим (например, нафтил, дигидрофенантренил, фторфенил или антрил). Типичные арильные группы включают, но не ограничиваясь только ими, радикалы, производные от бензола, нафталина, антрацена, бифенила и др. Арил может быть незамещенным или необязательно замещенным.

Термин "гетероарил" относится к моноциклической, бициклической или трициклической кольцевой системе, содержащей одно, два или три ароматических кольца и содержащей по меньшей мере один атом азота, кислорода или серы в ароматическом кольце. Гетероарил может быть незамещенным или замещенным, например, с помощью одного или нескольких, и, в частности, от одного до трех, заместителей, как описано в определении "замещенный". Типичные гетероарильные группы содержат 2-20 атомов углерода в циклическом скелете дополнительно к одному или нескольким гетероатомам. Примеры гетероарильных групп включают, но не ограничиваясь только ими, 2Н-пирролил, 3Н-индолил, 4Н-хинолизинил, акридинил, бензо[b]тиенил, бензотиазолил, β -карболинил, карбазолил, хроменил,

циннолинил, дибензо[b,d]фуранил, фуразанил, фурил, имидазолил, имидозолил, индазолил, индолизинил, индолил, изобензофуранил, изоиндолил, изохинолил, изотиазолил, изоксазолил, нафтиридирил, оксазолил, перимидинил, фенантридинил, фенантролинил, фенарсазинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатиинил, феноксазинил, фталазинил, птеридинил, пуририл, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридил, пиримидинил, пирролил, хиназолинил, хинолил, хиноксалинил, тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, триазолил, тетразолил и ксантенил. В одном варианте осуществления термин "гетероарил" обозначает моноциклическое ароматическое кольцо, содержащее пять или шесть кольцевых атомов, содержащих углерод и 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из непероксидного кислорода, серы, и N(Z), где Z отсутствует или представляет собой H, O, алкил, арил, или (C₁-C₆)алкиларил. В некоторых вариантах осуществления, гетероарил обозначает орто-сопряженный бициклический гетероцикл из приблизительно от восьми до десяти кольцевых атомов, имеющих происхождение из него, в особенности бенз-производное или одно производное путем слияния пропиленового, триметиленового или тетраметиленового дирадикала к нему.

Термин "энантиомерно обогащенный" ("эо"), как используется в настоящей заявке, относится к смесям, которые имеют один энантиомер, присутствующий в большем количестве по сравнению с другим. Реакции, которые обеспечивает один энантиомер, присутствующий в большем количестве по сравнению с другим, следовательно, будут "энантиоселективными" (или проявлять "энантиоселективность"). В одном варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 2% эо; в другом варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 5% эо; в другом варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 20%; в другом варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 50%; в другом варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 80%; в другом варианте осуществления изобретения, термин "энантиомерно обогащенный" относится к смеси, имеющей

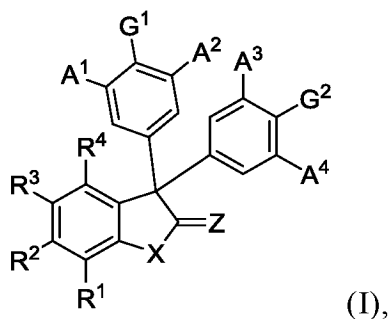
по меньшей мере приблизительно 90%; в другом варианте осуществления изобретения, термин “энантиомерно обогащённый” относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 95%; в другом варианте осуществления изобретения, термин “энантиомерно обогащённый” относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 98%; в другом варианте осуществления изобретения, термин “энантиомерно обогащённый” относится к смеси, имеющей по меньшей мере приблизительно 99%. Термин “энантиомерно обогащённый” включает энантиомерно чистые смеси, которые представляют собой смеси, которые по существу не содержат виды с противоположной оптической активностью или один энантиомер присутствует в чрезвычайно низких количествах, например, 0,01%, 0,001% или 0,0001%.

Термин “IC₅₀” обычно определяется как концентрация, необходимая для уничтожения 50% клеток в течение 24 часов.

Для всего настоящего раскрытия, термин “(-)-105”, который относится к левовращающему энантиомеру соединения 105, может использоваться взаимозаменяемо с терминами C(-)-105, (-)-1, (R)-105, (R)-1, или SERK-F6. Подобно этому, (+)-105 представляет собой правовращающий энантиомер, также известен как (S)-105, (S)-1 или (+)-1. Также, термин “(±)-105”, который относится к рацемату соединения 105, может использоваться взаимозаменяемо с термином (±)-1.

Варианты осуществления в соответствии с изобретением

Настоящее изобретение обеспечивает различные варианты осуществления соединения Формулы I:



или его соль или сольват; где

R¹, R², R³ и R⁴ представляют собой каждый независимо H, гало, -OR^A, -SR^A, -N(R^A)₂, алкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил;

A^1 , A^2 , A^3 и A^4 представляют собой каждый независимо H, гало, или алкил;

G^1 представляет собой гало, $-OR^B$, $-SR^B$, $-S(=O)_2R^B$, или алкил;

G^2 представляет собой гало, $-OR^C$, $-SR^C$, $-S(=O)_2R^C$, или алкил;

5 X и Z представляют собой каждый независимо O, S, или $-NR^D$; и R^A , R^B , R^C и R^D представляют собой каждый независимо H или алкил, где, если присутствуют, $-OR^B$ и $-OR^C$ оба не представляют собой $-OH$;

где каждый алкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил

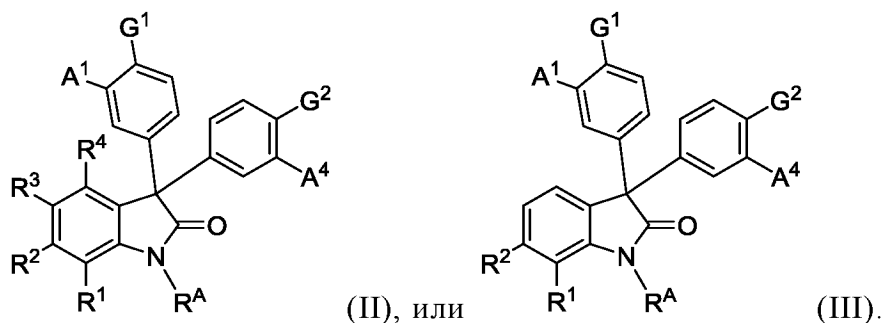
10 необязательно замещены одним или несколькими заместителями.

В различных вариантах осуществления Формул I-IV, описанных в настоящей заявке, R^5 представляет собой заместитель в положении *орто* к A^1 . В различных вариантах осуществления, R^6 представляет собой заместитель в положении *орто* к A^2 . В различных вариантах осуществления, R^7 представляет собой заместитель в положении *орто* к A^3 . В различных вариантах осуществления, R^8 представляет собой заместитель в положении *орто* к A^4 . В различных вариантах осуществления, R^5 , R^6 , R^7 и R^8 представляют собой каждый независимо H, гало, $-OR^A$, $-SR^A$, $-N(R^A)_2$, алкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил.

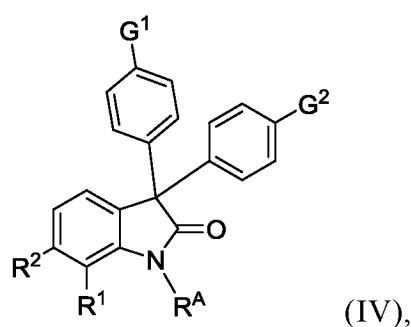
20 В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой (*S*)-энантиомер. В других вариантах осуществления, соединение представляет собой (*R*)-энантиомер. В дополнительных вариантах осуществления, R^A , R^B , R^C и R^D представляют собой каждый независимо H или $-(C_1-C_6)$ алкил, и R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой каждый независимо H, гало, или $-(C_1-C_6)$ алкил. В некоторых других вариантах осуществления, A^1 , A^2 , A^3 и A^4 представляют собой каждый независимо H или гало, и G^1 представляет собой $-OR^B$. В дальнейших вариантах осуществления, X представляет собой $-NR^D$ и Z представляет собой O. В дальнейших вариантах осуществления, R^A , R^B , R^C , R^D , R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой каждый независимо $-(C_2-C_6)$ алкил, $-(C_3-C_6)$ алкил, или $-(C_3-C_6)$ циклоалкил.

В различных дополнительных вариантах осуществления, R^1 представляет собой CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , или CF_2CF_3 . В еще других дополнительных вариантах осуществления, G^1 представляет собой $-OR^B$, и R^B представляет собой H, CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , или CF_2CF_3 .

В дальнейших вариантах осуществления, соединение представляет собой соединение Формулы II или Формулы (III):



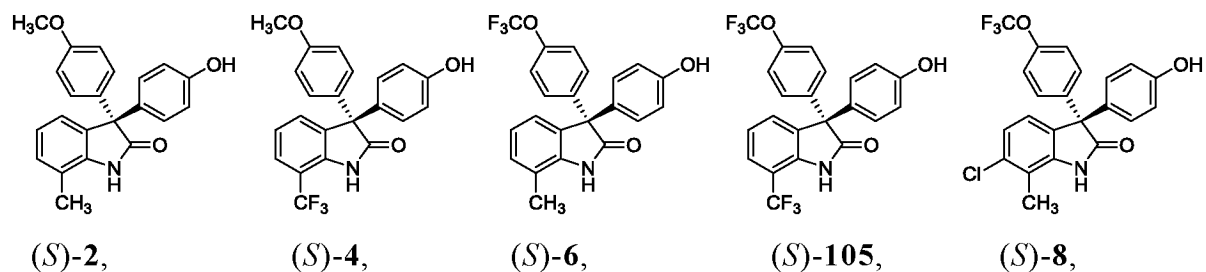
В некоторых других вариантах осуществления, соединение представляет собой соединение Формулы IV:

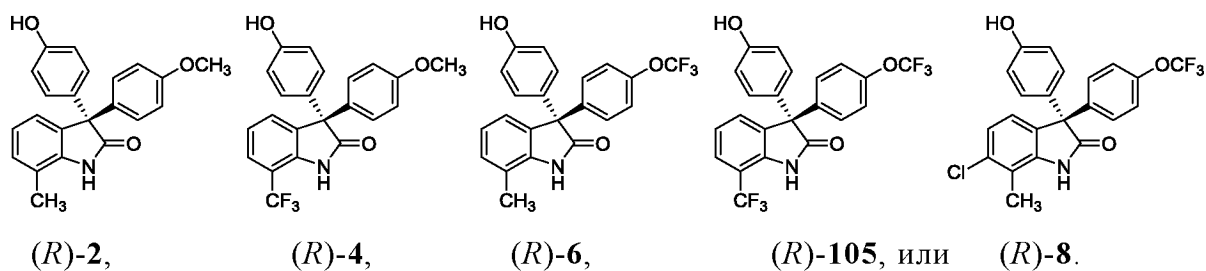


где G^1 представляет собой $-OR^B$, и R^B и R^1 представляют собой каждый независимо алкил или циклоалкил, где алкил и циклоалкил необязательно замещены одной или несколькими гало группами.

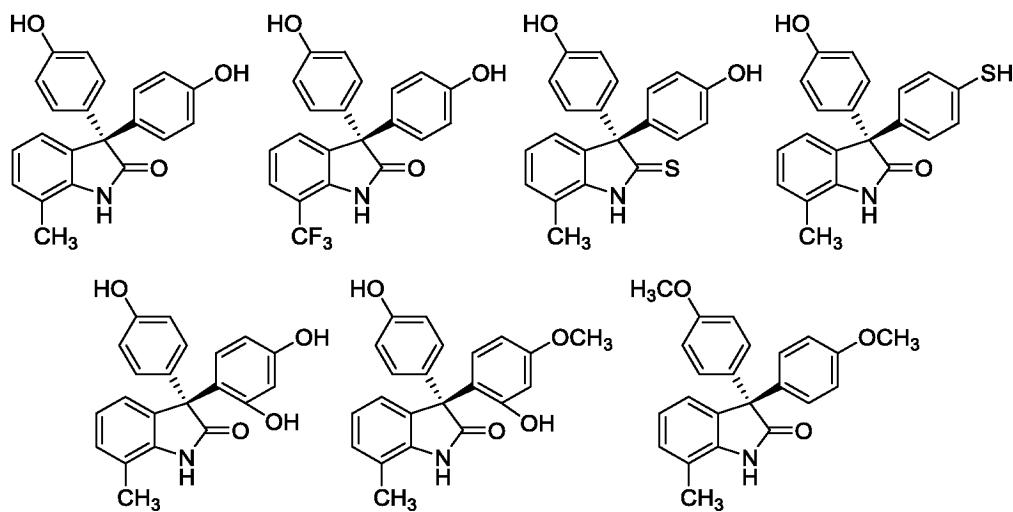
В различных других вариантах осуществления, один или несколько атомов водорода представляют собой дейтерий или тритий, один или несколько атомов углерода представляют собой изотоп углерода, или их комбинацию.

В еще других вариантах осуществления, соединение представляет собой любое из соединений (*S*)- или (*R*)-2, 4, 6, 8 или 105:





В дополнительных вариантах осуществления, соединение представляет собой любое из представленных соединений:



или их энантиомер.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, соединение является левовращающим. В других вариантах осуществления, соединение является правовращающим. В других вариантах осуществления, соединение (*R*)-105 или (*S*)-105. В еще других вариантах осуществления, соединение (*R*)-105.

В других дополнительных вариантах осуществления, соединение (энантиомер или рацемат) имеет связывающую аффинность к альфа-рецептору эстрогена($ER\alpha$), и IC_{50} связывающей аффинности составляет менее, чем приблизительно 500 нМ. В других вариантах осуществления IC_{50} для $ER\alpha$ составляет от приблизительно 1 пМ до приблизительно 1000 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 750 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 250 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 500 нМ, или от приблизительно 10 нМ до приблизительно 5000 нМ. В различных других вариантах осуществления, соединение убивает или ингибирует рост раковых клеток путем гиперактивации реакции на несложные белки (UPR) в эндоплазматическом ретикулуле. В дальнейших вариантах осуществления, раковые клетки представляют собой $ER\alpha$ положительные раковые клетки. В

некоторых других вариантах осуществления, раковые клетки представляют собой клетки рака молочной железы, клетки рака яичников, или клетки рака эндометрия.

5 Изобретение также обеспечивает композицию, содержащую соединение, описанное в настоящей заявке, и второе лекарственное средство. Раскрытие дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую соединение в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, наполнителем или буфером. В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции, соединение представляет собой рацемическую
10 смесь (*R*)-**105** и (*S*)-**105**. В различных вариантах осуществления, рацемическая смесь соединений представляет собой смесь энантиомеров, где смесь энантиомеров имеет соотношение приблизительно 50:50, приблизительно 45:55, приблизительно 40:60, приблизительно 30:70, приблизительно 20:80, приблизительно 10:90, или приблизительно 5:95.

15 Раскрытие дополнительно обеспечивает способ лечения рака, включающий введение субъекту с ER α положительным раком, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества соединения, таким образом осуществляя лечения рака у субъекта. В дальнейших вариантах осуществления, соединение убивает или ингибирует рост ER α положительного рака путем
20 гиперактивации реакции на несложные белки (UPR) в эндоплазматическом ретикулуме. В других вариантах осуществления, соединение представляет собой рацемическую смесь (*R*)-**105** и (*S*)-**105**. В других вариантах осуществления, ER α положительный рак представляет собой рак молочной железы, рак яичников, рак матки, карциному шейки матки или рак эндометрия.

25 Раскрытие дополнительно обеспечивает применение соединения для лечения ER α положительного заболевания у субъекта, который в этом нуждается, где терапевтически эффективное количество соединения вводят субъекту, таким образом осуществляя лечения рака у субъекта. В различных вариантах осуществления, ER α положительное заболевание представляет собой
30 ER α положительный рак. В других вариантах осуществления, ER α положительный рак представляет собой рак молочной железы, рак яичников, рак матки, карциному шейки матки или рак эндометрия. В дополнительных вариантах осуществления, соединение вводят перорально, путем инъекции,

подкожно, сублингвально, ректально, путем инфузии, внутривенно, путем кожной абсорбции, или через полость тела или отверстие.

Настоящее изобретение обеспечивает диапазоны, пределы и отклонения от переменных, таких как объем, масса, процентные значения, соотношения и т.д. Для квалифицированного специалиста в данной области техники понятно, что диапазон, такой как от “число1” до “число2”, охватывает непрерывный диапазон чисел, который включает целые числа и дробные числа. Например, от 1 до 10 обозначает 1, 2, 3, 4, 5, ... 9, 10. Он также обозначает 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; ..., 9,8; 9,9; 10,0; и также обозначает 1,01; 1,02; 1,03; и т.д. Если описанная переменная величина представляет собой число, меньше чем “число10”, то она охватывает непрерывный интервал, который включают целые числа и дробные числа, меньше, чем число10, как обсуждается выше. Сходным образом, если описанная переменная величина представляет собой число, больше чем “число10”, то она охватывает непрерывный интервал, который включают целые числа и дробные числа, больше, чем число10. Эти диапазоны могут быть модифицированы с применением термина “приблизительно”, значение которого было описано выше.

Результаты и обсуждение

Использовали систему генной инженерии CRISPR/Cas9 для замены ER α дикого типа в T47D клетках рака молочной железы человека на две наиболее распространенные ER α мутации, наблюдаемые при метастатическом раке молочной железы, ER α Y537S и ER α D538G. Полученные клеточные линии TYS-4 (также называемая TYS) и TDG-1 (также называемая TDG) (T47DER α Y537S клон 4 и T47DER α D538G клон 1) проявляют существенную резистентность к тамоксифену (активная форма тамоксифена представляет собой z-4-гидрокситамоксифен; z-OHT) и к фулвестранту/ICI. (Мао и др., 2016).

Для предоставления возможности визуализации опухолей, заякоривающих эти мутации у живых животных, выделяли линии клонов TYS и TDG клеток, стабильно экспрессирующие люциферазу светляков. Ортотопические мышинные опухоли, содержащие эти TYS-Luc и TYDG-Luc клетки, визуализировали у живых животных с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI). В связи с тем, что система визуализации *in vivo* (In Vivo Imaging System (IVIS)) имела предел обнаружения больше, чем 10000-кратный, и может использоваться для

визуализации прогрессирования как первичных опухолей, так и метастатических опухолей, BLI, используя IVIS, считается наиболее современным подходом для оценки эффективности новых противораковых средств на животных моделях.

Никакая другая исследовательская группа в университете, фармацевтической или биотехнологической компании не разработала клеточные линии, комбинирующие экспрессию ER α мутаций рака молочной железы и люциферазы для BLI.

Несмещенный высокопроизводительный скрининг использовали для небольших молекул, которые блокируют действие ER α , для идентификации новых ER α биомодуляторов. ВНPI представлял собой первое поколение лидерных небольших молекул, обнаруженных в результате таких поисков. ВНPI представляет собой эффективный первый в своем классе неконкурентный низкомолекулярный ER α биомодулятор, который убивает резистентные к лечению ER α положительные клетки рака молочной железы и клетки рака эндометрия и блокирует рост клеток рака яичников. ВНPI связывается в другом сайте на ER α , отличающимся от тамоксифена и фулвестранта, и имеет другой механизм действия. Было показано, что ВНPI действует через ER α для индукции персистентной летальной гиперактивации ожидаемого заранее пути активации реакции на несложные белки (UPR). На моделях культур клеток, ВНPI селективно блокирует рост, и часто убивает резистентные к терапии, клетки рака молочной железы, яичников и рака эндометрия. Следует отметить, что ВНPI блокирует пролиферацию и TYS и TDG клеток, экспрессирующих ER α мутации, идентифицированных при метастатическом раке молочной железы.

На модели мышинного ксенотрансплантата ER α положительного рака молочной железы, в допустимых дозах, ВНPI останавливает рост опухоли и индуцирует быструю и существенную регрессию опухоли.

В исследованиях ксенотрансплантата, используя TYS-Luc и TDG-Luc клетки, через 4 недели контрольные опухоли молочной железы, обработанные наполнителем, ориентировочно в четыре раза увеличили число клеток. В отличие от этого, опухоли у мышей, леченных с применением ВНPI, проявляют 97%-99,5% регрессию.

На модели ксенотрансплантата ортотопического рака яичников, используя OVCAR-3 клетки, которые чрезвычайно резистентны к различным

противораковым лекарственным средствам, таксан паклитаксел был неэффективным. ВНРІ самостоятельно сильно уменьшает рост опухоли. Следует отметить, что, опухоли были необнаруживаемые у мышей, леченных с применением ВНРІ плюс паклитаксел, и уровни циркулирующего ракового биомаркера СА125 прогрессивно снижаются до необнаруживаемых. В обоих исследованиях, ВНРІ хорошо переносился мышами.

Новые соединения с превосходящей способностью убивать резистентные к лечению клетки рака молочной железы

10 С помощью синтеза и оценки, были идентифицированы новые соединения, которые превосходят ВНРІ по их способности убивать резистентные к терапии клетки рака молочной железы. По сравнению с ВНРІ, лидерным соединением в этой группе, С-105 проявляют превосходящую мощность и эффективность.

15 Были разработаны исследования для соединений с улучшенной способностью убивать раковые клетки. Один из таких анализов основывался на классическом критерии для клеточной смерти, потери мембранной целостности, что измеряется путем поглощения красителя трипановый синий. Он представляет собой анализ на основе измерения приборов, в котором
20 определяют процентное значение клеток в популяции, которые поглотили трипановый синий. Все клетки, которые поглотили трипановый синий, являются мертвыми. Этот новый анализ является уникальным для раскрытого скринингового рабочего потока. Несмотря на то, что поглощение трипанового синего универсально приемлемо в качестве показателя смерти клеток, он не
25 использовался другими для тестирования потенциальных противораковых средств. Дополнительные анализы, используемые для оценки клеточной гибели, включают сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и анализы на основе ингибирования пролиферации и определения числа клеток, иногда в сочетании с Раптиналом, соединением, которое, как известно,
30 индуцирует 100% клеточную смерть.

С помощью синтеза, были получены низкомолекулярные соединения, которые содержат новый структурный характерный признак, который обеспечивает неожиданные результаты. По сравнению с ВНРІ, лидерным низкомолекулярным соединением, С-105, проявляет намного большую мощность

и эффективность. Следует отметить, что в отличие от ВНРІ, активный (-) энантиомер С-105 убивает 100% TYS-Luc клеток в долгосрочном эксперименте в культуре клеток.

Кроме того, существующие в настоящее время лекарственные средства для эндокринной терапии тамоксифен и фулвестрант являются 5 цитостатическими и совсем не проявляют способности убивать TYS и TDG клетки рака молочной железы. Демонстрируя целевую специфичность, даже при концентрациях, которые больше чем в 10 раз выше по сравнению с теми, 10 которые эффективно убивают ER α положительные клетки рака молочной железы, С-105 не оказывает влияния на некоторые ER α отрицательные клеточные линии. Также, неактивный (+) энантиомер является неэффективным и нетоксичным по отношению к ER α положительным и ER α отрицательным клеточным линиям.

Следует отметить, что на мышинном ксенотрансплантате, после введения 15 активного (-) С-105 только в течение 3 дней, опухоли разрушаются. Используя BLI для визуализации опухолей, 4 из 5 опухолей уменьшались в размерах (регрессировали) более чем на 99,9% и все пять уменьшались в размерах более чем на 99%. При использовании штангенциркулей, в течение семи дней, все 5 20 опухоли уменьшались до необнаруживаемых размеров. Через три недели, опухоль у одной мыши полностью исчезала (полная регрессия -100%) и опухоли у 3 из оставшихся 4 мышей уменьшались в размерах более чем на 99,9%. При продолжительном тестировании, будут ли оставшиеся сигналы обуславливаться мертвыми или покоящимися опухолевыми клетками, или будут ли опухолевые клетки осуществлять повторный рост, после остановки лечения и ожидания в 25 течение 4 недель, одна опухоль, которая полностью исчезла (полная регрессия -100%), оставалась на уровне -100% и отсутствовал “МИКРО-ОПУХОЛЕВЫЙ” ПОВТОРНЫЙ РОСТ у других мышей. Это было беспрецедентной ответной реакцией.

Механизм действия -105: Действия -105 включают, но не ограничиваясь 30 только ими, индуцирование летальной гиперактивации сенсора стресса эндоплазматического ретикулума, реакции на несложные белки (UPR). Сенсор стресса эндоплазматического ретикулума (EnR), реакция на несложные белки (UPR) поддерживает равновесие синтеза новых белков с доступностью

шаперонов и других белков, которые поддерживают укладку и транспорт белков в пределах клеток. Ожидаемый заранее UPR путь активируется при отсутствии несложных белков и предугадывает дальнейшие потребности в способности складываться новых белков (**Фигура 32**).

5 Для индуцирования летальной гиперактивации реакции на несложные белки -105 связывается с ER α в раковых клетках. Это приводит к активации фосфолипазы C γ (PLC γ), активированная PLC γ ферментативно продуцирует инозитолтрифосфат (IP $_3$). IP $_3$ связывается с и открывает IP $_3$ рецепторные кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума в EnR. Открытие
10 кальциевых каналов IP $_3$ R проводит к очень быстрому эффлюксу кальция, хранящегося в полости клетки (внутренняя часть) эндоплазматического ретикулума в тело клетки. Это гиперактивирует UPR. После активации, одно плечо UPR, PERK плечо, ингибирует синтез белка. Активация другого плеча UPR, IRE1 α , индуцирует образование активных сплайсов из мРНК, кодирующих
15 транскрипционный фактор XBP-1 (spXBP-1). Для восстановления гомеостаза кальция, мощные SERCA насосы в мембране эндоплазматического ретикулума осуществляют АТФ-зависимое закачивание кальция из клеточного тела во внутреннюю часть. Поскольку IP $_3$ R кальциевые каналы остаются открытыми, кальций, закачиваемый в полость клетки EnR, вытекает обратно. Это создает
20 бесполезный цикл, который истощает внутриклеточный АТФ.

UPR маркеры и ингибиторы: Образование spXBP-1 мРНК использовали в качестве маркера для активации UPR. Широко используемый низкомолекулярный 2-APB блокирует закрытие IP $_3$ и предотвращает эффлюкс
кальция и UPR гиперактивацию. Низкомолекулярный тапсигаргин (THG)
25 эффективно ингибирует SERCA насосы и предотвращает клетки от истощения ее запасов АТФ.

В исследовании на опухолях у мышей в леченных группах и контрольных с наполнителем, конструировали клетки рака молочной железы человека, содержащие обе летальные ER α Y537S мутации, обнаруженные при
30 метастатическом раке молочной железы, и ген люциферазы светляков – при добавлении подходящего химического вещества, люцифераза светляков распадается химически и продуцируется свет. Используя чувствительный детектор, называемый системой визуализации, предоставляется возможность

исследователям визуализировать опухоли внутри живых мышей. Это называется биолюминесцентная визуализация, или BLI. Предоставляли возможность образовываться большим опухолям. После этого инъецировали (-)-105 ежедневно под кожу в течение трех недель. Используя систему визуализации, изучали влияние (-)-105 на опухоли. Одновременно изучали влияние наполнителя, в котором был растворен (-)-105, на опухоли. Эти опухоли лечили идентично, за исключением того, что они не получали тестируемого лекарственного средства (-)-105.

Изображение на **Фигуре 17** показывает одну из контрольных опухолей, которым инъецировали наполнитель, при окончании исследования в параллельном сравнении с 4 из 5 мышей, леченных с применением (-)-105 (устройство формирования изображений может фотографировать за раз только 5 мышей). В **Таблице 1** показан свет, испущенный опухолями. На мышинном ксенотрансплантате, (-) 105 индуцирует быструю и значительную регрессию больших резистентных к лечению опухолей молочной железы. Даже если опухоли на **Фигуре 17** не можно наблюдать визуально, путем значительного увеличения времени экспозиции и чувствительности незначительных чисел клеток, испускающих свет, у леченных мышей можно визуализировать (**Фигура 34**).

Исследования осуществляли для определения того, что произойдет после остановки лечения с применением (-)-105 (**Таблица 2**). Исследование создавали для демонстрации того, будут ли микро-опухоли оставаться покоеющимися, или будут ли они повторно расти. После окончания трехнедельного лечения, остается остаточный материал, который испускает минимальное количество света, обозначаемый термином “микро-опухоли”. На основании чувствительности системы визуализации, полагают, что эти микро-опухоли содержат где-то от 0 до ~1000 раковых клеток; микро-опухоли не будут видны невооруженным глазом. Для их визуализации необходима мощная система визуализации, или микроскоп. Для тестирования того, являются ли эти клетки мертвыми, или больше не делятся и являются покоеющимися, визуализировали клетки через две и 4 недели после прекращения получения лечения. В этом исследовании тестировали, будут ли растущие раковые клетки уничтожены, это исследование продолжается.

Биолюминесцентная визуализация (BLI) с применением люциферазы продемонстрировала практическую ликвидацию резистентных к лечению опухолей молочной железы у мышей при параллельной визуализации одной контрольной мыши, которой инъецировали наполнитель, и 4 из 5 мышей, 5 леченных с применением (-)-105 (**Фигура 17**). В 3-х недельной исследовании, большие опухоли молочной железы присутствовали в начале лечения и регрессировали, как показано на изображении на **Фигуре 17**. Это исследование осуществляли, используя ортотопические TYS-Luc (инъецированные клетки: T47DER α Y537-Luc клетки рака молочной железы человека), например, наиболее 10 летальную ER α мутацию у человека при метастатическом раке молочной железы. Опухоли выращивали у NSG мышей. Дальнейшие подробности представлены в примерах.

Таблице 1. Оценка (-)-105 на ортотопическом мышинном ксенотрансплантате опухоли, используя биолюминесцентную визуализацию (BLI) опухоли молочной железы, экспрессирующие летальную ER α Y537S мутацию, наблюдаемую при метастатическом раке молочной железы.

Группа	Мышь	День 0 Поток (млн фотонов/с)	День 3 Поток (млн фотонов/с)	День 3 % изменения в опухолевом потоке	День 7 Поток (млн фотонов/с)	День 7 % изменения в опухолевом потоке	День 14 Поток (млн фотонов/с)	День 14 % изменения в опухолевом потоке	День 21 Поток (млн фотонов/с)	День 21 % изменения в опухолевом потоке
Наполнитель	126	182	356	+196	168	-8	270	+148	451	+247
Наполнитель	146	409	462	+113	338	-17	374	-9	382	-7
Наполнитель	148	49,7	159	+318	122	+244	116	+232	348	+700
Наполнитель	149	201	314	+157	238	+118	296	+147	206	+102
Наполнитель	150	1,250	2,320	+186	3,040	+243	2,710	+217	3,460	+277

Группа	Мышь	День 0 Поток (млн фотонов/с)	День 3 Поток (млн фотонов/с)	День 3 % изменения в опухолевом потоке	День 7 Поток (млн фотонов/с)	День 7 % изменения в опухолевом потоке	День 14 Поток (млн фотонов/с)	День 14 % изменения в опухолевом потоке	День 21 Поток (млн фотонов/с)	День 21 % изменения в опухолевом потоке
(-)-105	127	2,130	0,22	-99,99	0,082	-99,996	0,246	-99,99	0,051	-99,998
(-)-105	128	277	0,043	-99,98	0,041	-99,99	0,039	-99,99	0,16	-99,94
(-)-105	131	72,6	0,40	-99,45	0,17	-99,77	0,245	-99,66	0,14	-99,81
(-)-105	134	1,880	0,29	-99,98	0,059	-99,996	0	-100	0	-100
(-)-105	147	1,650	0,17	-99,99	0,18	-99,99	0,071	-99,996	0,046	-99,997

- 5 Система визуализации, используемая для исследования, является более чувствительной и способна захватывать небольшие числа опухолевых клеток по сравнению со стандартными системами измерениями, такими как штангенциркуль, которые измеряют размер опухоли, или взвешивание опухолей после иссечения их из мышей.

Таблица 2. Отсутствие повторного роста микроопухолей через 4 недели после остановки лечения с применением (-)-105.

Группа	Мышь	Начало восстановления Поток (млн фотонов/с)	Начало Нет лекарственного средства: % изменения в опухолевом потоке	Неделя 2 Нет лекарственного средства опухолевом потоке (млн фотонов/с)	Неделя 2 Нет лекарственного средства % изменения в опухолевом потоке	Неделя 4 Нет лекарственного средства опухолевом потоке (млн фотонов/с)	Неделя 4 Нет лекарственного средства % изменения в опухолевом потоке
(-)-105	127	0,051	-99,997	0,17	-99,991	0,038	-99,998
(-)-105	128	0,16	-99,94	0,13	-99,95	0,038	-99,98
(-)-105	131	0,14	-99,81	0,11	-99,84	0,084	-99,88
(-)-105	134	0	-100	0	-100	0	-100
(-)-105	147	0,046	-99,997	0	-100	0,048	-99,997

Основные выводы после осуществленных исследований были

5 следующими:

(а) (-)-105 быстро и драматически разрушает опухоли. Только через три дня, опухоли у всех 5 мышей уменьшались в размерах, или регрессировали, больше, чем на 99%. Четыре из пяти опухолей уменьшались в размерах больше, чем на 99,9%.

10 (б) После окончания трехнедельного исследования, отсутствовала обнаруживаемая опухоль у одной мыши (опухоль была уничтожена; -100%), опухоли у других четырех мышей были практически уничтожены, две из них были очень близкими к пределам обнаружения системы визуализации.

15 (в) Через две недели после остановки лечения, микроопухоли не начинали снова расти. Две из пяти мышей не имели обнаруживаемых опухолей (опухоль была уничтожена; -100%), две уменьшались очень медленно и одна увеличивалась очень медленно.

20 (г) В целом, контрольные опухоли, леченные наполнителем, продолжали расти. Таким образом, наблюдали драматическую регрессию опухоли вследствие введения тестируемого лекарственного средства (-)-105.

(д) Используя штангенциркули для измерения размера опухоли, опухоли у всех 5 мышей уменьшались в размерах, (регрессировали) до необнаруживаемых уже через 3 дня после лечения с применением (-)-105.

25 (е) В целом, здоровье мышей, леченных с применением (-)-105, было хорошим. Отсутствовала токсичность.

Общие методы синтеза

Изобретение также относится к способам приготовления соединений и композиции согласно изобретению. Соединения и композиции могут быть
 5 приготовлены с помощью любой из подходящих методик органического синтеза, например, методик, описанных в настоящей заявке. Многие такие методики хорошо известны в данной области техники. Однако много из известных методик раскрыты в *Compendium of Organic Synthetic Methods* (John Wiley & Sons, New York), том 1, Ian T. Harrison and Shuyen Harrison, 1971; том 2, Ian T.
 10 Harrison and Shuyen Harrison, 1974; том 3, Louis S. Hegedus and Leroy Wade, 1977; том 4, Leroy G. Wade, Jr., 1980; том 5, Leroy G. Wade, Jr., 1984; и том 6, Michael B. Smith; а также в стандартных органических текстах ссылок, таких как *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5-ое изд. под ред. M.B. Smith and J. March (John Wiley & Sons, New York, 2001),
 15 *Comprehensive Organic Synthesis; Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry*, в 9 томах, Barry M. Trost, отв. ред. (Pergamon Press, New York, 1993 печать)); *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis*, Второе издание, Cary and Sundberg (1983); *Protective groups in Organic Synthesis*, Второе издание, Greene, T.W., and Wutz, P.G.M., John Wiley & Sons, New York; и
 20 *Comprehensive Organic Transformations*, Larock, R.C., Второе издание, John Wiley & Sons, New York (1999).

Различные иллюстративные способы приготовления соединений согласно изобретению представлены ниже. Эти способы представлены только с целью иллюстрации природы таких превращений и не предназначены для ограничения
 25 объема применяемых способов.

Как правило, условия реакций, такие как температура, время реакции, растворители, процедуры обработки и другие, являются общеизвестными в данной области техники для конкретной осуществляемой реакции. Прочитированный эталонный материал, совместно с материалом,
 30 прочитированным в настоящей заявке, содержит подробное описание таких условий. Типично, температуры будут составлять от -100°C до 200°C, растворители будут апротонными или протонными в зависимости от требуемых условий, и время реакции будет составлять от 1 минуты до 10 дней. Обработка типично состоит из закаливания любых непрореагировавших реагентов с

последующим распределением между системой вода / органический слой (экстрагирование) и отделение слоя, содержащего продукт.

Реакции окисления и восстановления типично осуществляют при температурах, приблизительно равных комнатной температуре (приблизительно 20 °C), хотя для металлогидридных восстановлений часто температуру уменьшают от 0 °C до -100 °C. также можно использовать нагревание, если это является подходящим. Растворители типично являются апротонными для восстановлений и могут быть либо протонными или апротонными для окислений. Время реакций корректируют для достижения желательных превращений.

Реакции конденсации типично осуществляют при температурах, приблизительно равных комнатной температуре, хотя для неуравновешенных, кинетически контролируемых конденсаций сниженная температура (0 °C до -100 °C) также является общепринятой. Растворители могут представлять собой либо протонные (обычно в уравновешенных реакциях) или апротонные (обычно в кинетически контролируемых реакциях). Стандартные методики синтеза, такие как азеотропное удаление побочных продуктов реакций (например, в среде инертного газа) являются общеизвестными в данной области техники и их применяют, если это является подходящим.

Защитные группы. Термин "защитная группа" относится к любой группе, которая, при связывании с гидроксидом или другим гетероатомом, предотвращает осуществление нежелательных реакций на этой группе и которая может быть удалена с помощью общепринятых химических или ферментативных стадий для восстановления гидроксильной группы. Конкретная применяемая удаляемая защитная группа не всегда является критически важной и предпочтительные удаляемые гидроксильные блокирующие группы включают общепринятые заместители, такие как, например, аллил, бензил, ацетил, хлорацетил, тиобензил, бензилиден, фенацил, метил метокси, простые силиловые эфиры (например, триметилсилил (TMS), *трет*-бутил-дифенилсилил (TBDPS), или *трет*-бутилдиметилсилил (TBS)) и любая другая группа, которая может быть интродуцирована химически в функциональную гидроксильную группу и затем селективно удалена с помощью химических или ферментативных способов в мягких условиях, совместимых с природой продукта.

Подходящие гидроксильные защитные группы известны квалифицированным специалистам в данной области техники и более подробно описаны в T.W. Greene, *Protective groups In Organic Synthesis*; Wiley: New York, 1981 ("Greene") и ссылках, процитированных в этом источнике, и Kocienski, Philip J.; *Protective groups* (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994), оба
 5 этих документа включены в настоящую заявку путем ссылки.

Защитные группы являются доступными, общеизвестными и используемыми и их необязательно используют для предотвращения побочных реакций с защищенной группой во время процедур синтеза, *то есть*
 10 осуществления путей или методов для приготовления соединений с помощью способов согласно изобретению. В большинстве случаев выбор групп, какие следует защищать, и когда это необходимо осуществить, и природа химической защитной группы "PG" будет зависеть от химии реакции, от которой необходимо защитить (*например*, кислотное, щелочное, окислительное, восстановительное
 15 или другие условия) и предназначенного направления синтеза.

Схема 1. Синтез (+) 105 и (-) 105.

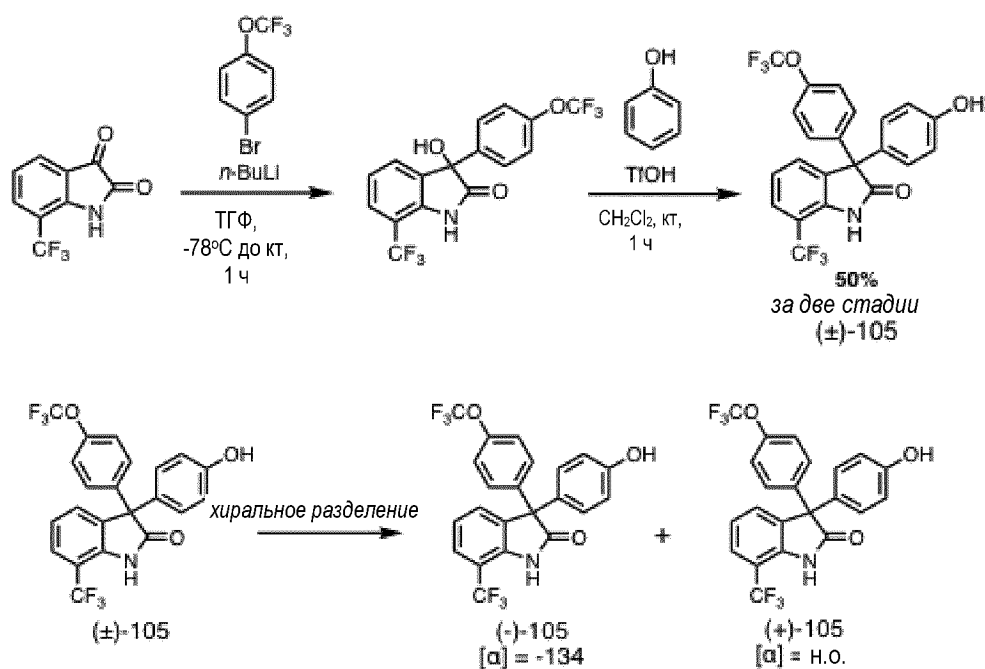
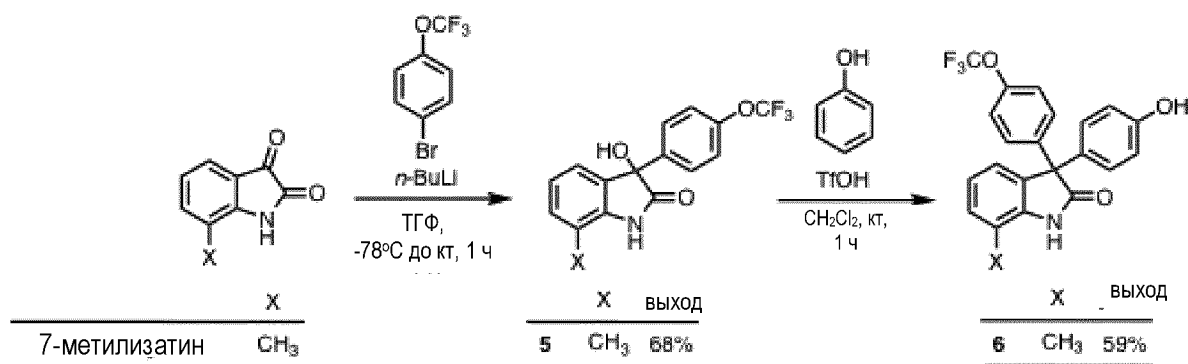
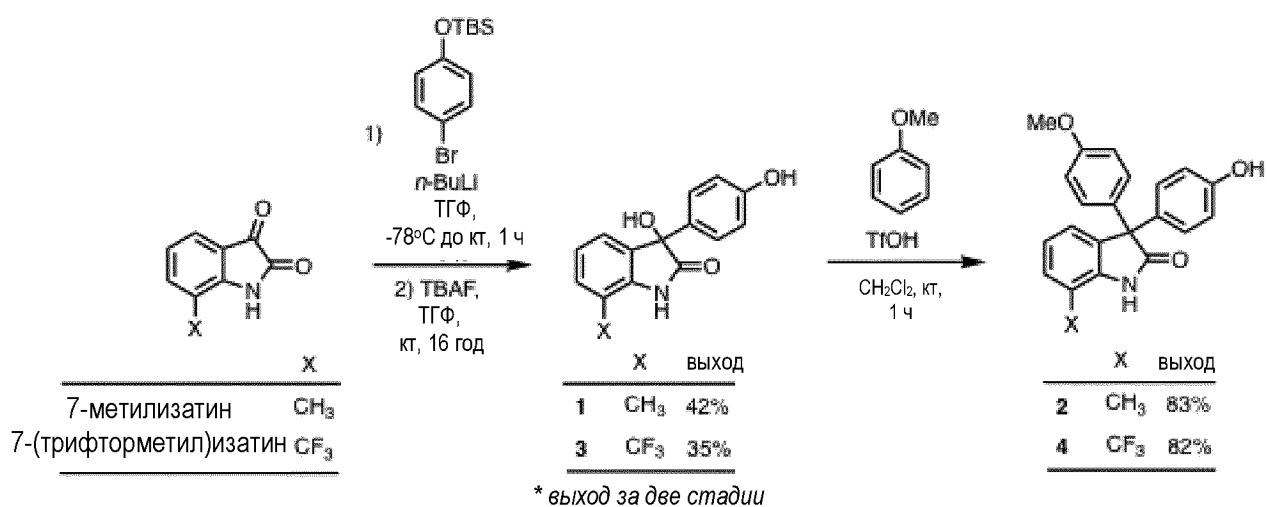
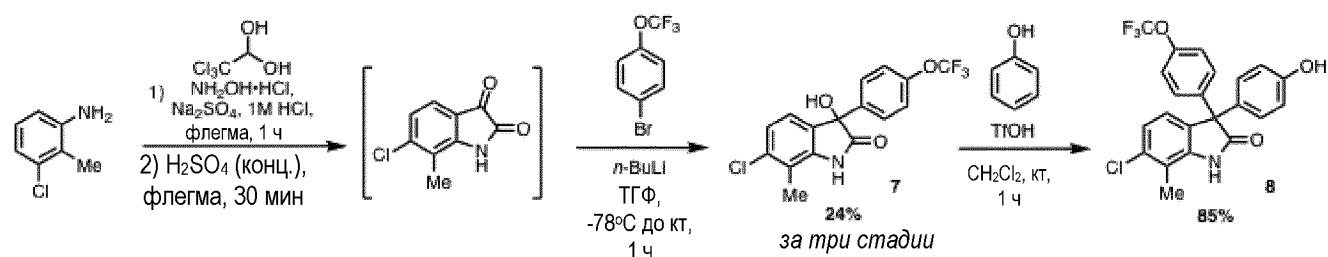
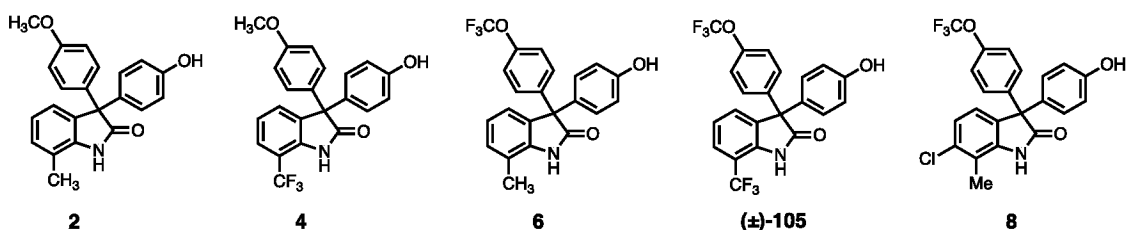


Схема 2. Общий путь синтеза для синтеза соединений 1-6.**Схема 3.** Синтез соединений 7 и 8.

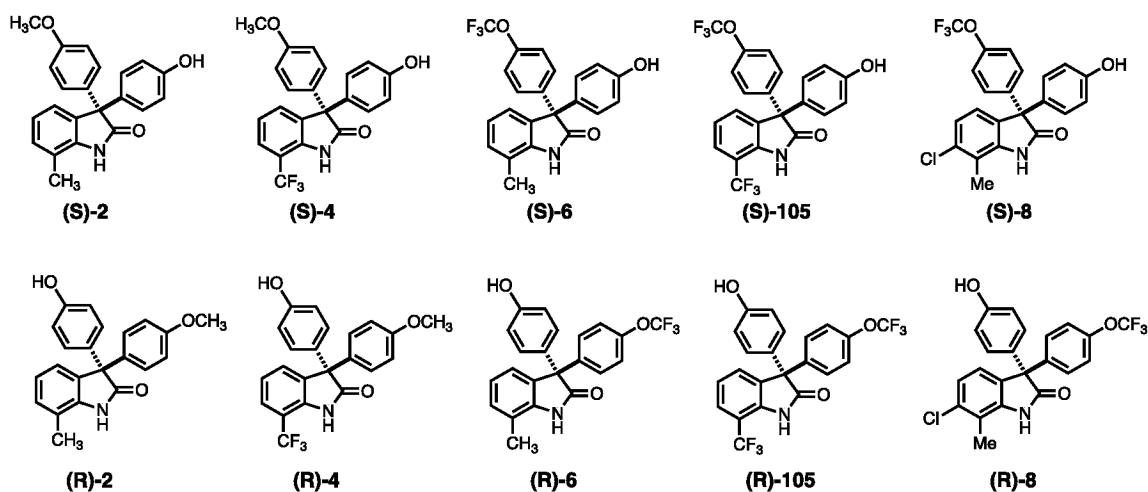
На **Схемах 1-3** представлен общий синтез соединений, описанных в настоящей заявке, таких как соединения на **Схеме 4**. Подробные экспериментальные условия представлены в Примерах.

Схема 4. Структуры синтезированных соединений, приготовленных с помощью Схем 1-3.

Рацемические



Энантиомеры



5 **Основания для анализов уничтожения раковых клеток.**

ТРИПАНОВЫЙ СИНИЙ: В течение десятилетий, жизнеспособные клетки определяют по их способности вытеснять краситель трипановый синий. Клетки с интактными мембранами не поглощают трипановый синий. Погибшие клетки, которые потеряли целостность мембран, поглощают краситель и становятся синими. Таким образом, процент погибших клеток представляет собой процент клеток, которые положительны по трипановому синему из всей популяции клеток. Количественную оценку поглощения трипанового синего использует устройство для подсчета клеток от Fisher. Поскольку этот анализ основан на измерении с помощью прибора, то отсутствует систематическая ошибка наблюдателя при определении процентного значения положительных клеток по трипановому синему.

АНАЛИЗ АЛАМАРОВЫЙ СИНИЙ/РАПТИНАЛ: Живые клетки поддерживают восстанавливающую окружающую среду. Нефлуоресцентный

проникающий в клетки компонент Аламаровый синий® (резазурин) поглощается клетками. В живых клетках, он восстанавливается до флуоресцентного соединения резоруфина. Используя стандартную кривую числа клеток относительно флуоресценции можно определить число живых клеток в

5 тестируемом образце. При высоких концентрациях Раптинал убивает 100% клеток. Наполнитель, в котором растворено тестируемое соединение, является нетоксичным. Таким образом, после вычитания холостого значения для самой среды, флуоресценция, рассчитанная для наполнителя, соответствует 100%

10 жизнеспособных клеток, и сигнал для Раптинала соответствует 0% жизнеспособных клеток. В то время как этот анализ обеспечивает менее прямое измерение клеточной гибели по сравнению с анализом с применением трипанового синего, его более легко осуществлять в увеличенном масштабе для больших количеств образцов.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ (FACS): Погибшие клетки проявляют

15 специфические изменения, за которыми можно мониторить, используя метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Одним из таких изменения является потеря полярности плазматической мембраны. За этим наблюдают, используя Аннексин V. Погибшие клетки также поглощают краситель пропидий йодид. Пропидий йодид (PI) флуоресцирует, когда он

20 интеркалирован в ДНК. В этом анализе мониторят клетки на специфических стадиях клеточной гибели. Например, клетки, которые являются мертвыми и ДНК которых является разрушенной и представлены в таких небольших обломках, которые больше не поглощают PI, являются мертвыми, но больше не рассматриваются как PI положительные.

Осуществление анализа и условия

АНАЛИЗЫ ТРИПАНОВОГО СИНЕГО: Исследования осуществляли на

клетках в планшетах на 6 лунок: 300000 клетки высевали в каждой лунке

30 планшета на 6 лунок в 3 мл среды. Через 24 часа, добавляли ДМСО наполнитель или указанное соединение (в тысячном об.) Клетки инкубировали дополнительно в течение 24 часов, и затем собирали в 0,25 мл трипсина, затем собрали с помощью 0,75 мл среды. Клетки отцентрифугировали и ресуспендировали в 100-200 мкл среды, оставшейся над конгломератом клеток (ресуспендирование клеток осуществляли путем пипетирования и осаждения

несколько раз). Добавляли 10 мкл до 10 мкл трипанового синего. Затем 10 мкл вставляли в слайд-планшет. После инсертирования слайда в ТС20, подсчет происходил автоматически (необходимо много клеток, поскольку для точного соотношения клеток, положительных по трипановому синему, к клеткам, отрицательным по трипановому синему, необходимо приблизительно 200 клеток в поле подсчетов для прибора).

АНАЛИЗЫ АЛАМАРОВЫЙ СИНИЙ РАПТИНАЛ: Клетки высевали в планшеты при плотности 4000-10000 клеток/лунку (планшет на 96 лунок), обычно в 50 мкл среды. Приблизительно через 18 часов, в каждую лунку дополнительно добавляли 50 мкл среды, содержащей 2X желательной конечной концентрации тестируемого соединения (C-105). Через 24 часа добавляли реагент аламаровый синий и считывали флуоресценцию в лунках (BMG PheraStar или Molecular Devices Spectra Max M3 микропланшет-ридер). % относительной смерти определяли с помощью настроек считывания для леченных раптиналом клеток до 100% смерти клеток и считывания для клеток, леченных наполнителем, до 0% смерти клеток.

АНАЛИЗЫ ПУТЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (FITC): Клетки высевали в планшеты на 12 лунок, 75000 клеток/лунку, и предоставляли возможность прилипнуть в течение ночи. На следующий день, добавляли указанные концентрации Раптинала (положительный контроль), (-)-105, ($\pm$)-105, и (+)-105 и предоставляли возможность инкубироваться при 37° C в течение 24 часов (Конечный объем: 1 мл, 0,1% ДМСО). После инкубации, клетки собирали и ресуспендировали в 350 мкл холодного аннексин-связывающего буфера (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4), предварительно смешанного с Аннексином V-FITC и PI красителями. Образцы анализировали на BD Biosciences LSRII проточном цитометре, и анализ данных осуществляли, используя FSC Express версия 5-6. Клеточную смерть оценивали относительно контроля, обработанного ДМСО.

Клеточные линии, используемые для терапевтической мишени: ER α положительные клетки рака молочной железы

TDG и TDG-LUC (T47DER α D538G клон 1): Обе копии гена ER α дикого типа заменяли на ER α D538G мутацию, наблюдаемую при метастатическом раке молочной железы. Эти клетки выращивали без эстрогена, с дальнейшим

умеренным увеличением скорости роста при добавлении эстрогена.

Существенная резистентность к z-ОНТ (активная форма тамоксифена) и фулвестранту//Фаслодексу/ICI 182,780. Немного меньшая резистентность к z-ОНТ и фулвестранту/ICI, чем для ER α Y537S клеток. ER α D538G представляет собой единичную наиболее распространенную мутацию при метастатическом раке молочной железы. Следовательно, эти клетки являются чрезвычайно важными для тестирования. (TDG-LUC) TDG клетки стабильно трансфектированы для экспрессии люциферазы светляков. Транскрипция гена люциферазы контролируется конститутивно активным CMV промотором.

TYS и TYS-LUC (T47DER α Y537S клон 4): Обе копии гена ER α дикого типа заменяли на ER α Y537S мутацию, наблюдаемую при метастатическом раке молочной железы. Быстрый рост без эстрогена. Отсутствие дополнительной стимуляции роста с применением эстрогена. Существенная резистентность к z-ОНТ и фулвестранту/ICI. Немного более резистентны к существующим в настоящее время лекарственным средствам по сравнению с ER α D538G клетками. Это представляет собой наиболее летальную мутацию при метастатическом раке молочной железы. (TYS-Luc) TYS клетки стабильно трансфектировали для экспрессии люциферазы светляков. Транскрипция гена люциферазы контролируется конститутивно активным CMV промотором.

T47D: ER α положительная, нуждающаяся в эстрогене для роста, чувствительная к z-ОНТ и фулвестранту/ICI; родительская клеточная линия, широко используемая, но менее распространенная по сравнению с MCF-7 клетками. Более низкие уровни ER α в T47D клетках, по сравнению с MCF-7 клетками, являются более линейными с ER α уровнями при существующем раке молочной железы. T47D клетки тестировали частично, поскольку T47D клетки нуждаются в более высоких концентрациях ВНРІ для ингибирования пролиферации и уничтожения по сравнению с двумя клеточными линиями, экспрессирующими мутантный ER α .

MCF-7 (Мичиганский фонд рака-7): ER α положительная, наиболее широко используемая ER α положительная клеточная линия рака молочной железы. Эстроген больше стимулирует ее рост; чувствительная к z-ОНТ и фулвестранту/ICI.

ECC-1: ER α положительные клетки рака матки.

Caov3: Резистентные к лекарственным средствам ER α положительные клетки рака яичников. ВНРІ блокирует рост Caov-3 клеток, но не убивает их. Эти клетки полностью резистентны к тамоксифену и фулвестранту и частично резистентны к цисплатину и паклитакселу.

5

ER α отрицательные клетки, используемые для тестирования токсичности и ненаправленных действий

HeLa: Они представляют собой ER α отрицательные клетки, имеющие происхождение из шейки матки. Они являются наиболее широко используемой клеточной линией человека.

10

MDA-MB-231 клетки: Они представляют собой ER α отрицательные клетки и являются наиболее распространенной моделью трижды негативного рака молочной железы. Чрезвычайно метастатические. Эти клетки используются, поскольку в этой работе они являются более чувствительными к неспецифическому ингибированию роста по сравнению с большинством других клеточных линий. Следовательно, они представляют собой наиболее жесткие тесты для неспецифической токсичности.

15

MCF-10A (Мичиганский фонд рака -10A): Иммортилизованная, но не образующая опухоль, ER α отрицательная клеточная линия молочной железы.

20

Статистический анализ

Если специально не указано иначе, осуществляли по меньшей мере 3 биологических повтора для каждого образца (n=3). Данные представлены в виде среднего значения повторов $\pm$ С.О.С. Для статистической достоверности, сравнения осуществляли для клеток, леченных с применением наполнителя по сравнению с клетками, леченными с применением такой же концентрации 105, ВНРІ, или других соединений, где $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, все с использованием Т-критерия Стьюдента.

25

30

Фармацевтические препараты

Соединения, описанные в настоящей заявке, можно использовать для приготовления терапевтических фармацевтических композиций, например, путем комбинирования соединений с фармацевтически приемлемым разбавителем, наполнителем или носителем. Соединения можно добавляли к

носителю в форме соли или сольвата. Например, в тех случаях, когда соединения являются достаточно щелочными или кислотными для образования стабильных нетоксичных кислотных или основных солей, то подходящим может являться введение соединений в виде солей. Примерами фармацевтически приемлемых солей являются соли присоединения органических кислот, образованные к кислотами, которые образуют физиологически приемлемый анион, например, тозилат, метансульфонат, ацетат, цитрат, малонат, тартрат, сукцинат, бензоат, аскорбат, α -кетоглутарат и β -глицерофосфат. Также могут быть образованы подходящие неорганические соли, включая гидрохлоридные, галогенидные, сульфатные, нитратные, бикарбонатные и карбонатные соли.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены, используя стандартные процедуры, хорошо известные в данной области техники, например, путем взаимодействия достаточно щелочного соединения, такого как амин, с подходящей кислотой, обеспечивая физиологически приемлемое ионное соединение. Также могут быть приготовлены соли карбоновых кислот со щелочным металлами (например, натрием, калием или литием) или щелочно-земельными металлами (например, кальцием) с помощью аналогичных методов.

Соединения формул, описанные в настоящей заявке, могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций и вводиться хозяину-млекопитающему, такому как человек, в различных формах. Формы могут быть специфически адаптированы к выбранному пути введения, например, пероральному или парентеральному введению, с помощью внутривенного, внутримышечного, местного или подкожного путей.

Соединения, описанные в настоящей заявке, могут вводиться системно в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем, таким как инертный разбавитель или усваиваемый, пригодный к употреблению в пищу носитель. Для перорального введения, соединения могут быть заключены в твердые или мягкие желатиновые капсулы, спрессованные в таблетки, или включены непосредственно в пищу для питания пациента. Соединения также могут быть комбинированы с одним или несколькими наполнителями и использоваться в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.д. Такие композиции и препараты типично содержат по меньшей мере 0,1% активного соединения. Процентное содержание композиций и препаратов может изменяться и подходяще может

составлять от приблизительно 0,5% до приблизительно 60%, от приблизительно 1% до приблизительно 25%, или от приблизительно 2% до приблизительно 10%, веса данной единичной дозированной формы. Количество активного соединения в таких терапевтически пригодных композициях может быть таким, чтобы можно получить эффективный уровень дозирования.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и другие также могут содержать один или несколько следующих компонентов: связующие, такие как трагакантовая камедь, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; наполнители, такие как дикальций фосфат; дезинтегратор, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и другие; и смазывающее вещество, такое как стеарат магния. Можно добавлять подсластитель, такой как сахароза, фруктоза, лактоза или аспартам; или ароматизатор, такой как мята перечная, масло гаултерии или вишневый ароматизатор. Если единичная дозированная форма представляет собой капсулу, то она может содержать, дополнительно к материалам вышеописанного типа, жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль. Могут присутствовать различные другие материалы, такие как покрытия или для модификации другим способом физической формы твердой единичной дозированной форме. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты желатином, воском, шеллаком или сахаром и др. Сироп или эликсир могут содержать активный соединение, сахарозу или фруктозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Любой материал, используемый для приготовления любой единичной дозированной формы, должен быть фармацевтически приемлемым и по существу не токсичным в применяемых количествах. Дополнительно, активное соединение может быть инкорпорировано в препараты и устройства с замедленным высвобождением.

Активное соединение может вводиться внутривенно или внутривентально путем инфузии или инъекции. Растворы активного соединения или его соли могут быть приготовлены в воде, необязательно смешанной с нетоксичным поверхностно-активным веществом. Дисперсии могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, триацетине, или их смесях, или в фармацевтически приемлемом масле. В обычных условиях хранения и

применения, препараты могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для инъекции или инфузии, могут включать стерильные водные растворы, дисперсии или
5 стерильные порошки, содержащие активный компонент, адаптированный для экстемпорального приготовления препарата стерильных инъектируемых или инфузируемых растворов или дисперсий, необязательно инкапсулированного в липосомы. Окончательная дозированная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях приготовления и хранения. Жидкий носитель или
10 наполнитель может представлять собой растворитель или жидкую дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкие полиэтиленгликоли и т.д.), растительные масла, нетоксичные глицериновые сложные эфиры и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например,
15 путем образования липосом, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, или путем применения поверхностно-активных веществ. Для предотвращения действия микроорганизмов можно использовать различные антибактериальные и/или противогрибковые средства, например, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимеросал и другие. Во многих
20 случаях, будет являться желательным включение изотонических агентов, например, сахаров, буферов или хлорида натрия. Пролонгированную абсорбцию композиций для инъекций можно обеспечивать с помощью агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностерата алюминия и/или желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем
25 включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с различными другими компонентами, перечисленными выше, при необходимости, необязательно с последующей стерилизацией путем фильтрации. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, способы приготовления могут включать методики
30 вакуумной сушки и лиофилизации, при осуществлении которых получают порошок активного компонента плюс любой дополнительный желательный компонент, присутствующий в растворе.

Для местного введения, соединения могут применяться в чистой форме, например, если они представляют собой жидкости. Тем не менее, в целом будет

являться желательным вводить активный компонент на кожу в виде композиции или препарата, например, в комбинации с дерматологически приемлемым носителем, который может быть твердым, жидким, гелеобразным или др.

Пригодные твердые носители включают тонкоизмельченные твердые вещества, такие как тальк, глина, микрокристаллическая целлюлоза, диоксид кремния, окись алюминия и др. Пригодные твердые носители включают воду, диметилсульфоксид (ДМСО), спирты, гликоли, или смеси вода-спирт /гликоль, в которых соединение может быть растворено или диспергировано на эффективных уровнях, необязательно с применением нетоксичных поверхностно-активных веществ. Можно добавлять адъюванты, такие как ароматизаторы, и дополнительные антимикробные агенты для оптимизации свойств для данного применения. Полученные жидкие композиции можно применять из гигроскопических прокладок, использовать для пропитывания повязок и других перевязочных материалов, или распылять на пораженную область, используя распылитель насосного типа или аэрозольный распылитель.

Также можно применять загустители, такие как синтетические полимеры, жирные кислоты, соли и сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, модифицированные целлюлозы или модифицированные минеральные материалы, с жидкими носителями с образованием способных к намазыванию паст, гелей, мазей, мыл и др., для нанесения непосредственно на кожу пациента.

Примеры дерматологических композиций для доставки активных агентов на кожу известны в данной области техники; например, см. патенты US №№ 4,992,478 (Geria), 4,820,508 (Wortzman), 4,608,392 (Jacquet и др.), и 4,559,157 (Smith и др.). Такие дерматологические композиции можно использовать в комбинации с соединениями, описанными в настоящей заявке, где компонент таких композиций необязательно может быть заменен на соединение, описанной в настоящей заявке, или соединение, описанное в настоящей заявке, может быть добавлено в композицию.

Пригодные дозировки соединений, описанных в настоящей заявке, могут быть определены путем сравнения их активности *in vitro*, и активности *in vivo* на животных моделях. Методы экстраполяции эффективных дозировок у мышей и других животных, на людей известны в данной области техники; например, см. патент US № 4,938,949 (Borch и др.). Количество соединения или его активной соли или производного, необходимое для применения для лечения, будет

изменяться не только в зависимости от конкретного применяемого соединения или выбранной соли, но также и пути введения, природы состояния, подвергаемого лечению, и возраста и состояния пациента, и будет находиться в компетенции лечащего врача или клинициста.

5 Тем не менее, как правило, подходящая доза будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/кг, например, от приблизительно 10 до приблизительно 75 мг/кг веса тела в сутки, таком как, от 3 до приблизительно 50 мг на килограмм веса тела реципиента в сутки, предпочтительно в диапазоне от 6 до 90 мг/кг/день, наиболее предпочтительно в
10 диапазоне от 15 до 60 мг/кг/день.

Соединение подходяще приготавливают в единичной дозированной форме; например, содержащей от 5 до 1000 мг, подходяще от 10 до 750 мг, наиболее подходяще, от 50 до 500 мг активного компонента на единичную дозированную форму. В одном варианте осуществления, изобретение
15 обеспечивает композицию, содержащую соединение в соответствии с изобретением, приготовленной в виде препарата в такой единичной дозированной форме.

Соединение подходяще может вводиться в единичной дозированной форме, например, содержащей от 5 до 1000 мг/м², подходяще от 10 до 750 мг/м²,
20 наиболее подходяще, от 50 до 500 мг/м² активного компонента на единичную дозированную форму. Желательная дозировка подходяще может быть представлена в виде единственной дозы или в виде разделенных доз, вводимых через подходящие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более поддоз в сутки. Сама поддоза может быть дополнительно разделена, например,
25 на число дискретных в общих чертах разделенных введений.

Желательная дозировка подходяще может быть представлена в виде единственной дозы или в виде разделенных доз, вводимых через подходящие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более поддоз в сутки. Сама поддоза может быть дополнительно разделена, например, на число дискретных в
30 общих чертах разделенных введений; таких как множественные ингаляции из устройства для вдывания или путем применения множественных капель в глаза.

Соединения, описанные в настоящей заявке, могут являться эффективными противоопухолевыми агентами и иметь более высокую эффективность и/или уменьшенную токсичность по сравнению с ВНРІ.

Предпочтительно, соединения в соответствии с изобретением являются более эффективными и менее токсичными по сравнению с ВНРІ, и/или избегают потенциального сайта катаболического метаболизма, обнаруженного для ВНРІ, то есть, имеют отличающийся метаболический профиль по сравнению с ВНРІ.

- 5 Изобретение обеспечивает терапевтические способы лечения рака у млекопитающего, которые включают введение млекопитающему, имеющему рак, эффективного количества соединения или композиции, описанной в настоящей заявке. Млекопитающее включает примата, человека, грызуна, собаку, кошку, крупный рогатый скот, овец, лошадей, свиней, козлов, быка и др.
- 10 Рак может относиться к различным типам злокачественного новообразования, например, рак ободочной кишки, рак молочной железы, меланома и лейкоз, и в целом характеризуется нежелательной клеточной пролиферацией, например, нерегулируемым ростом, отсутствием дифференциации, локальной инвазией в ткани и метастазированием.
- 15 Способность соединения в соответствии с изобретением лечить злокачественное новообразование может быть определено с помощью анализов, известных в данной области техники. Например, известно создание протоколов лечения, оценка токсичности, анализ данных, количественное определение уничтожения опухолевых клеток, и биологическое значение применения
- 20 трансплантируемых опухолей для скрининга. Дополнительно, способность соединения лечить рак может быть определена с использованием Тестов, как описано ниже.

- Последующие примеры предназначены для иллюстрации вышеописанного изобретения и не должны рассматриваться как сужающие его объем. Для
- 25 квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, что примеры подтверждают многие другие пути, в которых изобретение может быть практически осуществлено. Следует понимать, что могут быть осуществлены различные вариации и модификации, в пределах объема
- 30 заявляемого изобретения.

Примеры

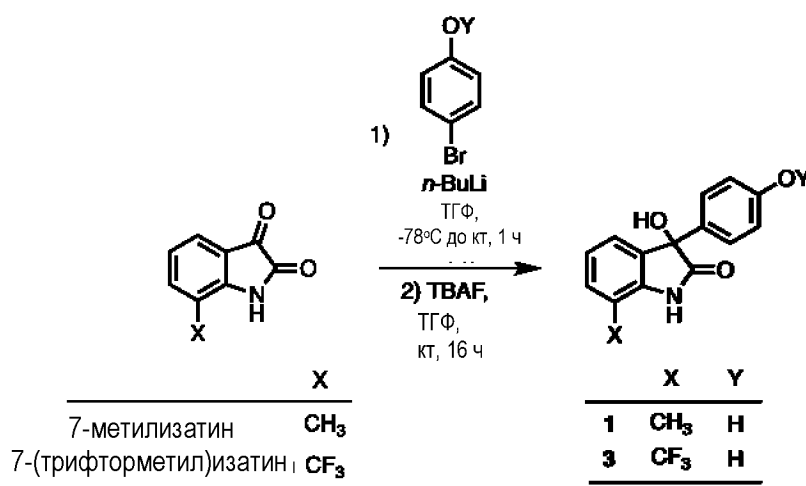
Пример 1. Процедуры синтеза.

Общая информация: Если специально не указано иначе, все реагенты получали из коммерческих источников и использовали без дополнительного

5 высушивания или очистки. Растворители, используемые в настоящей заявке, были обезвоженными после пропускания через колонки с активированным оксидом алюминия. Все реакции осуществляли в стеклянной посуде, обезвоженной пламенем, под положительным давлением газообразного азота. ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР эксперименты осуществляли на криозонде Bruker при 500 МГц и

10 188 МГц соответственно. Спектры, полученные в CD_3OD , имели ссылку на 3,31 част. на млн и 49,00 част. на млн для ^1H и ^{13}C ЯМР спектров соответственно. ЯМР мультиплетности указывали как: s = синглет, d = дублет, t = триплет, q =

квартет, m = мультиплет. ^{13}C мультиплетности представляют собой все синглеты, если специально не указано иначе.

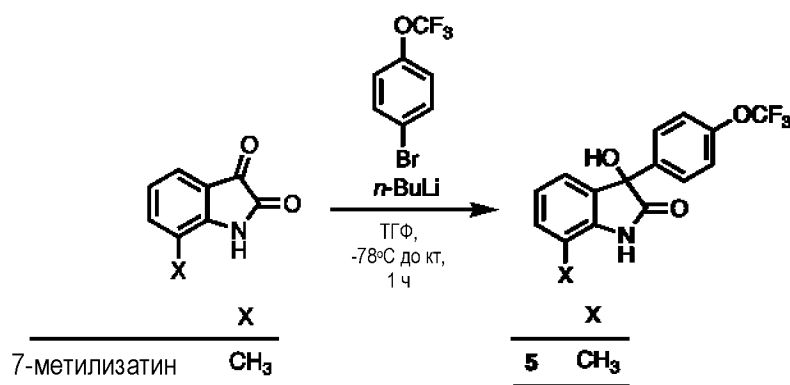


Процедура А: В круглодонную колбу загружали желательный фенилбромид (3,08 ммоль) и растворяли в ТГФ (3,0 мл). Реакционную смесь охлаждали до -78°C и раствор $n\text{-BuLi}$ (2,77 ммоль, 1,7 мл) добавляли по каплям в течение 10 минут. Реакцию перемешивали в течение 1 часа. В другую колбу, добавляли желательный изатин (1,54 ммоль) и растворяли в ТГФ (9,4 мл). Этот раствор изатина добавляли в реакционный сосуд по каплям в течение 10 минут. Полученную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 часа, нагревали до кт, и затем перемешивали в течение 1 часа. Реакцию закаливали водой (10 мл).

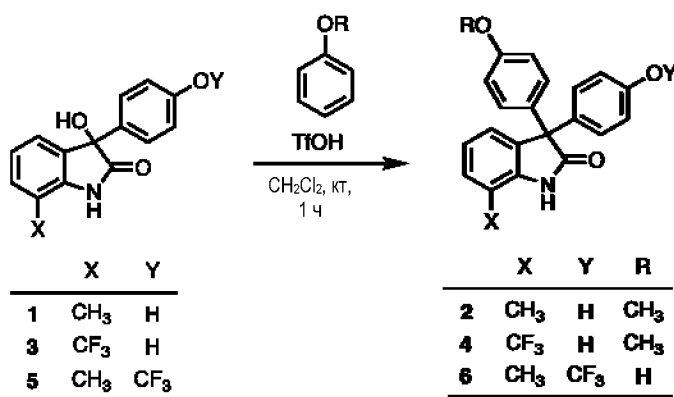
20

25 Раствор экстрагировали этилацетатом (3х) и объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме.

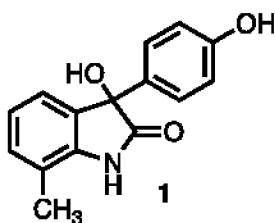
Полученное масло пропускали через пробку диоксида кремния (градиент растворителей для элюирования: 10% EtOAc/Гексаны, изменяемый до 100% EtOAc). После этого элюированные материалы загружали в круглодонную колбу, продували воздухом, помещали в атмосферу азота, и растворяли в ТГФ (15,4 мл). Добавляли раствор фторида тетра-*n*-бутиламмоний (5,4 мл) и реакционный сосуд. После перемешивания в течение 16 часов, реакцию закаливали с помощью 1:1 раствора насыщенного хлорида аммония водн. воды (30 мл). Раствор экстрагировали этилацетатом (3х) и объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Затем полученное масло очищали с помощью колоночной хроматографии.



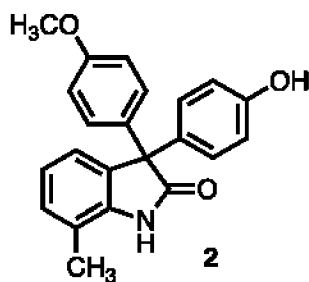
Процедура В: В круглодонную колбу загружали желательный фенилбромид (3,35 ммоль) и растворяли в ТГФ (2,8 мл). Реакционную смесь охлаждали до -78°C и раствор *n*-BuLi (2,79 ммоль, 1,8 мл) добавляли по каплям в течение 10 минут. Реакцию перемешивали в течение 1 часа. В другую колбу, желательный изатин (1,86 ммоль) добавляли и растворяли в ТГФ (5,6 мл). Этот раствор изатина добавляли в реакционный сосуд по каплям в течение 10 минут. Полученную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 часа, нагревали до кт, и затем перемешивали в течение 1 часа. Реакцию закаливали водой (10 мл). Раствор экстрагировали этилацетатом (3х) и объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Полученное масло пропускали через пробку диоксида кремния (градиент растворителей для элюирования: 10% EtOAc/Гексаны, изменяемый до 100% EtOAc).



Процедура C: В круглодонную колбу загружали желательный третичный спирт (0,93 ммоль) и желательный фенол (4,2 ммоль) и растворяли в дихлорметане (4,7 мл). После этого реакционную смесь помещали на ледяную баню и затем по каплям добавляли трифлатную кислоту (TfOH, 0,42 мл). Реакционный сосуд удаляли с ледяной бани и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого реакционную смесь вливали в заполненный льдом бикарбонат натрия и водный раствор экстрагировали этилацетатом (3х). Объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Затем полученное масло очищали с помощью колоночной хроматографии.



3-гидрокси-3-(4-гидроксифенил)-7-метилиндолин-2-он (1): Используя Общую процедуру A, **1** выделяли с выходом 45% за две стадии. ¹H ЯМР (CD₃OD, 500 МГц): δ 7,19 (d, J = 8,86 Гц 2H), 7,10 (d, J = 7,59 Гц 1H), 7,02 (d, J = 7,46 Гц 1H), 6,96 (dd, J = 7,54 Гц, 7,49 Гц 1H), 6,71 (d, J = 8,72 Гц 2H), 2,29 (s, 3H). ¹³C ЯМР (CD₃OD, 188 МГц): δ 182,20, 158,40, 141,39, 134,47, 132,71, 131,78, 128,23, 123,86, 123,48, 121,00, 115,93, 79,17, 16,58.

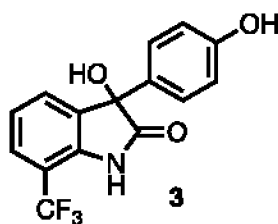


3-(4-гидроксифенил)-3-(4-метоксифенил)-7-метилиндолин-2-он (2):

Используя Общую процедуру С, **2** выделяли с выходом 83%. ^1H ЯМР (CD_3OD , 500 МГц) δ : 7,12 (d, $J = 8,93$ Гц, 2H), 7,02 (m, 3H), 6,94 (m, 2H), 6,82 (d, $J = 6,82$ Гц, 2H), 6,69 (d, $J = 8,74$ Гц), 3,74 (s, 3H), 2,30 (s, 3H).

^{13}C ЯМР (CD_3OD , 188 МГц) δ : 182,87, 160,24, 157,71, 140,70, 135,73, 135,65, 134,26, 130,58, 130,54, 130,38, 124,48, 123,51, 121,02, 116,02, 114,64, 63,36, 55,67, 16,81.

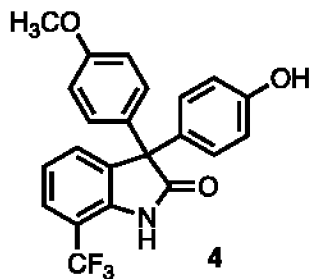
МСВР (ИЭР): m/z рассч. для $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346,1443, обнаружено: 346,1442.



3-гидрокси-3-(4-гидроксифенил)-7-(трифторметил)индолин-2-он (3):

Используя Общую процедуру А, **3** выделяли с выходом 35% за две стадии. ^1H ЯМР (CD_3OD , 500 МГц) δ : 7,54 (m, 1H), 7,43 (d, $J = 7,49$ Гц 1H), 7,19 (m, 3H), 6,74 (d, $J = 8,74$ Гц, 2H).

^{13}C ЯМР (CD_3OD , 188 МГц) δ : 181,60, 158,73, 140,54 (q, $J = 2,25$ Гц), 136,85, 131,80, 129,89, 128,89, 126,90 (q, $J = 4,6$ Гц), 125,16 (q, $J = 270,76$ Гц), 123,74, 116,16, 113,56 (q, $J = 33,17$ Гц), 77,66.

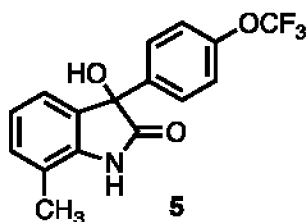


3-(4-гидроксифенил)-3-(4-метоксифенил)-7-(трифторметил)индолин-2-он (4): Используя Общую процедуру С, **4** выделяли с выходом 82%. ^1H ЯМР

(CD₃OD, 500 МГц) δ : 7,50 (dd, $J = 8,09$ Гц, 0,62 Гц, 1H), 7,40 (dd, $J = 7,76$ Гц, 0,64 Гц, 1H), 7,18 (ddd, $J = 8,08$ Гц, 7,46 Гц, 0,87 Гц, 1H), 7,12 (d, $J = 8,87$ Гц, 2H), 7,01 (d, $J = 8,76$ Гц, 2H), 6,86 (d, $J = 8,87$ Гц, 2H), 6,72 (d, $J = 8,75$ Гц, 2H), 3,77 (s, 3H).

¹³C ЯМР (CD₃OD, 188 МГц) δ : 182,24, 160,55, 158,10, 139,74 (m), 137,85, 134,73, 133,30, 130,98, 130,50, 130,49, 125,72 (q, $J = 4,6$ Гц, 125,23 (q, $J = 270,71$ Гц), 123,32, 116,27, 114,89, 113,55 (q, $J = 33,50$ Гц), 62,12, 55,72.

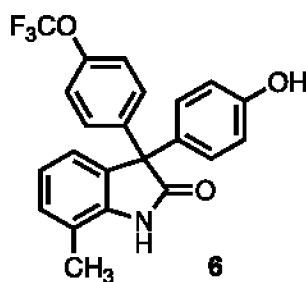
МСВР (ИЭР): m/z рассч. для C₂₂H₁₇NO₃F₃ [M+H]⁺ 400,1161, обнаружено: 400,1154.



3-гидрокси-7-метил-3-(4-(трифторметокси)фенил)индолин-2-он (5):

Используя Общую процедуру В, **5** выделяли с выходом 68% за две стадии. ¹H ЯМР (CD₃OD, 500 МГц) δ : 7,46 (d, $J = 8,83$ Гц, 2H), 7,22 (dd, $J = 1,02$ Гц, 8,98 Гц, 2H), 7,13 (m, 1H), 6,98 (m, 2H), 2,31 (s, 3H).

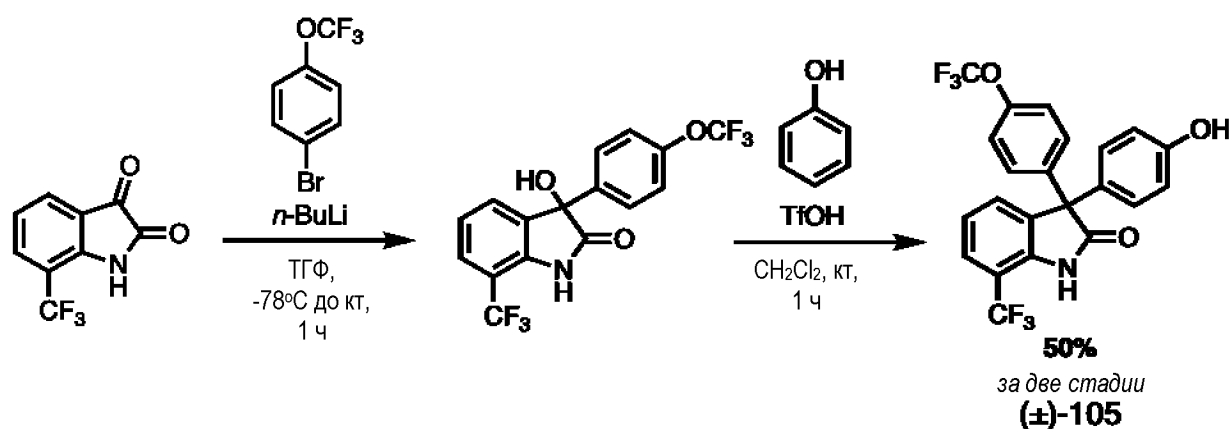
¹³C ЯМР (CD₃OD, 188 МГц) δ : 181,41, 150,1 (q, $J = 1,6$ Гц), 141,55, 141,46, 134,03, 132,19, 128,67, 124,13, 123,4, 121,90 (q, $J = 255,61$ Гц), 121,32, 79,04, 16,61.



3-(4-гидроксифенил)-7-метил-3-(4-(трифторметокси)фенил)индолин-2-он (6): Используя Общую процедуру С, **6** выделяли с выходом 59%. ¹H ЯМР (CD₃OD, 500 МГц) δ : 7,30 (d, $J = 8,86$ Гц, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,08 (m, 1H), 7,03 (d, $J = 8,74$ Гц, 2H), 6,99 (m, 2H), 6,72 (d, $J = 8,73$ Гц, 2H), 2,31 (s, 3H).

¹³C ЯМР (CD₃OD, 188 МГц) δ : 182,00, 158,02, 149,56 (q, $J = 1,47$ Гц), 143,12, 140,82, 134,85, 133,55, 131,22, 130,77, 130,56, 124,51, 123,73, 121,89 (q, $J = 255,61$ Гц), 121,78, 121,32, 116,23, 63,49, 16,82.

МСВР (ИЭР): m/z расч. для $C_{22}H_{17}NO_3F_3$ $[M+H]^+$ 400,1161, обнаружено: 400,1163.



Синтез 3-(4-гидроксифенил)-3-(4-(трифторметокси)фенил)-7-

(трифторметил)индолин-2-она ((±)-105): В круглодонную колбу загружали 1-бром-4-(трифторметокси)бензол (3,08 ммоль) и растворяли в ТГФ (3,0 мл).

Реакционную смесь охлаждали до -78°C и раствор $n\text{-BuLi}$ (2,77 ммоль, 1,7 мл) добавляли по каплям в течение 10 минут. Реакцию перемешивали в течение 1

10 часа. В другую колбу, желательный изатин (1,54 ммоль) добавляли и растворяли в ТГФ (9,4 мл). Этот раствор изатина добавляли в реакционный сосуд по каплям в течение 10 минут. Полученную смесь перемешивали при -78°C в течение 1

15 часа, нагревали до кт, и затем перемешивали в течение 1 часа. Реакцию

закаливали водой (10 мл). Раствор экстрагировали этилацетатом (3х) и

объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия,

15 фильтровали, и концентрировали в вакууме. В новую круглодонную колбу

загружали неочищенный третичный спирт и фенол (6,95 ммоль) и растворяли в

дихлорметане (7,7 мл). После этого реакционную смесь помещали на ледяную

баню и затем по каплям добавляли трифлатную кислоту (TfOH , 0,7 мл).

20 Реакционный сосуд удаляли с ледяной бани и перемешивали при комнатной

температуре в течение 1 часа. После этого реакционную смесь вливали в

заполненный льдом бикарбонат натрия и водный раствор экстрагировали

этилацетатом (3х). Объединенные органические слои высушивали над

сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Затем

25 полученное масло очищали с помощью колоночной хроматографии. **(±)-105**

выделяли с выходом 50% за две стадии синтеза.

^1H ЯМР (CD_3OD , 500 МГц) δ : 7,54 (d, $J = 7,95$ Гц, 1H), 7,45 (d, $J = 7,48$ Гц, 1H), 7,31 (d, $J = 8,91$ Гц 2 H), 7,22 (m, 3H), 7,03 (d, $J = 8,85$ Гц, 2H), 6,75 (d, $J = 8,80$ Гц, 2H).

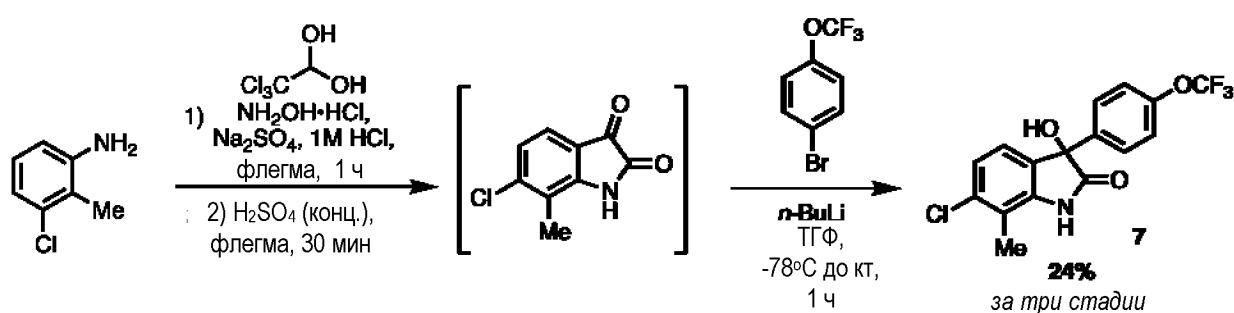
^{13}C ЯМР (CD_3OD , 188 МГц) δ : 181,35, 158,37, 149,81 (q, $J = 1,78$ Гц), 142,17, 139,84 (q, $J = 2,29$ Гц), 136,92, 132,65, 131,22, 131,06, 130,48, 126,12 (q, $J = 4,58$ Гц), 125,15 (q, $J = 270,89$ Гц), 123,55, 121,88 (q, $J = 255,84$ Гц), 122,01, 116,48, 113,77 (q, $J = 33,32$ Гц), 62,22.

МСВР (ИЭР): m/z расщ. для $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{F}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 454,0878, обнаружено: 454,0878.

10

Хиральное разделение ($\pm$)-105: ($\pm$)-105 разделяли на их соответствующие энантиомеры, используя препаративное хиральное ВЭЖХ разделение (Lux® 5 мкм Целлюлоза-1, ЖХ колонка, 250 x 21,2 мм, AXIA™ Packed, изократическая: 7% *i*-PrOH/Гексаны). Из собранных фракций получали (-)-105 (пик А) и (+)-105 (пик В): Фигура 5. При таком способе хирального разделения получают (-)-105 в виде белого твердого вещества (энантиомерная чистота = >99%, $^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} = -14,6^\circ (\pm 0,1^\circ)$) и (+)-105 в виде белого твердого вещества (энантиомерная чистота = ~98-99%, $^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} = -13,8^\circ (\pm 0,1^\circ)$) (см. **Пример 4**). Определение энантиоочистоты осуществляли с помощью аналитической хиральной ВЭЖХ колонки: CHIRALPAK® IB-3 (размер частиц 3 мкм, измерения: 4,6 мм x 100 мм, способ разделения, изократический 7,5% *i*-PrOH/Гексаны) (Фигура 6-8).

20



6-хлор-3-гидрокси-7-метил-3-(4-(трифторметокси)фенил)индолин-2-он

(7): В реакционный сосуд загружали замещенный анилин (2,82 ммоль), 1M HCl (2,82 мл), воду (18,8 мл), безводный сульфат натрия (16,92 ммоль), и гидрохлорид гидроксилamina (9,17 ммоль). Смесь нагревали до кипения и затем добавляли хлоральгидрат в виде одной порции. Реакцию поддерживали в колбе с обратным холодильником в течение 40 минут, затем охлаждали до температуры

25

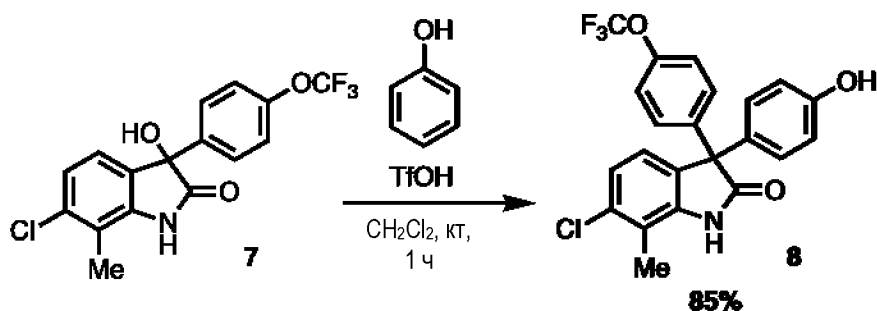
флегмы и водный раствор экстрагировали этилацетатом (3х). Объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. После этого к полученному остатку добавляли концентрированную серную кислоту (3 мл). Этот раствор нагревали до 80°C в течение 20 минут, затем выливали на лед. Полученную водную смесь экстрагировали этилацетатом (3х), и объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Красно-коричневое твердое вещество, полученное после концентрирования, проявило себя как плохорастворимое в большинстве органических растворителей.

В новый реакционный сосуд, желательный фенилбромид (3,08 ммоль) и растворяли в ТГФ (3,0 мл). Реакционную смесь охлаждали до -78°C и раствор *n*-BuLi (2,77 ммоль, 1,73 мл) добавляли по каплям в течение 10 минут. Реакцию перемешивали в течение 1 часа. В другую колбу, 6-хлор-7-метилизатин (1,54 ммоль) добавляли и растворяли в ТГФ (9,4 мл). Этот раствор изатина добавляли в реакционный сосуд по каплям в течение 10 минут. Полученную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 часа, нагревали до кт, и затем перемешивали в течение 1 часа. Реакцию закаливали водой (10 мл). Раствор экстрагировали этилацетатом (3х) и объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и концентрировали в вакууме. Полученное масло пропускали через пробку диоксида кремния (градиент растворителей для элюирования: 10% EtOAc/Гексаны, изменяемый до 100% EtOAc).

7 выделяли с выходом 24% за три стадии синтеза. ¹H ЯМР (CD₃OD, 500 МГц) δ: 7,46 (d, J = 8,85 Гц 2H), 7,23 (d, J = 7,98 Гц, 2H), 7,10 (d, J = 7,97 Гц 1H), 6,98 (d, J = 8,02 Гц, 1H), 2,35 (s, 3H).

¹³C ЯМР (CD₃OD, 188 МГц) δ: 181,25, 150,17 (q, J = 1,83 Гц), 143,14, 140,98, 136,68, 132,74, 128,63, 124,53, 124,40, 121,88 (q, J = 255,75 Гц), 121,86, 119,76, 78,91, 14,11.

МСВР (ИЭР): *m/z* рассч. для C₁₆H₁₁NO₃F₃ClNa [M+Na]⁺ 380,0277, обнаружено: 380,0284.



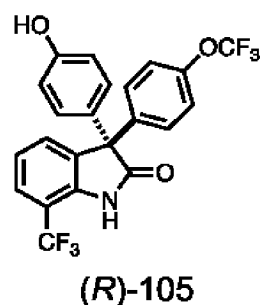
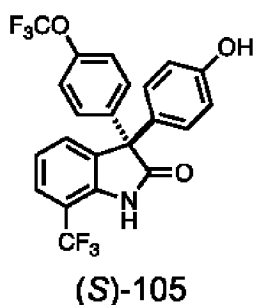
6-хлор-3-(4-гидроксифенил)-7-метил-3-(4-

(трифторметокси)фенил)индолин-2-он (8): Используя Общую процедуру С, 8

выделяли с выходом 85%. ^1H ЯМР (CD_3OD , 500 МГц) δ : 7,30 (d, $J = 8,91$ Гц 2H), 7,21 (m, 2H), 7,10 (d, $J = 8,10$ Гц, 1H), 7,02 (m, 4H), 6,73 (d, $J = 8,80$ Гц, 2H), 2,35 (s, 3H).

^{13}C ЯМР (CD_3OD , 188 МГц) δ : 181,81, 158,16, 149,67 (q, $J = 2,02$ Гц), 142,6, 142,38, 135,34, 133,50, 133,10, 131,18, 130,47, 125,48, 124,12, 121,89 (q, $J = 255,49$ Гц), 121,8, 119,66, 116,35, 63,45, 14,30.

МСВР (ИЭР): m/z расщ. для $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{F}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 434,0771, обнаружено: 434,0764.



Разделение энантиомеров 105: Рацемические смеси 105 разделяли на

соответствующие энантиомеры (**Фигура 5**), используя препаративное хиральное ВЭЖХ разделение (Lux® 5 мкм Целлюлоза-1, ЖХ колонка, 250 x 21,2 мм

AXIA™ Packed, изократический: 7% *i*-PrOH/Гексаны). Из собранных фракций

получали (-)-105 (пик А) и (+)-105 (пик В) Этот способ хирального разделения обеспечивает получение (-)-105 в виде белого твердого вещества (энантиомерная

чистота = > 99%, $[\alpha] = -134$) и (+)-105 в виде белого твердого вещества

(энантиомерная чистота = 98 - > 99%, $[\alpha]$ = не определяли). Определение

энантиочистоты осуществляли с помощью аналитической хиральной ВЭЖХ

колонки: CHIRALPAK® IB-3 (размер частиц 3 мкм, измерения: 4,6 мм x 100 мм,

способ разделения, изократический 7,5% *i*-PrOH/Гексаны). Соединение (-)-105

преломляет свет в отрицательном направлении ($[\alpha]$ значение). **Фигура 6** представляет собой трек количественной хиральной ВЭЖХ, демонстрирующий отдельные пики ($\pm$)-105, которые присутствуют приблизительно в равной концентрации. На **Фигуре 7** представлен активный (-)-105 пик, который имел высокую чистоту после разделения. На **Фигуре 8** представлен неактивный (+)-105 пик, который также чистый после разделения. В связи с наличием следов активного (-)-105 в этом препарате, и в связи с существенной эффективностью (-)-105, при чрезвычайно высоких концентрациях (+)-105 могут проявлять некоторую активность.

Пример 2. Исследования смерти раковых клеток с помощью соединения 105.

Подробности экспериментов ксенотрансплантатов: TYS-Luc клетки (5000000 клеток в Матригеле) инъецировали в верхнюю жировую подушку молочной железы самок мышей после овариэктомии NSG (SCID) (Jackson labs). Через 10 недель, в день 0, развились большие опухоли (размеры: 100-600 мм³). Мышей лечили с применением наполнителя, используемого для растворения (-)-105, или (-)-105 в дозе 40 мг/кг ежедневно путем подкожной инъекции. Для биолюминесцентной визуализации (BLI) опухолей, мышей анестезировали с применением изофлурана и им инъецировали люцерфин, субстрат люцифераз. Измеряли поток, общее число фотонов света, попадающих на детектор, за одну секунду, используя IVIS (систему визуализации in vitro). Представлен поток (в миллионах единиц за секунду) для целой площади, включающей каждую опухоль, или эквивалентную площадь, если опухоль является маленькой или необнаруживаемой и процент изменения размера опухоли в каждый момент времени осуществления измерения (день 0, день 3, неделя 1, неделя 2, неделя 3). Затем лечение останавливали, и проводили другое измерение через две недели. Следует отметить, что опухоли также измеряли с помощью штангенциркулей. Поскольку некоторые опухоли не выступают достаточно, этот метод менее точный, чем BLI. Еще через три дня, все (-)-105 опухоли уменьшались до размеров, необнаруживаемых с помощью штангенциркуля.

На **Фигуре 1** представлен дозозависимый эффект ($\pm$)-105 на ER α положительные и ER α отрицательные раковые клетки человека,

демонстрирующий противораковую активность. ER α положительный MCF-7 рак молочной железы, Саov-3 рак яичников и ECC-1 клетки рака матки и ER α отрицательные MDA-MB-231 клетки рака молочной железы клетки человека и HeLa, клетки карциномы шейки матки клетки человека и MCF-10A

5 эпителиальные клетки молочной железы человека высевали в количестве 10000 клеток/лунку (планшет на 96 лунок) в 50 мкл среды. Приблизительно через 18 часов, в каждую лунку добавляли дополнительно 50 мкл среды, содержащей 2X желательной конечной концентрации тестируемого соединения (C-105) (конечный об. 100 мкл/лунку). Через 24 часа добавляли реагент аламаровый
10 синий и определяли флуоресценцию в лунках через 1 час (BMG PheraStar микропланшет-ридер). % относительной смерти определяли с помощью настроек считывания для 10000 нМ леченных раптиналом клеток до 100% смерти клеток и считывания для клеток, леченных наполнителем, до 0% смерти клеток. (Данные представляют собой среднее значение $\pm$ СОС 3 независимых экспериментов с 5
15 биологическими повторами для каждого образца в каждом независимом эксперименте.)

На **Фигуре 2** представлен дозозависимый эффект для сравнения способности ВНРІ и ($\pm$)-105 убивать ER α положительные T47D клетки. T47D, клетки рака молочной железы человека высевали в планшеты при плотности
20 75000 клеток/лунку. На следующий день, добавляли ДМСО наполнитель, 10 мкм Раптинала (контроль для 100% клеточной смерти), или 0, 50, 100 500 и 1000 нМ ВНРІ или ($\pm$)-105, или 1000 нМ ІСІ/фулвестранта или 1000 нМ ОНТ. Через 24 часа жизнеспособные клетки определяли с помощью FACS, используя красители V-FITC и пропидий йодид. (n=3 независимых эксперимента $\pm$ СОС). Результаты
25 этого эксперимента с проточной цитометрией (который определяет смерти клеток) показали, что ($\pm$)-105 является цитотоксическим, а не цитостатическим. В то время как соединения ОНТ, ІСІ и ВНРІ все являются цитостатическими на основании низкой наблюдаемой активности. Наблюдаемая активность ($\pm$)-105 в этом анализе была сходной с положительным контролем, Раптиналом,
30 соединением, которое также количественно убивает раковые клетки (см. также **Фигуру 36А**).

На **Фигуре 3** сравнивали способность ($\pm$)-105 убивать ER α положительные и ER α отрицательные клетки. Дозозависимый эффект определял

способность ($\pm$)-105 быстро убивать ER α положительные и ER α отрицательные клетки. Клеточные линии: ER α положительный рак молочной железы: T47D, MCF-1 TYS (Y537S); Эндометриальные: ECC-1; ER α отрицательные клеточные линии: Молочная железа MDA-MB-231; Меланома: OMM1, A375; Легкие: H3122; Ободочная кишка: HT-29; фибробласт: HFF-1. Высевали 4000-8000 клеток/лунку. На следующий день добавляли ($\pm$)-105 при концентрациях 0-10000 нМ. Через 24 часа добавляли реагент аламаровый синий и считывали флуоресценцию в лунках. % относительной смерти определяли с помощью настроек считывания для 1000 нМ леченных раптиналом клеток до 100% смерти клеток и считывания для клеток, леченных наполнителем, до 0% смерти клеток. ($n=3 \pm \text{COC}$). Эти результаты свидетельствуют о том, что рацемическое соединение 105 является селективным для ER α положительных раковых клеточных линий; также продемонстрировано с энантиомерно чистым (-)-105 на **Фигуре 36F**.

На **Фигуре 4A** проиллюстрировано, как определяли IC₅₀ для смерти клеток. **4B** тестировали способность ВНРІ, (-)-105, и 01-15 убивать. **4C** показано, что (-)-105 эффективен при пероральном введении. Предоставляли возможность образовываться большим ортотопическим опухолям молочной железы TYD-Luc клеток (T47DER α D538G-люцифераза клетки рака молочной железы человека) в течение 4 месяцев у иммуносупрессивных NSG мышей. Мышей лечили в течение 3 дней либо с применением только наполнителя (Наполнитель), через желудочный зонд 40 мг/кг (-)-105 (перорально), или ежедневная инъекция 40 мг/кг (-)-105 (инъецировано). Опухоли визуализировали с помощью биолюминесцентной визуализации с применением люциферазы. Пунктирная линия представляет -100%; регрессию опухоли до необнаруживаемой. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что (-)-105 превосходит ВНРІ и 01-15.

На **Фигуре 9** представлено, что (-) энантиомер 105 является активным и (+) энантиомер является неактивным. Высевали 75000 ER α положительных T47D, клеток рака молочной железы человека на лунку. На следующий день, добавляли ДМСО наполнитель, 10 мкМ Раптинала (контроль для 100% клеточной смерти), или 100 500 и 1000 нМ (+)-105, или (-)-105. Через 24 часа

жизнеспособные клетки определяли с помощью FACS, используя красители V-FITC и пропидий йодид. (n=1).

На **Фигуре 10** представлено, что (-)-105 индуцирует дозозависимую гибель MCF-7 клеток; (+)-105 является неактивным. Высевали 75000 ER α положительных T47D, клеток рака молочной железы человека, на лунку. На следующий день, добавляли ДМСО наполнитель, 10 мкм Раптинала (контроль для 100% клеточной смерти), или 1-500 нМ (-)-105 или 1000 нМ (+)-105 или 1000 нМ ($\pm$)-105. Через 24 часа жизнеспособные клетки определяли с помощью FACS, используя красители V-FITC и пропидий йодид. (n=3 независимых эксперимента $\pm$ СОС).

На **Фигуре 11** представлен дозозависимый эффект для уничтожения T47D-Luc клеток с помощью ВНРІ и активного (-)-105 энантиомера С-105. Анализ клеточной смерти с помощью трипанового синего использовали для сравнения способности активного (-) энантиомера С-105 и ВНРІ убивать положительные по рецептору эстрогена α (ER α) T47D, клетки рака молочной железы человека, экспрессирующие люциферазу (T47D-Luc клетки). Высевали 300000 T47D-Luc клеток/лунку в 10% FBS в планшет на 6 лунок в трех повторях. Через 24 часа после высеваания, к клеткам добавляли указанные концентрации активного (-) энантиомера С-105 [(-)-105] или ВНРІ, или наполнителя [Нап]. Через 24 часа, клетки собирали, и % смерти клеток определяли с помощью автоматизированного вытеснения трипанового синего, используя автоматизированный гемоцитометр Countess II. Процентное значение жизнеспособных клеток рассчитывали с помощью уравнения $100 - (\% \text{ смерти клеток})$. (n=3 $\pm$ СОС).

На **Фигуре 12** представлено, что дозозависимый эффект (-)-105 является лучшим по сравнению с ВНРІ для уничтожения MCF-7 и TYS-Luc клетки. Анализ клеточной смерти с помощью трипанового синего использовали для оценки способности активного энантиомера 105 (-) [(-)-105] убивать ER α положительные MCF-7 и TYS-Luc, клетки рака молочной железы человека. 300,000 T47D клеток/лунку в 10% FBS высевали в планшет на 6 лунок в трех повторях. Через 24 часа после высеваания, добавляли указанные концентрации ВНРІ, или активный энантиомер 105 (-) С-105 [(-)-105]. Через 24 часа, клетки собирали, и % смерти клеток определяли с помощью автоматизированного

вытеснения трипанового синего, используя автоматизированный гемоцитометр Countess II. Процентное значение жизнеспособных клеток рассчитывали с помощью уравнения $100 - (\% \text{ смерти клеток})$. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 13** предоставлено исследование зависимости доза-эффект для (-)-105, которое является лучше по сравнению с ВНРІ и существующими в настоящее время эндокринными терапиями для уничтожения TDG-Luc клеток. На верху Фигуры, представлен дозозависимый эффект, который указывает на то, что (-)-105 является лучше по сравнению с ВНРІ для уничтожения TDG-Luc клеток. На нижней левой Фигуре показано, что существующие в настоящее время эндокринные терапии, ICI/Фулвестрант/Фаслодекс и z-4-гидрокситамоксифен (активная форма тамоксифен) не убивают TDG-Luc клетки. На нижней правой Фигуре показано, что (+)-105 энантиомер является неактивным и не убивает TDG-luc клетки. Анализ клеточной смерти с помощью трипанового синего использовали для оценки способности активного энантиомера С-105 [(-)-105] убивать ER α положительный TDG-Luc клетки. Для всех исследований, 300000 TDG-Luc клеток/лунку в 10% FBS высевали в планшет на 6 лунок в трех повторах. Через 24 часа после высевания, добавляли указанные концентрации активного энантиомера (-)-105, или ВНРІ (вверху) ICI, или ОНТ (внизу слева) или (+)-105 (внизу справа). Через 24 часа, клетки собирали, и % смерти клеток определяли с помощью автоматизированного вытеснения трипанового синего, используя автоматизированный гемоцитометр Countess II. Процентное значение жизнеспособных клеток рассчитывали с помощью уравнения $100 - (\% \text{ смерти клеток})$. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 14** представлены IC₅₀ для уничтожения раковых клеток с помощью (-)-105. Клеточные линии: ER α положительный рак молочной железы: T47D, MCF-7 TYS (T47D Y537S) TDG (T47D D538G), BT-474; ER α отрицательные MDA-MB-231 клетки рака молочной железы; высевали 6000 клеток/лунку (планшет на 96 лунок) в 100 мкл среды. Конц. ДМСО довели до 1% в каждой лунке. Добавляли (-)-105 при концентрациях в интервале 0-100000 нМ. Через 24 часа добавляли реагент аламаровый синий (10 мкл из 0,1 мг/мл). After 2-4 часа считывали флуоресценцию в лунках (λ_{ex} : 555 нМ, λ_{em} : 585 нМ, Spectra Max M3 планшет-ридер). % относительной смерти определяли с помощью настроек считывания для 10,000 нМ леченных раптиналом клеток до

100% смерти клеток и считывания для клеток, леченных наполнителем, до 0% смерти клеток. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 15** представлены долгосрочные эксперименты, где (-)-105, но не ВНPI, убивает 100% TYS-Luc клеток. Для симуляции эффекта лечения опухоли в течение нескольких недель в мышинном ксенотрансплантате, осуществляли долгосрочный эксперимент в культуре клеток. TYS-Luc клетки (T47DER α Y537S-Luc клетки; ER α Y537S представляет собой наиболее летальную ER α мутацию, наблюдаемую в метастатическом раке молочной железы) высевали в планшеты при плотности 4000 клеток/лунку в планшет на 96 лунок. Клетки изначально поддерживали в течение 2 недель в среде, содержащей либо ДМСО наполнитель, 1 мкМ неактивного (+) энантиомера C-105, 1 мкМ ВНPI, или 1 мкМ активного (-) энантиомера C-105 (лечение). Через 2 недели (среду меняли каждые 2 дня) определяли число клеток, используя MTS и стандартную кривую абсорбции относительно числа клеток для TYS-Luc клеток.

Примечания: (I) Усы погрешностей представляют ВНPI и (-)-105 группы эксперимента. Лекарственное средство отсутствовало во время повторного роста. (II) В связи с тем, что значения абсорбции являются чрезвычайно низкими, то MTS анализ не может точно количественно определить меньше, чем 200 клеток/лунку (III) После разделения, неактивный энантиомер все еще содержит ~1-2% активного энантиомера; таким образом, он сохраняет некоторую активность при использовании в высоких конц. 1000 нМ), другой набор сходно леченных лунок не исследовали с применением MTS и через 4 промывки с PBS помещали в среду без эстрогена, содержащую 10% cd-FBS в течение 4 недель (среду меняли каждые 2 дня) (Повторный рост). Это предоставляет возможность любым выжившим клеткам повторно расти. Через 4 недели клетки анализировали, используя MTS. Следует отметить, что отсутствовал повторный рост клеток, леченных с применением активного (-) C-105 и наблюдался интенсивный повторный рост клеток, леченных с применением ВНPI. (Примечание: При визуальном наблюдении лунок подтверждали, что отсутствуют клетки в лунках, леченных в течение 2 недель с применением активного (-)-105.) Для тестирования того факта, будут ли клетки, которые повторно выросли после лечения с применением ВНPI, резистентными к ВНPI, их повторно лечили в течение другого цикла (ВНPI Повторное лечение)

и было показано, что они сохраняют чувствительность к уничтожению с применением ВНPI. (n=8 биологических повторов $\pm$ СОС).

На **Фигуре 16** представлены долгосрочные эксперименты, которые воспроизводят терапию, где (-)-105, но не ВНPI, ликвидирует, летальные, резистентные к терапии клетки рака молочной железы. Клетки: MCF-7Y537S (MCF-7 ER α Y537S-люцифераза (имеющие происхождение из MCF-7 клеток рака молочной железы человека. MCF-7 клетки представляют собой наиболее широко распространенную линию клеток рака молочной железы человека. Они являются наиболее летальной и второй наиболее распространенной мутацией при метастатическом раке молочной железы.) Экспериментальные условия были такими, как указано в обозначениях к Фигуре 15. (+)-105 энантиомер был неактивным.

На **Фигуре 18** представлено, что (-)-105 убивает клетки рака молочной железы, резистентные к уничтожению с помощью ВНPI. ER α содержащие T47D клетки рака молочной железы человека, которые были способны выживать при 1 мкМ ВНPI, отбирали с помощью избыточного роста клонов. Оценивали влияние 100 нМ и 1 мкМ ВНPI и (-)-105 на рост (ВНPI-чувствительных) родительских T47D клеток и частично ВНPI-резистентных T47D клонов 1,3,8 и 11. Высеивали 4000 клеток/лунку. Число клеток определяли с помощью MTS анализа кривой абсорбции относительно числа клеток. Выводы: ВНPI блокирует рост и убивает многие T47D клетки и (-)-105 убивает все T47D клетки. ВНPI ингибирует рост, но не может остановить рост резистентных клонов; (-)-105 полностью блокирует рост резистентных клонов и уменьшает число их клеток ниже исходного числа клеток от 4000 клеток/лунку. Таким образом, за 4 дня (-)-105 убивает некоторые, но не все, резистентные клетки.

В отношении механизма действия -105 для ожидаемой заранее реакции на несложные белки (UPR), на **Фигуре 19** показано, что (-)-105 эффективно индуцирует образование сплайсов ХВР-1 мРНК. ER α положительные T47D-люциферазные, клетки рака молочной железы человека, поддерживали в течение указанных промежутков времени в наполнителе (Контр, Контроль), 100 нМ ВНPI или 100 нМ (-)-105. В указанные периоды времени выделяли РНК и количественно определял уровни sp-ХВР1 мРНК с помощью количественной ОТ-ПЦР. (n=3 $\pm$ СОС). (-)105 или ВНPI активация UPR активирует UPR сенсор

IRE1 α , что приводит к расщеплению неактивного XBP1 мРНК на активную сплайсированную (sp)-XBP1 мРНК.

Увеличение sp-XBP1 мРНК является широко используемым маркером для активации реакции на несложные белки (UPR). Таким образом, (-)-105 является значительно более сильным UPR гиперактиватором и индуктором sp-XBP1 по сравнению с ВНРІ.

На **Фигуре 20** показано, что (-)-105, но не ВНРІ индуцирует практически количественное, ингибирование синтеза новых белков. ER α положительные Саов-3, клетки рака яичников человека, лечили в течение указанных периодов времени с применением 1000 нМ ВНРІ или 1000 нМ (-)-105. Клетки в течение непродолжительного времени метили ^{35}S -метионин. Инкорпорацию меченного ^{35}S -метионина в белок определяли с помощью осаждения трихлоруксусной кислоты и захвата осажденных белков, но не свободных аминокислот, в небольшие обессоленные отвердевшие фильтры Ватмана. После солюбилизации белка на фильтрах с основанием и нейтрализации с кислотой, образцы анализировали в жидкостном сцинтилляционном счётчике. Представлен средний ($n \geq 3$) процент ингибирования синтеза белка по сравнению с образцом в момент времени 0. Практически количественное ингибирование синтеза белка с помощью (-)-105 согласуется с индуцируемой (-)-105 летальной гиперактивацией PERK плеча для UPR. Даже нерастущие клетки постоянно разлагают белки и вырабатывают новые белки. Клетки, в которых ингибирован практически весь (>90%) синтез белка, не могут расти и в конечном итоге погибают.

На **Фигуре 21** показано, что блокирование эффлюкса кальция из эндоплазматического ретикулума с применением 2-APB ингибирует (-)-105-индуцированную смерть раковых клеток. ER α положительные MCF-7 и TYS-Luc лечили с применением ДМСО наполнитель (Нап), или ВНРІ или (-)-105 плюс или минус 2-APB в течение указанных периодов времени. Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. Через 30 минут, 2-APB практически полностью блокирует (-)-105-индуцированную смерть клеток и через 45 и 60 мин. он частично блокирует клеточную смерть. Это согласуется с индуцируемой (-)-105

чрезвычайно сильной летальной активацией ожидаемого заранее UPR пути. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 22** показано, что -105 уменьшает внутриклеточные уровни АТФ; это уменьшение уровней АТФ блокируется путем инактивации SERCA насоса с помощью тапсигаргина. TYS-Luc клетки поддерживали в ДМСО наполнителе (Нап), 1000 нМ ВНPI, 1000 нМ -105 с и без 10000 нМ тапсигаргина (THG) в течение указанных периодов времени. Определяли уровни АТФ, используя набор, и относительные уровни АТФ получали на основе стандартной кривой. Следует отметить, что через 1 ч, THG полностью блокирует индуцированное -105 снижение внутриклеточных уровней АТФ. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 23** показано, что блокирование снижения уровней АТФ с помощью тапсигаргина ингибируют индуцированную -105 смерть клеток. TYS-Luc клетки поддерживали в ДМСО наполнителе (Нап) или ВНPI, или (-)-105 с или без тапсигаргина (THG) в течение указанных периодов времени. Блокирование снижения уровней АТФ (Фигура 19) с применением THG ингибирует (-)-105-индуцированную смерть клеток. Следует отметить, что если присутствует THG, то происходит сильное ингибирование клеточной (-)-105-индуцированной смерти клеток через 1 час. ($n=3 \pm \text{COC}$).

Пример 3. Дополнительные данные для Соединений, связанные с 105.

На **Фигуре 24** представлено сравнение способности тестируемых соединений и ВНPI убивать TDG клетки. TDG клетки инкубировали в течение 24 часов с 75 нМ ВНPI или 75 нМ каждого из указанных тестируемых соединений: 4, 6 и ($\pm$)-105 (энантиомеры не разделены). Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. Структуры представлены в разделе Синтез. Вывод: По сравнению с ВНPI, соединения 4 и 105 демонстрируют значительно увеличенную способность убивать TDG клетки. ($n=3 \pm \text{COC}$).

На **Фигуре 25** представлено сравнение способности тестируемых соединений и ВНPI убивать TYS клетки. TYS клетки инкубировали в течение 24 часов с 35 нМ ВНPI или 35 нМ каждого из указанных тестируемых соединений: 2, 4, и 105. Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. ($n=3 \pm \text{COC}$). Таким образом, по

сравнению с ВНРІ, соединения 4 и 105 демонстрируют значительно увеличенную способность убивать TYS клетки.

На **Фигуре 26** представлено сравнение способности тестируемых соединений 4, 6, 105 и ВНРІ убивать TYS клетки. TYS клетки инкубировали в течение 24 часов с 50 нМ ВНРІ или 50 нМ каждого из указанных тестируемых соединений: 4, 6 и 105. Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. ($n=3 \pm \text{COC}$). Таким образом, по сравнению с ВНРІ, соединения 4 и 105 демонстрируют увеличенную способность убивать TYS клетки.

На **Фигуре 27** представлено сравнение способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать T47D клетки. T47D клетки инкубировали в течение 24 часов с 75 нМ ВНРІ или 75 нМ каждого из указанных тестируемых соединений: 4 и 6. Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. ($n=3 \pm \text{COC}$). Таким образом, соединение 4 проявляет значительно увеличенную способность убивать клетки рака молочной железы, содержащие рецептор эстрогена дикого типа.

На **Фигуре 28**, ни тестируемые соединения, ни ВНРІ не убивают необразующие опухоль ER α отрицательные MCF-10A клетки молочной железы. ER α Отрицательные MCF-10A клетки поддерживали в течение 24 часов в ДМСО наполнителе или 75 нМ ВНРІ или 75 нМ каждого из указанных тестируемых соединений: 4, 6 и 105. Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. ($n=3 \pm \text{COC}$). Таким образом, при концентрации 75 нМ, ни ВНРІ, ни любое из тестируемых соединений не индуцирует существенную гибель ER α отрицательных MCF-10A клеток.

На **Фигуре 29** представлена оценка способности тестируемых соединений и ВНРІ убивать T47D клетки. T47D клетки лечили в течение 24 часов с 100 нМ ВНРІ, или с 100 нМ каждого из тестируемых соединений: 6, 8, и 105. (н.д. недостоверно). Определяли клеточную смерть, используя анализ с помощью приборов вытеснения трипанового синего. ($n=3 \pm \text{COC}$). Таким образом, по сравнению с ВНРІ, соединения 105 проявляют увеличенную способность убивать T47D клетки.

На **Фигуре 30** сравнивали способность ВНПІ и тестируемых соединений ингибировать пролиферацию T47D, TYS и TDG клеток. T47D клетки находились в среде, содержащей 10 FBS (которая содержит эстроген), TYS-4 и TDG-1 клетки находились в среде, содержащей 10% cd-FBS (истощенной по эстрогену). Клетки
 5 высевали в количестве 2000 клеток/лунку в планшеты на 96 лунок. Через 24 часа в среде, содержащей FBS или обработанной активированным углем-декстраном FBS (истощенной по эндогенным эстрогенам), добавляли указанную концентрацию каждого соединения (в ДМСО при 1/1000 объема среды). Через 2 дня среду заменяли, и снова добавляли соединения. Через дополнительные 2 дня
 10 (всего 4 дня) проводили MTS анализы для количественной оценки пролиферации клеток. ($n=6 \pm \text{C.O.C.}$). Таким образом, ВНПІ и новые соединения эффективно ингибируют пролиферацию T47D, TYS-4 и TDG-1 клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что соединения 2, 4, 6 и 105 являются более эффективными по сравнению с ВНПІ для уничтожения этих ER α положительных
 15 клеток рака молочной железы.

Дополнительные данные представлены на **Фигурах 31 и Фигурах 33-43**. Благодаря подходу медицинской химии, было открыто, что ($\pm$)-1 проявляет неожиданный цитотоксический фенотип (**Фигура 36A**). Все известные нацеленные терапии к альфа-рецептору эстрогена (ER α) являются
 20 цитостатическими, что обозначает, что они только предотвращают рост клеток и не убивают раковые клетки. Препаративная хиральная колоночная хроматография обеспечила доступ к энантиомерно чистому материалу (**Пример 4**), идентифицированному поляриметрически как (-)-105 и (+)-105. Хиральная дериватизация и рентгеноструктурная кристаллография дополнительно
 25 охарактеризовали активный энантиомер, имеющий (*R*)-конфигурацию и неактивный энантиомер, имеющий (*S*)-конфигурацию (**Схема 5**). Биологические данные (**Фигура 36B** и **Пример 4**) продемонстрировали, что *R*-1 является цитотоксическим по отношению к ER α положительным клеткам (MCF-7) с минимальными влияниями, наблюдаемыми в ER α отрицательных клетках (MDA-
 30 MB-231). Таким образом, соединение было переименовано как SERK-F6 для селективного киллера рецептора эстрогена (Selective Estrogen Receptor Killer) с этой версией, имеющей шесть фторов). Эта дозозависимая активность SERK-F6

была определена на панели раковых клеточных линий (**Фигура 36С** и **Фигура 37А**) для ER α .

Важным аспектом для цитотоксической терапии является способность количественно убивать клеточную популяцию. SERK-F6 количественно убивает ER α клеточные линии в быстром 24-часовом исследовании кристаллического фиолетового (**Фигура 36D**) и в долгосрочных экспериментах на культивируемых клетках (**Фигура 36Е-Ф** и **Фигура 37В**). SERK-F6 убивает с помощью заранее ожидаемой активации реакции на несложные белки (UPR) (**Фигура 38**).

Важными маркерами этого механизма являются увеличенные уровни сплайсированного XBP1 (sp-XBP1) (**Фигура 38А**), быстрое снижение клеточных уровней АТФ (**Фигура 38В**), и быстрое ингибирование синтеза белка (**Фигура 38С**).

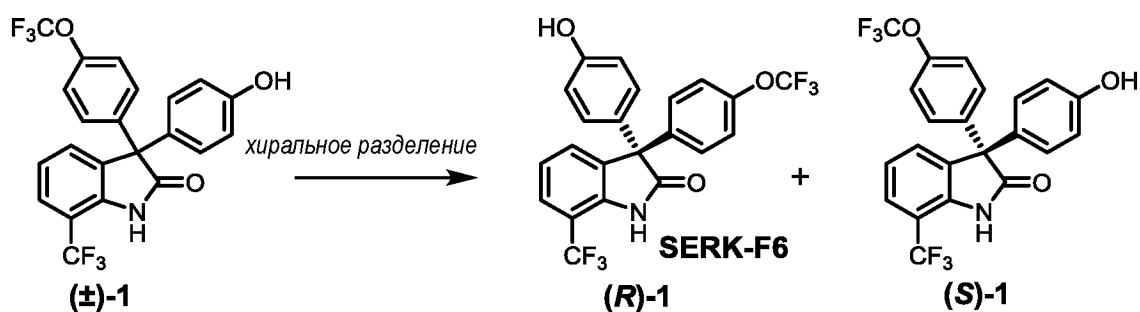
Фармакокинетические параметры SERK-F6 измеряли у мышей (**Фигура 40А-В**). Дополнительные исследования продемонстрировали, что SERK-F6 проникает через гематоэнцефалический барьер (**Фигура 40С-D**). Также, долгосрочное лечение с применением SERK-F6 не удаляет массу ER α тканей, как показано с помощью циркулирующих уровней эстрадиола (**Фигура 40Е**). Эти данные свидетельствуют о том, что SERK-F6 может достигать биологически релевантных концентраций *in-vivo* и быть хорошо переносимым.

Для выяснения эффективности SERK-F6 для уничтожения ER α положительных опухолей, выращивали большие MCF-7 опухоли и затем их подвергали лечению. Лечение с применением SERK-F6 приводит к очень существенной регрессии опухолей (**Фигура 39А** и **Фигура 40F-G**). В связи с тем, что существующее в настоящее время лечение (то есть фулвестрант, Фульв.) является цитостатическим, сильные эффекты по отношению к этим большим и развитым опухолям не были получены. Дополнительно, ежедневное лечение с применением SERK-F6 не приводило к какому-либо изменению веса мышей во время осуществления исследования, что демонстрирует переносимость SERK-F6 *in-vivo* (**Фигура 40H**). Кроме того, для демонстрации механизма действия SERK-F6 *in-vivo*, MCF-7 опухоли прививали у мышей и затем лечили с применением SERK-F6. Затем мышей умертвляли перед полным уничтожением опухоли. Эти данные показывают активацию UPR с увеличениями уровней P-PERK и P-eIF2альфа (**Фигура 39В-Е** и **Фигура 40I-J**).

В связи с тем, что $ER\alpha$ мутации, приводящие к конститутивной активации и резистентности к терапии, представляют клиническую проблему, было показано, что SERK-F6 также может быть нацелен на эти резистентные опухоли. Таким образом, SERK-F6 уничтожает Y537S опухоли (то есть TYS клеточную линию) в зависимости от дозы и при режиме введения многократных доз (то есть, введение в/б и перорально) и также является переносимым (**Фигура 41A-D** и **Фигура 42B-C**). При прекращении лечения, опухоли не осуществляли повторный рост, что указывает на полное уничтожение опухолей (**Фигура 42A**). С более низкой субтерапевтической дозой SERK-F6 (то есть 10 мг/кг перорально), опухоли повторно росли, но повторное лечение этих опухолей с более высоких доз SERK-F6 продемонстрировало, что эти повторно выросшие опухоли все еще являются чувствительными к SERK-F6 и не являются резистентными (**Фигура 42D**). Эти результаты показывают важность полного убийства клеток для уничтожения злокачественных новообразований. Лечение с применением SERK-F6 также приводит к разрушению D538G мутантных опухолей (TDG клеточная линия) (**Фигура 41D-E**). Лечение с применением SERK-F6 также является переносимым (**Фигура 42E**) при более высоких дозах и достаточным для уничтожения опухолей (**Фигура 42F**). Несмотря на то, что более низкие дозы не полностью уничтожают опухоли, повторное лечение этих опухолей с применением более высоких доз SERK-F6 приводит к регрессии опухолей (**Фигура 42G-H**).

Для подтверждения того, что регрессия опухолей наблюдается не только с T47D фоновыми клеточными линиями (TYS и TDG), MCF-7 клетки лечили с применением SERK-F6 с Y537S или D538G мутациями в их $ER\alpha$ белках (MYS и MDG клетки, соответственно). Наблюдали очень сильную регрессию опухолей (**Фигура 41F-G**, и **Фигура 43A-D**). Аналогично, необходимы более высокие дозы для полной ответной реакции опухолей, тогда как более низкие дозы приводят к росту нерезистентной опухоли (**Фигура 43 B-D**). Лечение с применением SERK-F6 также уничтожает метастатическую опухолевую нагрузку (**Фигура 41I**).

Пример 4. Определение абсолютной конфигурации и IC₅₀ энантиомеров соединения 1 (105).

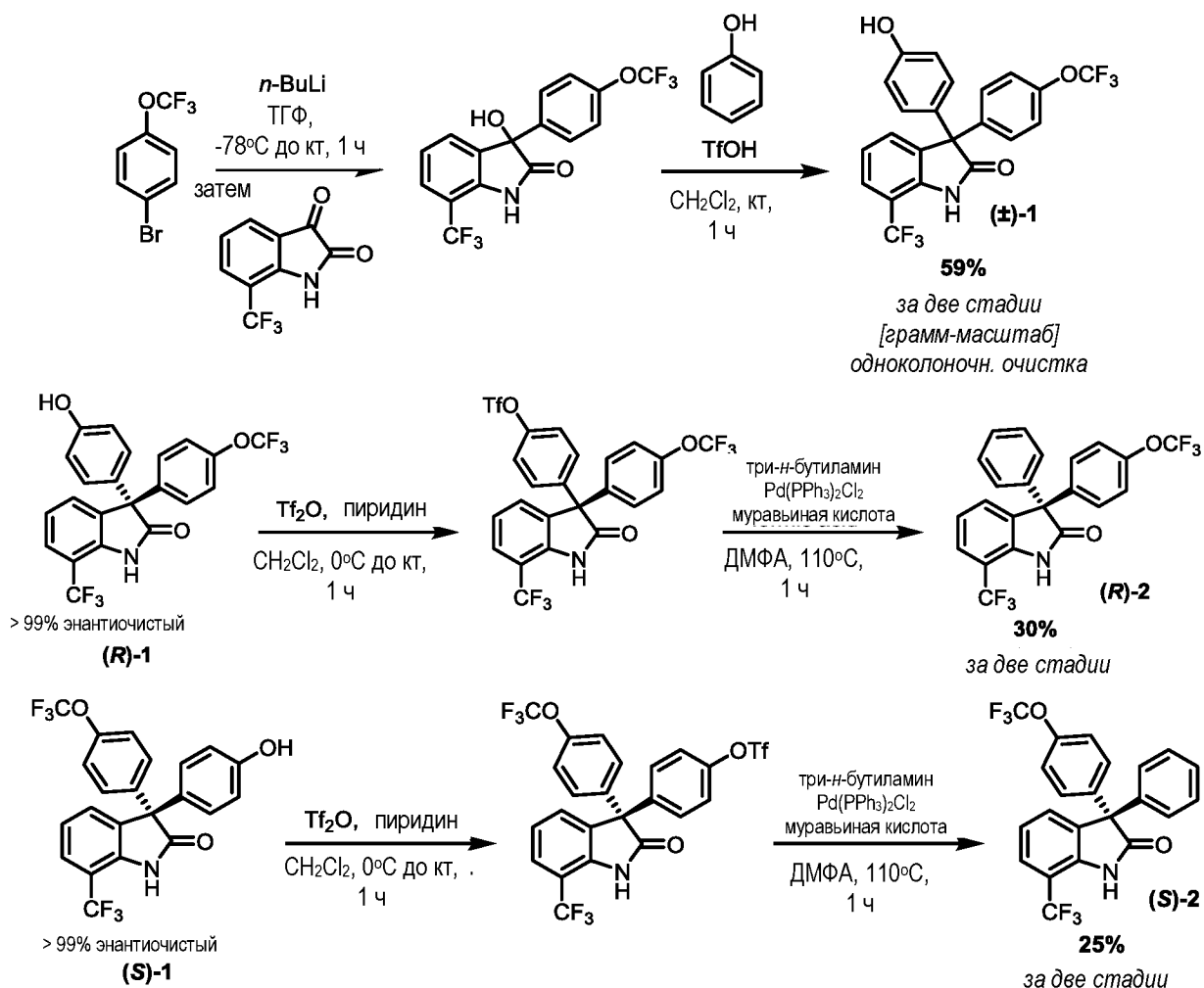


$$^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} : -14,6^\circ (\pm 0,1^\circ) \quad ^{589}[\alpha]_{\text{CHCl}_3} : +13,8^\circ (\pm 0,1^\circ)$$

Выды	IC ₅₀ (нМ)	С.О.С.
(±)-1	42,6	1,9
(R)-1	20,3	0,9
(S)-1	> 1000	-

При препаративном хиральном разделении в шкале граммов (±)-1 получали энантиочистые (R)-1 и (S)-1 с противоположными оптическими вращениями (Схема 5). IC₅₀ значения для (±)-1, (R)-1, и (S)-1 по отношению к MCF-7 клеткам продемонстрировали, что (R)-1 является активными видами, обозначаемый как **SERK-F6**. Значения получали после инкубирования в течение 24 часов, используя флуоресцентный анализ аламарового синего, нормированный к живым и убитым контролям (обработанные наполнителем и раптиналом). (S)-1 IC₅₀ составляет > 1 мкМ. Погрешность представлена в виде С.О.С.

Схема 5. Последовательность синтеза для получения кристаллизующихся **(R)**-1 и **(S)**-1 производных: Определение структур **(R)**-2 и **(S)**-2 с помощью рентгеновских лучей.



Пример 5. Фармацевтические лекарственные формы.

Последующие препараты иллюстрируют репрезентативные фармацевтические лекарственные формы, которые могут использоваться для терапевтического или профилактического введения соединения формулы, описанного в настоящей заявке, соединения, специфически описанного в настоящей заявке, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата (далее в настоящей заявке обозначается как 'Соединение X'):

(I) Таблетка 1

	мг/таблетку
'Соединение X'	100,0
Лактоза	77,5
Повидон	15,0

	Кроскармеллоза натрия	12,0
	Микрокристаллическая целлюлоза	92,5
	Стеарат магния	<u>3,0</u>
5		300,0
	<u>(II) Таблетка 2</u>	<u>мг/таблетку</u>
	'Соединение X'	20,0
	Микрокристаллическая целлюлоза	410,0
10	Крахмал	50,0
	Натрия крахмала гликолят	15,0
	Стеарат магния	<u>5,0</u>
		500,0
15	<u>(III) Капсула</u>	<u>мг/капсулу</u>
	'Соединение X'	10,0
	Коллоидный диоксид кремния	1,5
	Лактоза	465,5
	Прежелатинизированный крахмал	120,0
20	Стеарат магния	<u>3,0</u>
		600,0
	<u>(IV) Инъекция 1 (1 мг/мл)</u>	<u>мг/мл</u>
	'Соединение X' (форма свободной кислоты)	1,0
25	Двухосновный фосфат натрия	12,0
	Одноосновный фосфат натрия	0,7
	Хлорид натрия	4,5
	1,0 н. раствор гидроксида натрия	q.s.
	(доведение pH до 7,0-7,5)	
30	Вода для инъекций	q.s. ad 1 мл
	<u>(V) Инъекция 2 (10 мг/мл)</u>	<u>мг/мл</u>
	'Соединение X' (форма свободной кислоты)	10,0
	Одноосновный фосфат натрия	0,3
35	Двухосновный фосфат натрия	1,1
	Полиэтиленгликоль 400	200,0
	0,1 н. раствор гидроксида натрия	q.s.
	(доведение pH до 7,0-7,5)	
	Вода для инъекций	q.s. ad 1 мл
40	<u>(VI) Аэрозоль</u>	<u>мг/конт.</u>
	'Соединение X'	20
	Олеиновая кислота	10
	Трихлормонофторметан	5000
45	Дихлордифторметан	10000
	Дихлортетрафторэтан	5000

(VII) Гель местного действия 1 мас. %

5	'Соединение X'	5%
	Карбомер 934	1,25%
	Триэтаноламин	q.s.
	(доведение pH до 5-7)	
	Метилпарабен	0,2%
	Очищенная вода	q.s. до 100 г

(VIII) Гель местного действия мас. %

10	Композиция X'	5%
	Метилцеллюлоза	2%
	Метилпарабен	0,2%
	Пропилпарабен	0,02%
	Очищенная вода	q.s. до 100 г

15

(IX) Мазь местного действия мас. %

20	'Соединение X'	5%
	Пропиленгликоль	1%
	Безводная мазевая основа	40%
	Полисорбат 80	2%
	Метилпарабен	0,2%
	Очищенная вода	q.s. до 100 г

(X) Крем местного действия 1 мас. %

25	'Соединение X'	5%
	Белый пчелиный воск	10%
	Жидкий парафин	30%
	Бензиловый спирт	5%
	Очищенная вода	q.s. до 100 г

30

(XI) Крем местного действия 2 мас. %

35	'Соединение X'	5%
	Стеариновая кислота	10%
	Глицерилмоностеарат	3%
	Полиоксиэтиленстеариловый эфир	3%
	Сорбит	5%
40	Изопропилпальмитат	2 %
	Метилпарабен	0,2%
	Очищенная вода	q.s. до 100 г

Эти препараты могут быть приготовлены с помощью общепризнанных процедур, хорошо известных в фармацевтической области. Следует принять во внимание, что вышеуказанные фармацевтические композиции могут изменяться в соответствии с хорошо известными фармацевтическими технологиями для предоставления различных количеств и типов активного компонента

45

'Соединения X'. Аэрозольный препарат (VI) можно использовать в сочетании со стандартным диспенсером дозированного аэрозоля. Дополнительно, специфические ингредиенты и количественные соотношения представлены с целью иллюстрации. Ингредиенты могут быть заменены на подходящие

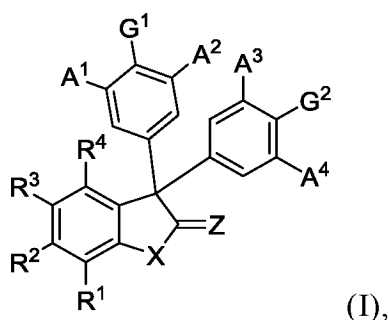
5 эквиваленты и количественные соотношения могут изменяться, в соответствии с желательными свойствами представляющей интерес лекарственной формы.

В то время как специфические варианты осуществления описаны выше со ссылкой на раскрытые варианты осуществления и примеры, такие варианты осуществления являются исключительно иллюстративными и не ограничивают
10 объем изобретения. Квалифицированным специалистом в данной области техники могут быть осуществлены изменения и модификации без отклонения от изобретения в его наиболее широких аспектах, как определяется в последующих пунктах формулы изобретения.

Все публикации, патенты и патентные документы включены в настоящую
15 заявку путем ссылки, как они были бы индивидуально включены путем ссылки. Нет никак ограничений, не согласовывающихся с настоящим раскрытием. Изобретение описано со ссылкой на различные специфические и предпочтительные варианты осуществления и методики. Тем не менее, следует понимать, что могут быть осуществлены многие вариации и модификации без
20 отклонения от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы I:



5 или его соль или сольват;

где

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой каждый независимо H, гало, $-OR^A$, $-SR^A$, $-N(R^A)_2$, алкил, циклоалкил, гетероцикл, арил или гетероарил;

10 A^1 , A^2 , A^3 и A^4 представляют собой каждый независимо H, гало, или алкил;

G^1 представляет собой гало, $-OR^B$, $-SR^B$, $-S(=O)_2R^B$, или алкил;

G^2 представляет собой гало, $-OR^C$, $-SR^C$, $-S(=O)_2R^C$, или алкил;

X и Z представляют собой каждый независимо O, S, или $-NR^D$; и

15 R^A , R^B , R^C и R^D представляют собой каждый независимо H или алкил, где, если присутствуют, $-OR^B$ и $-OR^C$ оба не представляют собой $-OH$;

где каждый алкил, циклоалкил, гетероцикл, арил и гетероарил необязательно замещены одним или несколькими заместителями.

20

2. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой (*S*)-энантиомер.

3. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой (*R*)-энантиомер.

25

4. Соединение по пункту 1, где R^A , R^B , R^C и R^D представляют собой каждый независимо H или $-(C_1-C_6)$ алкил, и R^1 , R^2 , R^3 и R^4 представляют собой каждый независимо H, гало, или $-(C_1-C_6)$ алкил.

5. Соединение по пункту 1, где A^1 , A^2 , A^3 и A^4 представляют собой каждый независимо Н или гало, и G^1 представляет собой $-OR^B$.

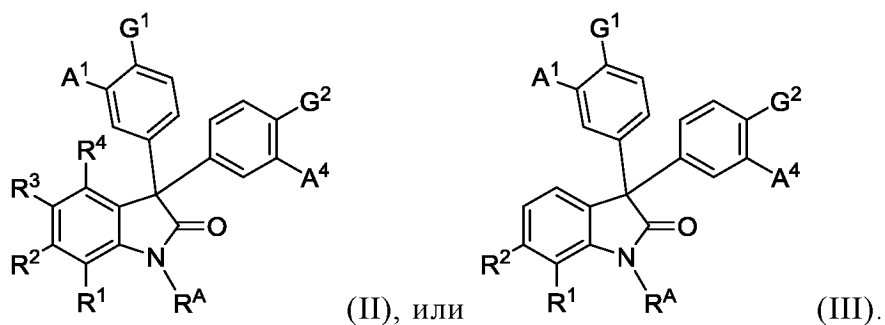
5 6. Соединение по пункту 1, где X представляет собой $-NR^D$ и Z представляет собой О.

7. Соединение по пункту 1, где R^1 представляет собой CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , или CF_2CF_3 .

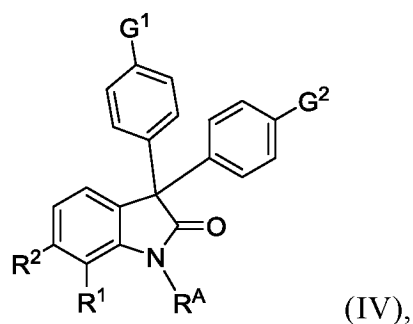
10

8. Соединение по пункту 1, где G^1 представляет собой $-OR^B$, и R^B представляет собой CH_3 , CH_2CH_3 , CF_3 , CHF_2 , CH_2CF_3 , CF_2CH_3 , или CF_2CF_3 .

9. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой соединение
15 Формулы II или Формулы III:



10. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой соединение Формулы IV:



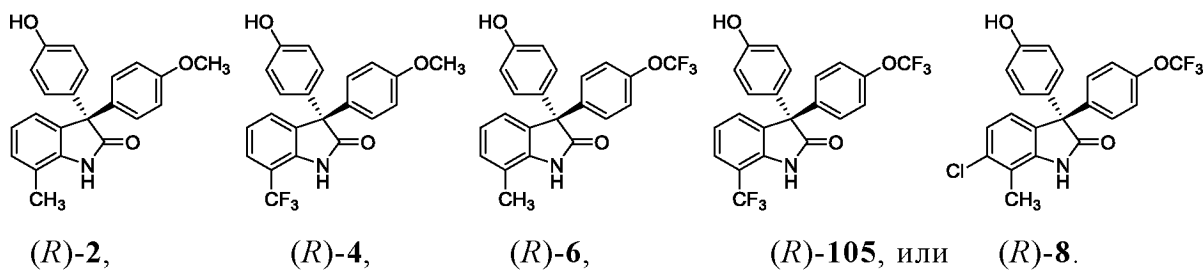
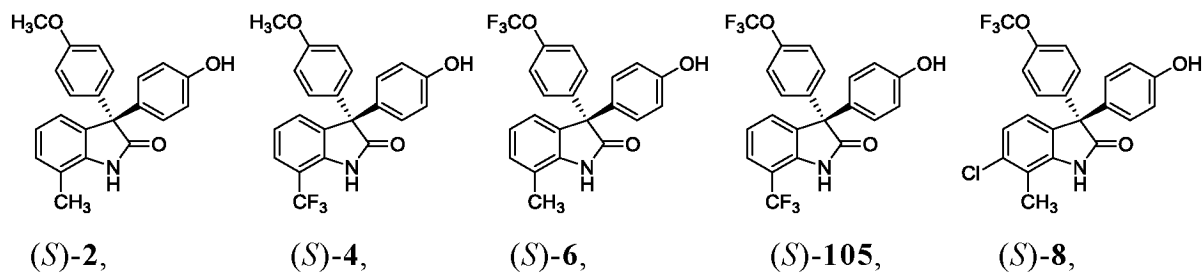
20

где G^1 представляет собой $-OR^B$, и R^B и R^1 представляют собой каждый независимо алкил или циклоалкил, где алкил и циклоалкил необязательно замещены одной или несколькими гало группами.

11. Соединение по пункту 1, где один или несколько атомов водорода представляют собой дейтерий или тритий, один или несколько атомов углерода представляют собой изотоп углерода, или их комбинацию.

5

12. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой любое из соединений (*S*)- или (*R*)-2, 4, 6, 8 или 105:



10

13. Соединение по пункту 12, где соединение является левовращающим.

15 14. Соединение по пункту 12, где соединение является правовращающим.

15. Соединение по пункту 12, где соединение представляет собой (*R*)-105 или (*S*)-105.

20 16. Соединение по пункту 15, где соединение представляет собой (*R*)-105.

17. Соединение по пункту 1, где соединение имеет связывающую аффинность к альфа-рецептору эстрогена ($ER\alpha$), и IC_{50} связывающей аффинности составляет менее, чем приблизительно 500 нМ.

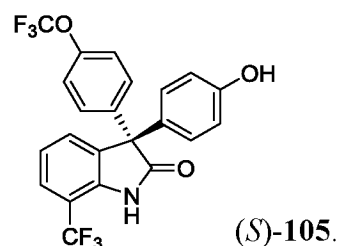
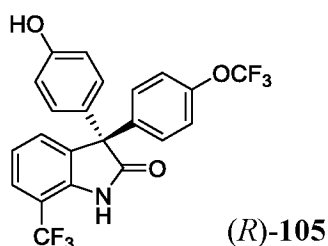
25

18. Композиция, содержащая соединение по одному из пунктов 1-17 и второе лекарственное средство.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по одному из пунктов 1-17 в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, наполнителем или буфером.

5

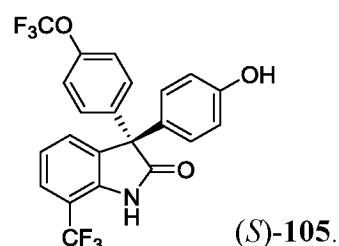
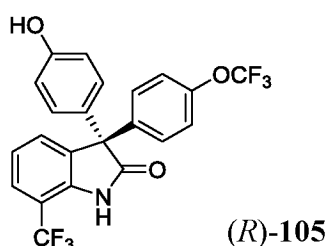
20. Фармацевтическая композиция по пункту 19, где соединение представляет собой рацемическую смесь (*R*)-105 и (*S*)-105:



10 21. Способ лечения рака, включающий введение субъекту с ER α положительным раком, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества соединения по одному из пунктов 1-17, таким образом осуществляя лечения рака у субъекта.

15 22. Способ по пункту 21, где соединение убивает или ингибирует рост ER α положительного рака путем гиперактивации реакции на несложные белки (UPR) в эндоплазматическом ретикулеуме.

20 23. Способ по пункту 21, где соединение представляет собой рацемическую смесь (*R*)-105 и (*S*)-105:

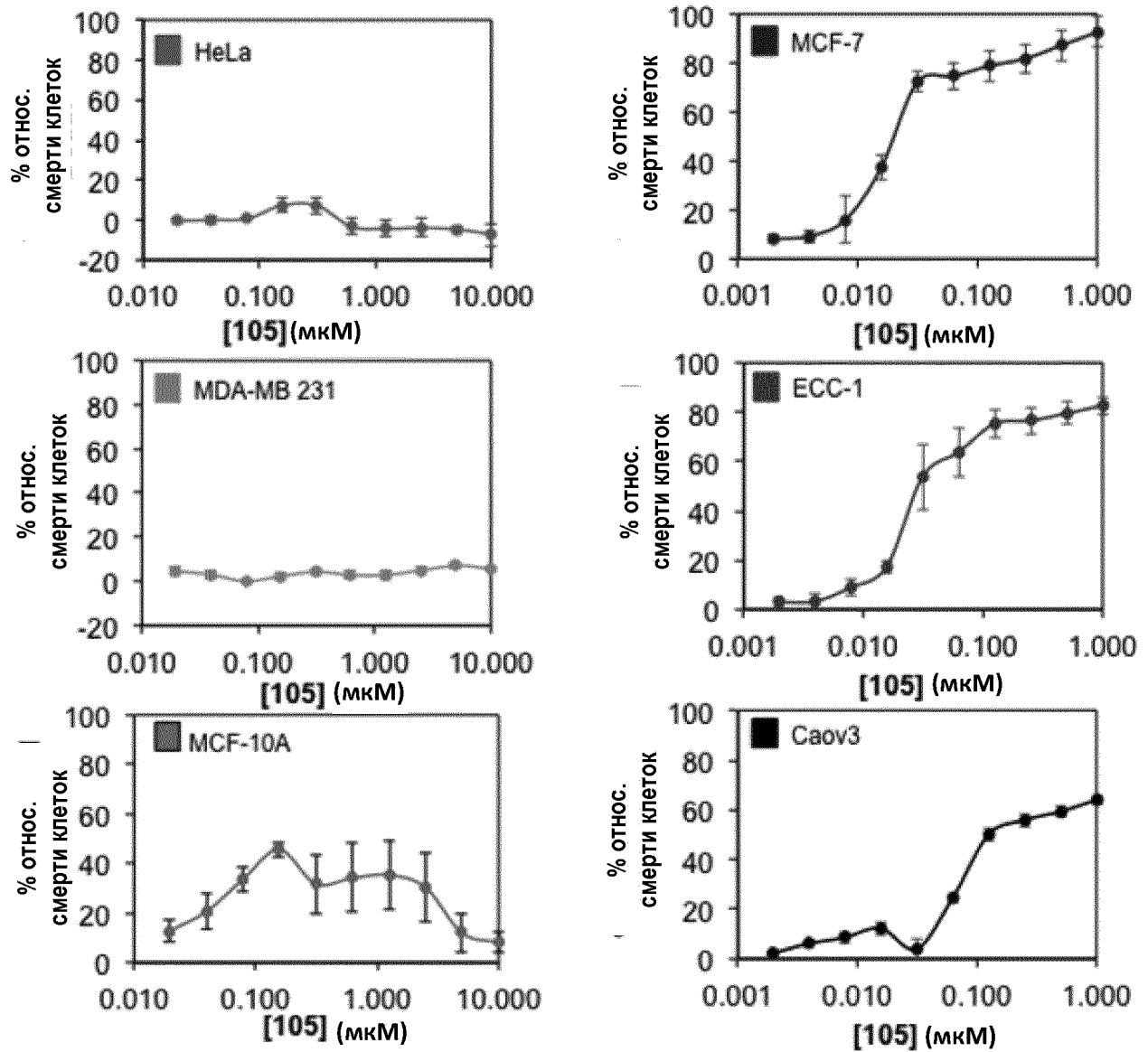


25 24. Способ по пункту 21, где ER α положительный рак представляет собой рак молочной железы, рак яичников, рак матки, карциному шейки матки или рак эндометрия.

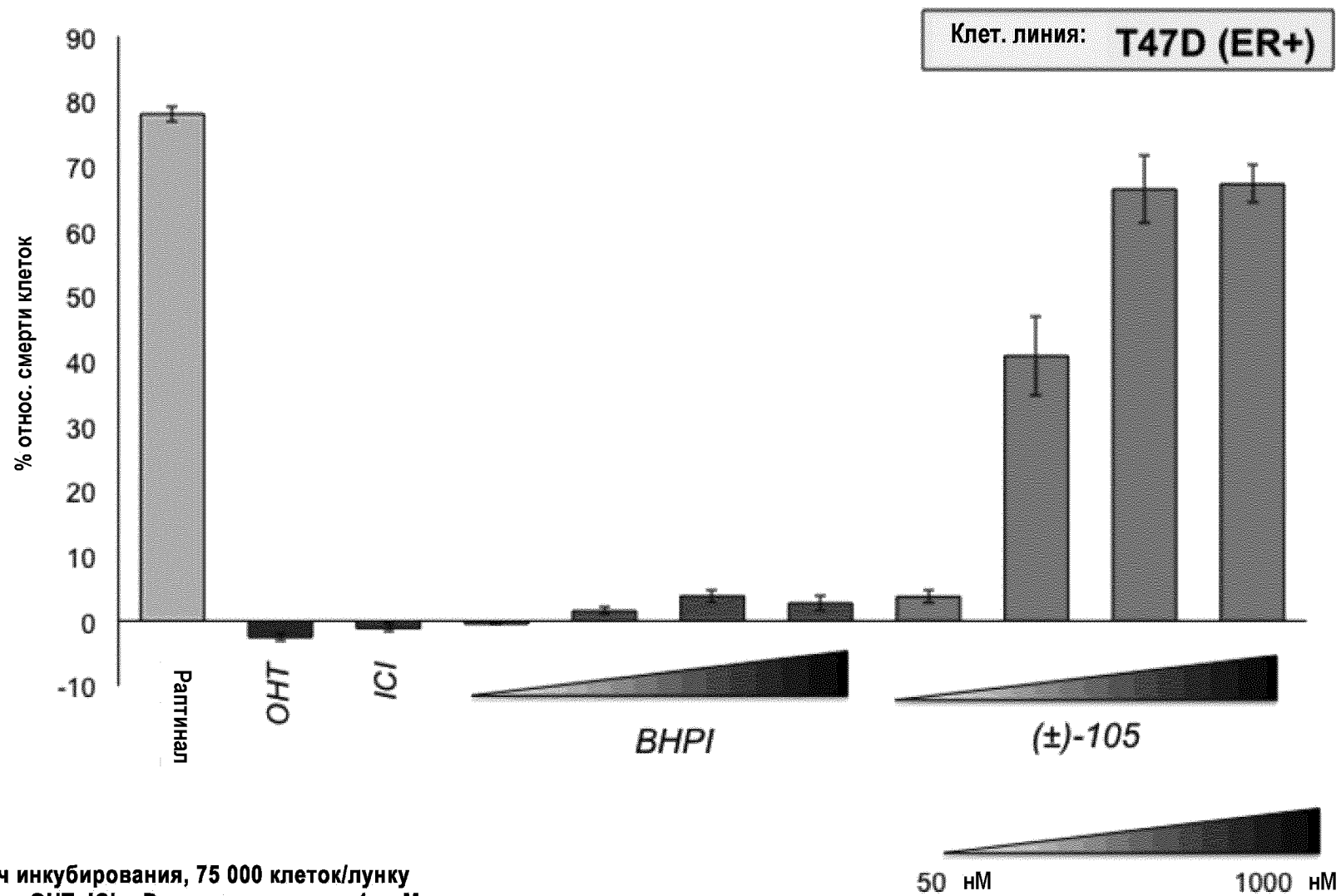
25. Способ по пункту 21, где соединение вводят перорально или путем инъекции.

5 26. Применение соединения по одному из пунктов 1-17 для лечения ER α положительного заболевания у субъекта, который в этом нуждается, где терапевтически эффективное количество соединения вводят субъекту, таким образом осуществляя лечения рака у субъекта.

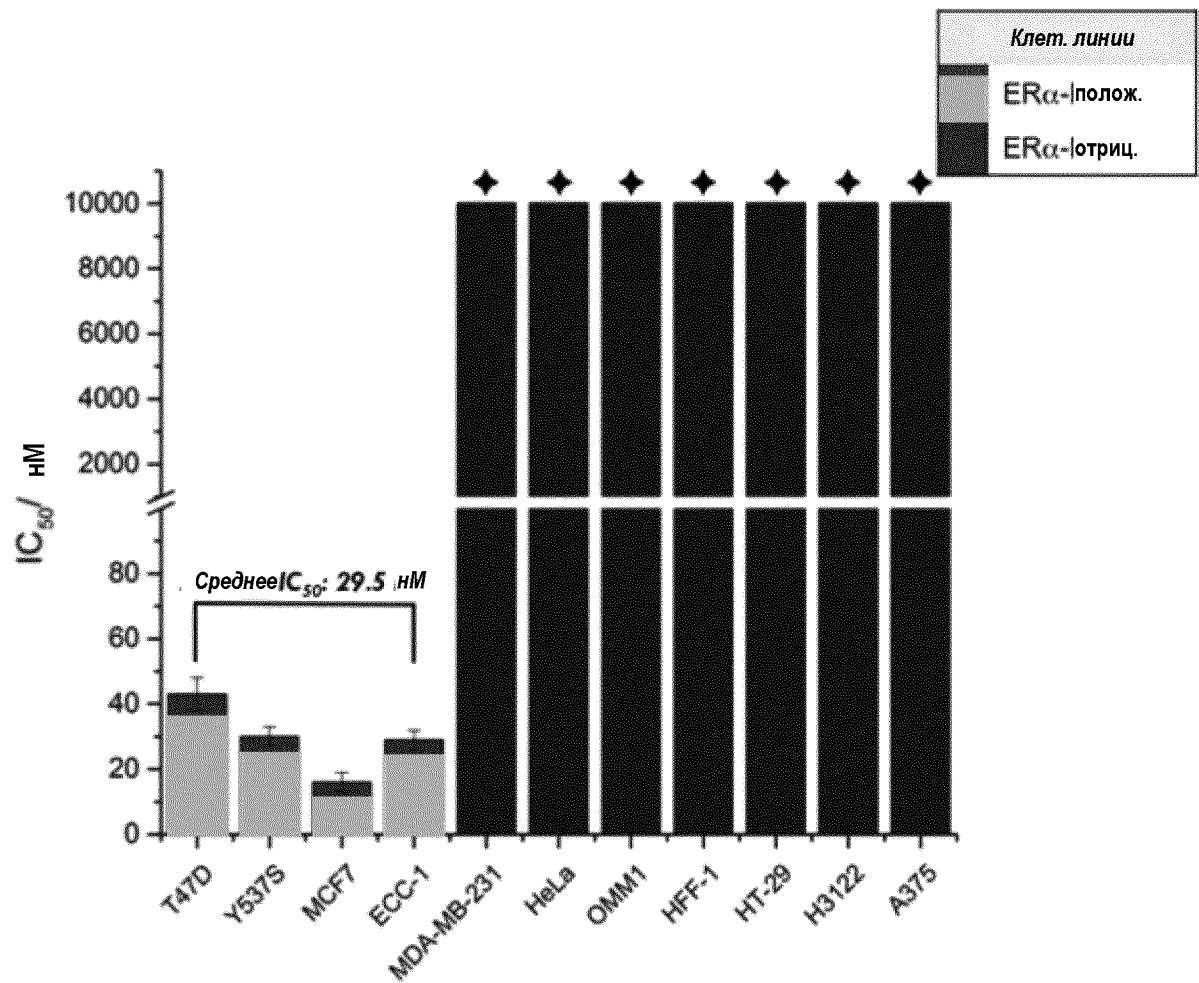
10 27. Применение по пункту 26, где ER α положительное заболевание представляет собой рак молочной железы, рак яичников, рак матки, карциному шейки матки или рак эндометрия.



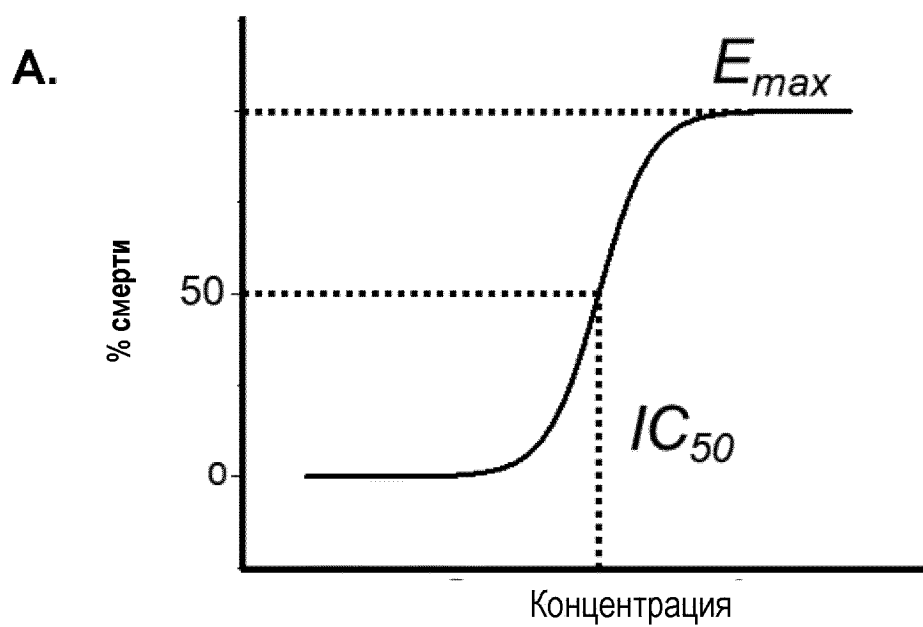
Фиг. 1



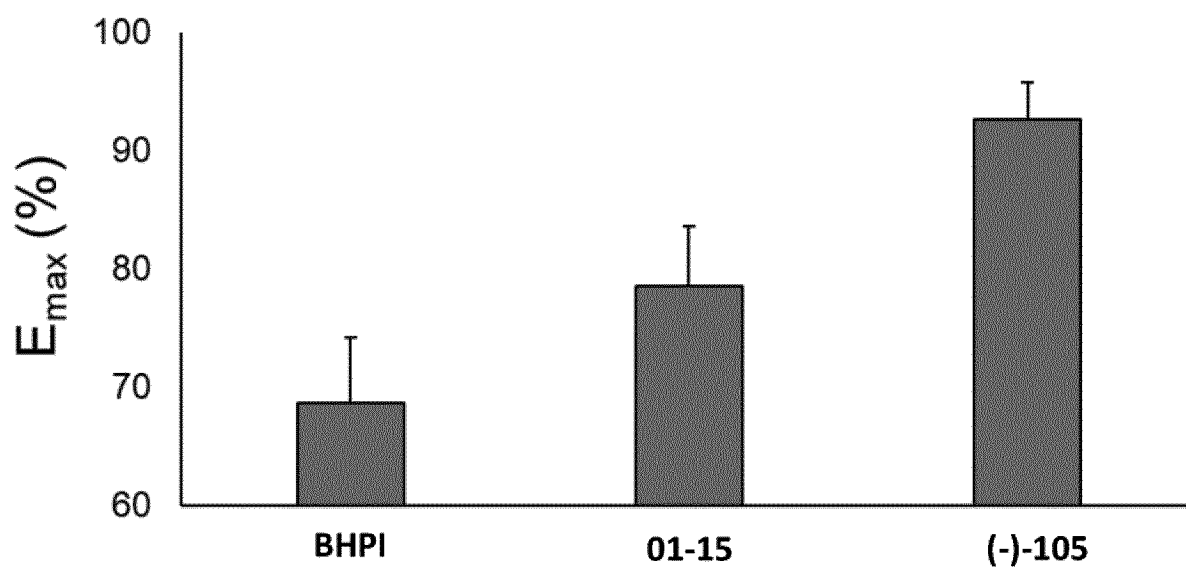
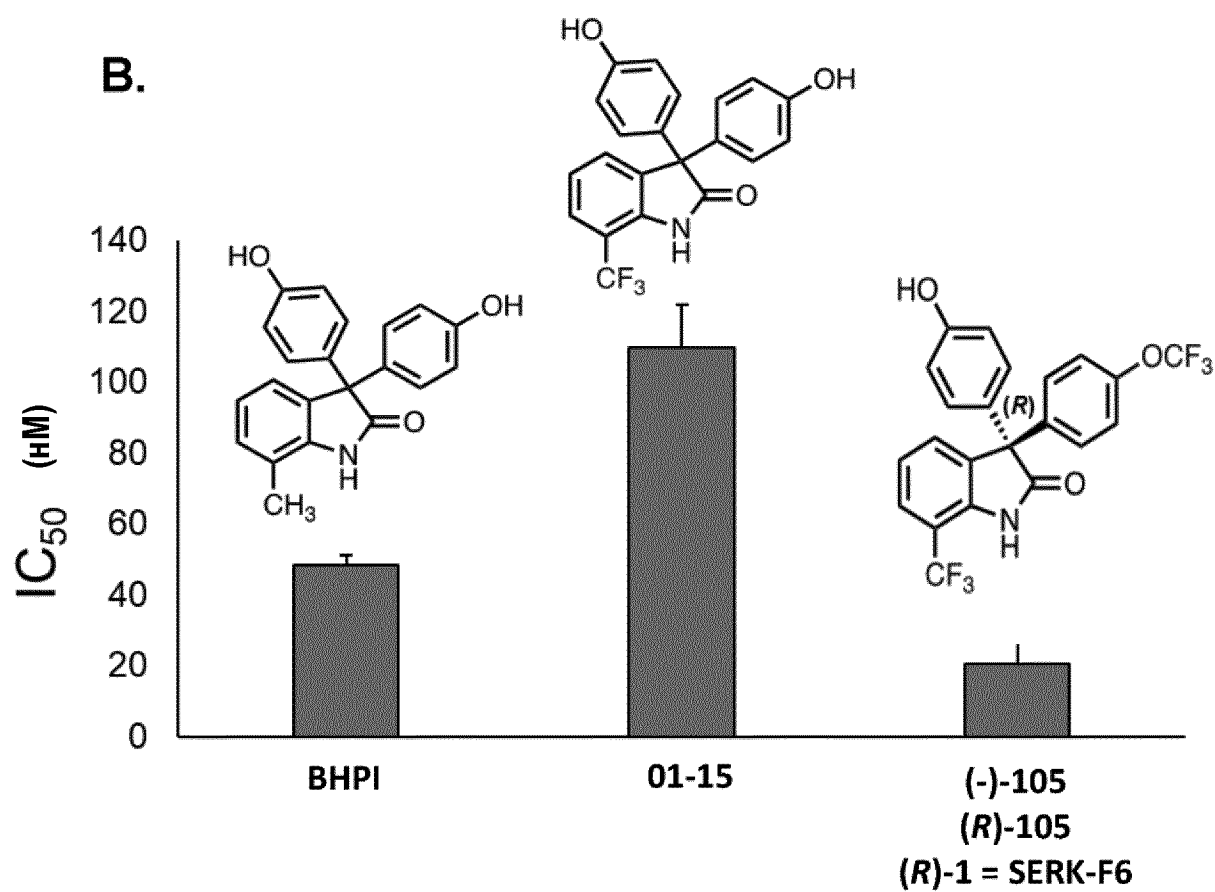
Фиг. 2



Фиг. 3

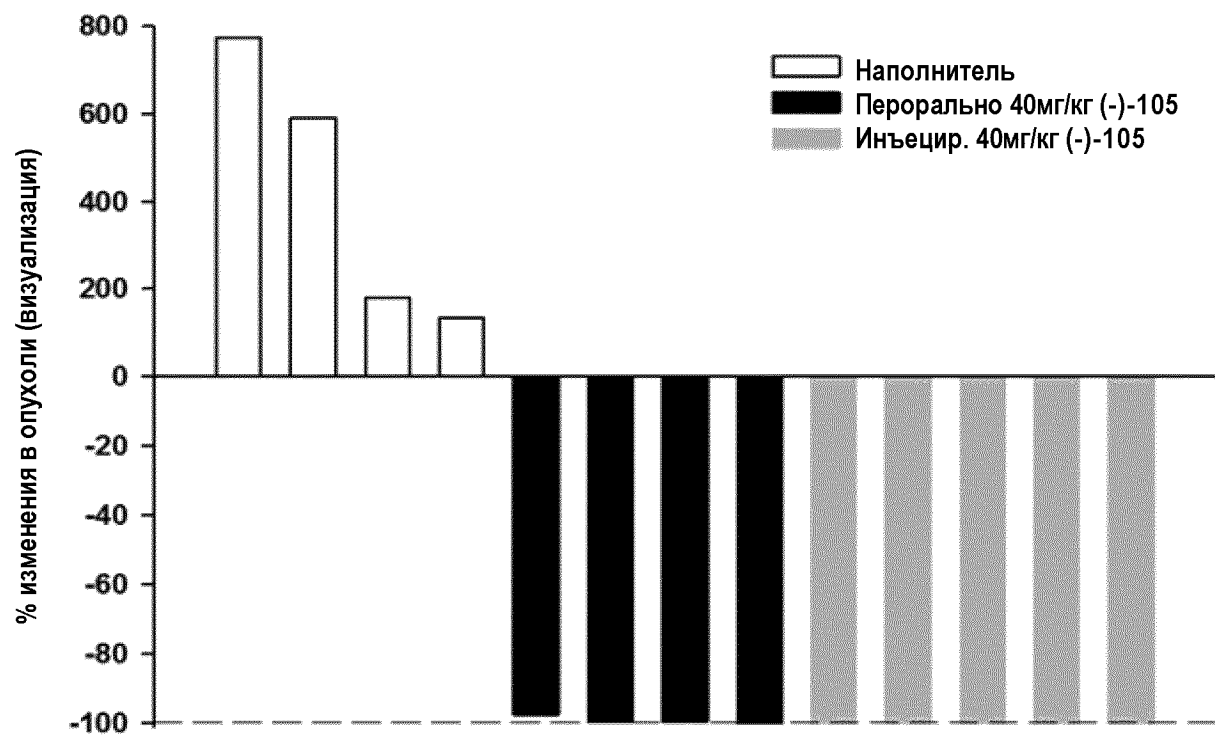


Фиг. 4

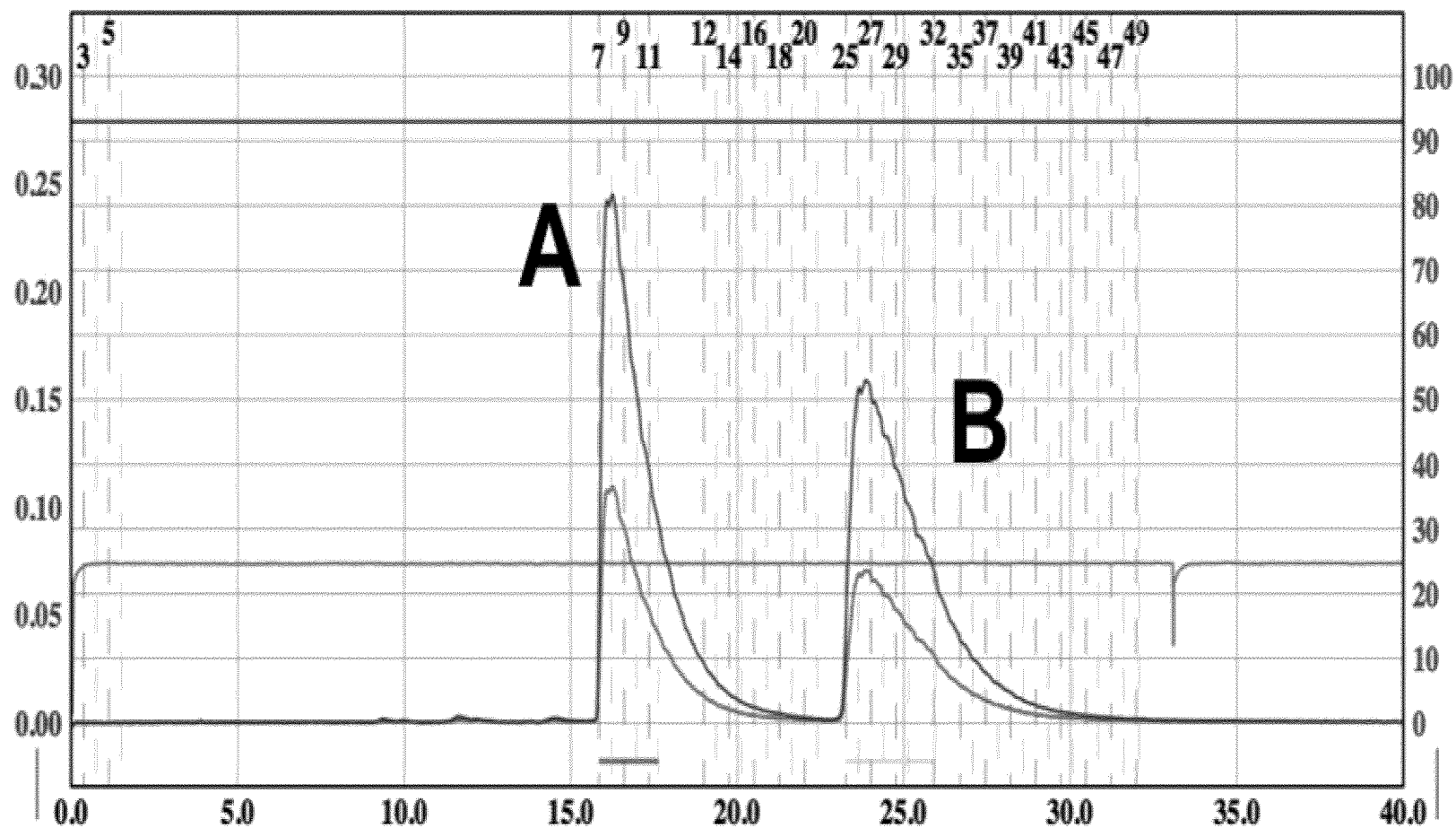


Фиг. 4 (прод.)

С.



Фиг. 4 (прод.)

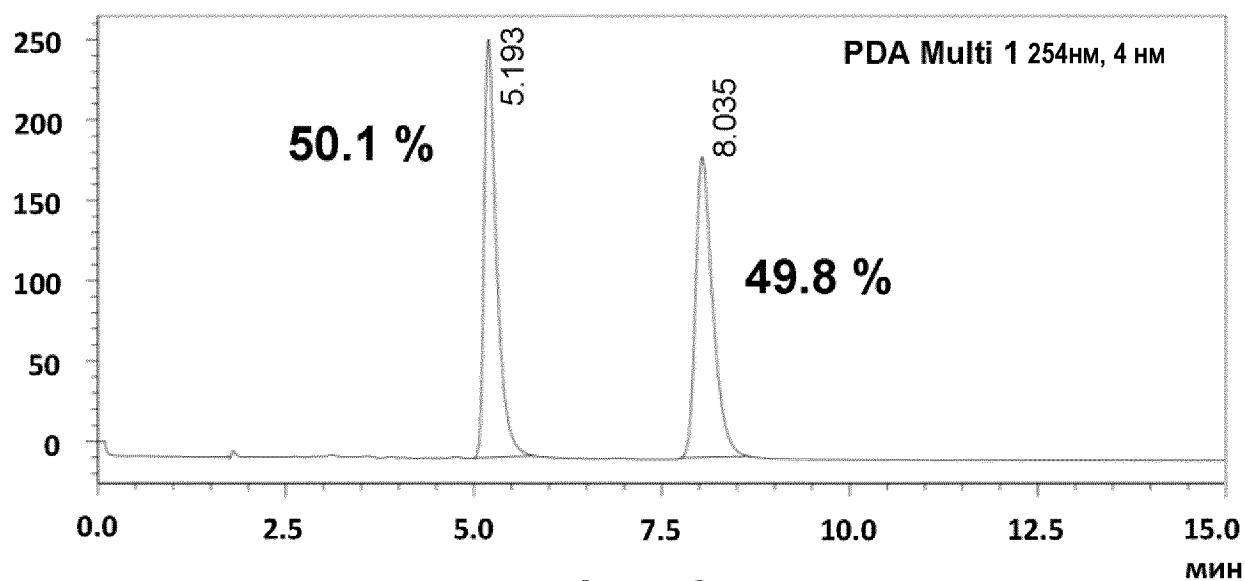


Поглощение

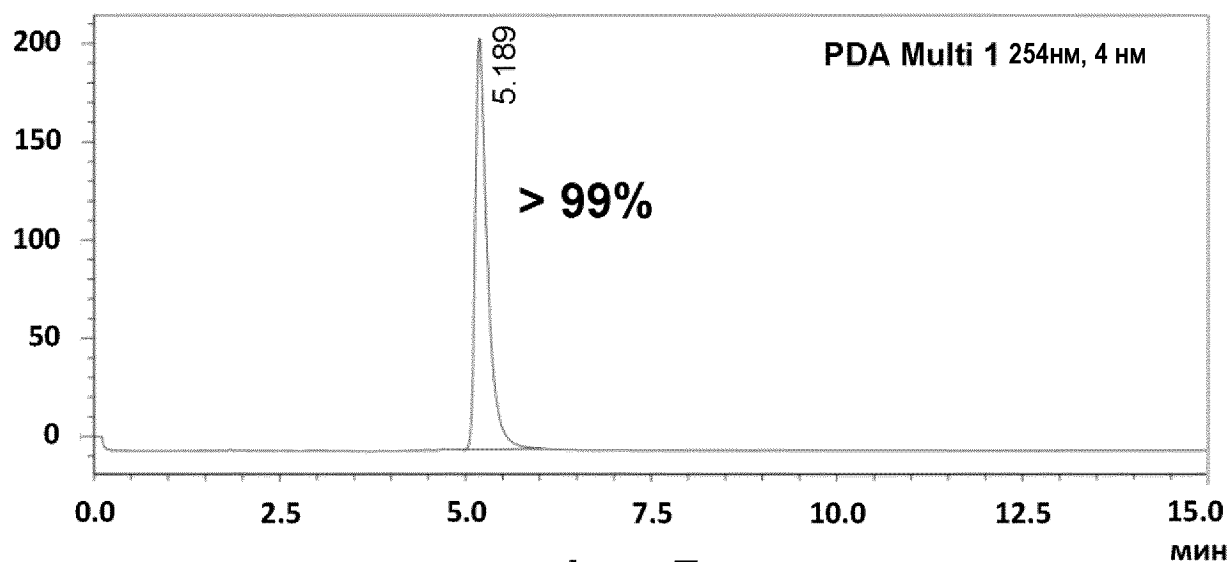
Длина прогона 40,0 Мин

Процент В

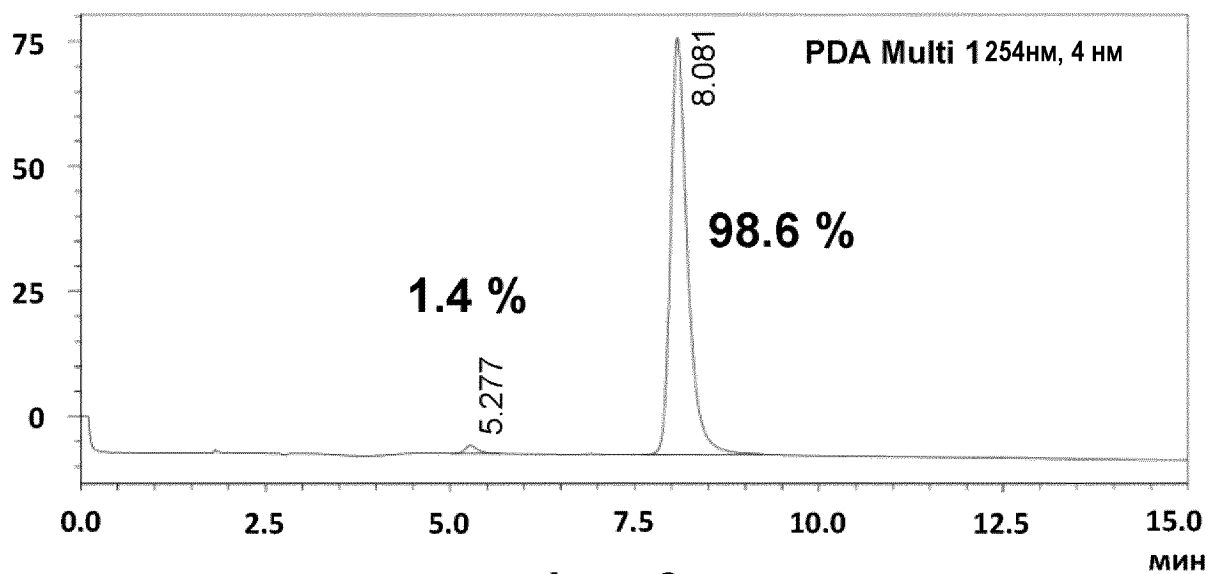
Фиг. 5



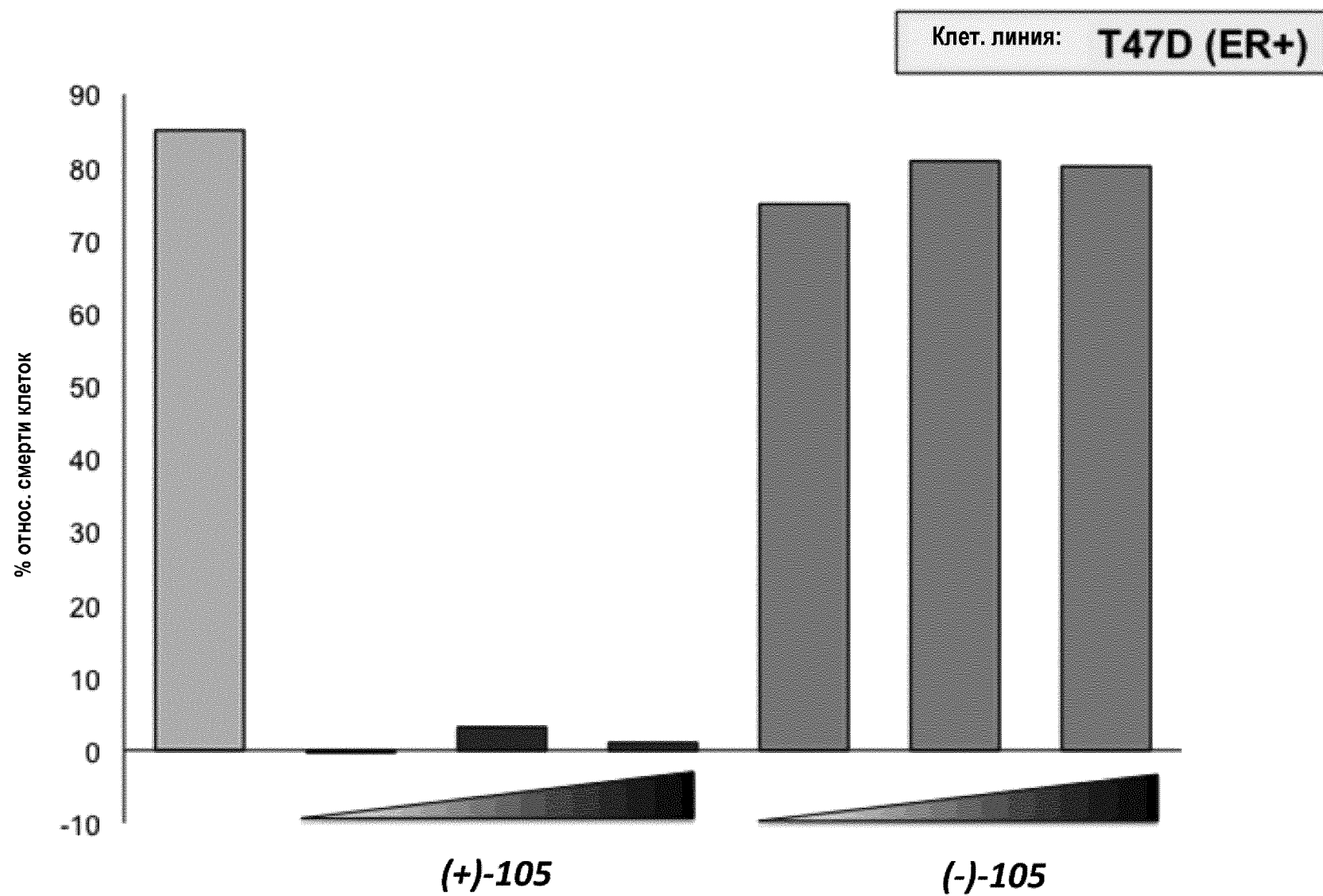
Фиг. 6



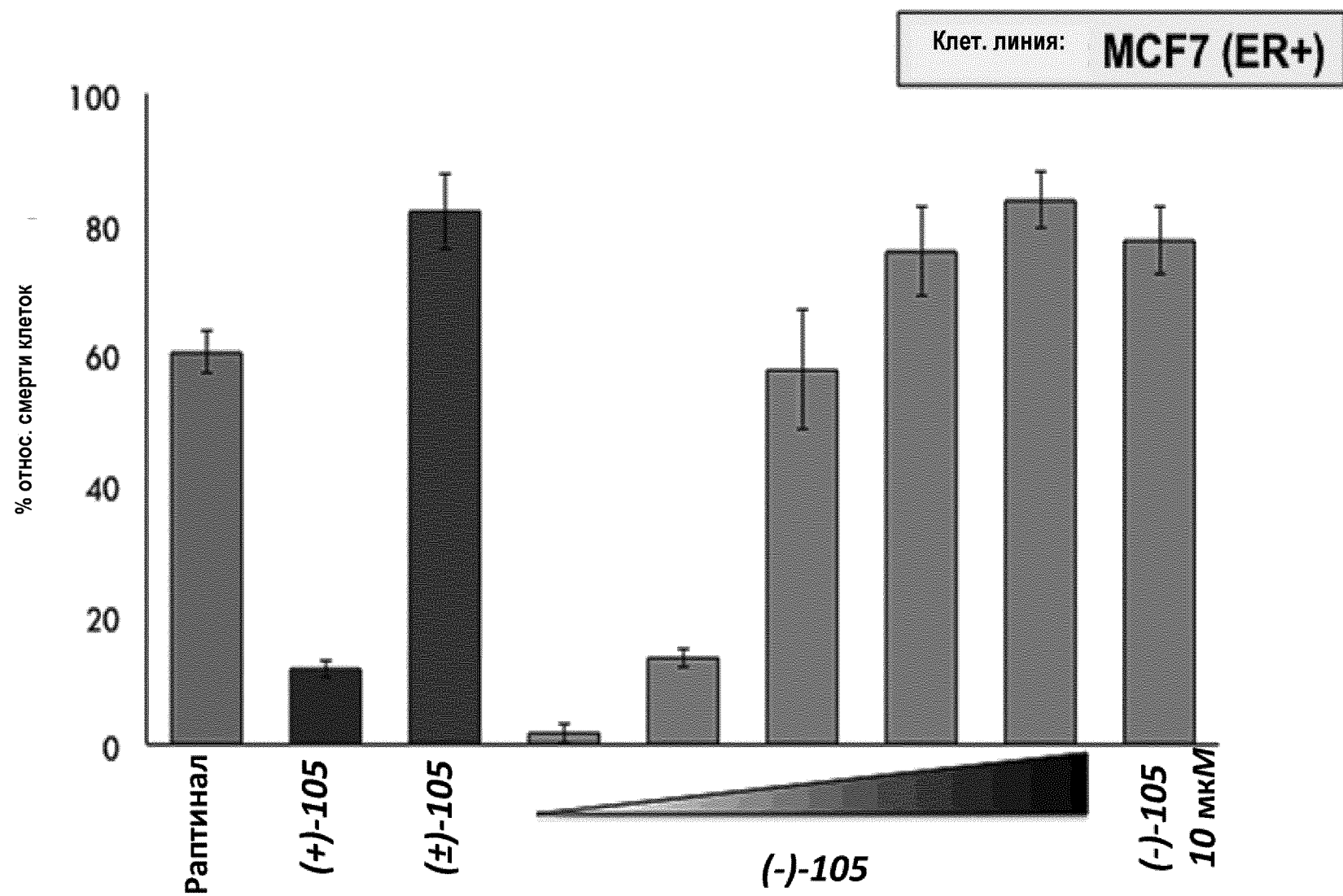
Фиг. 7



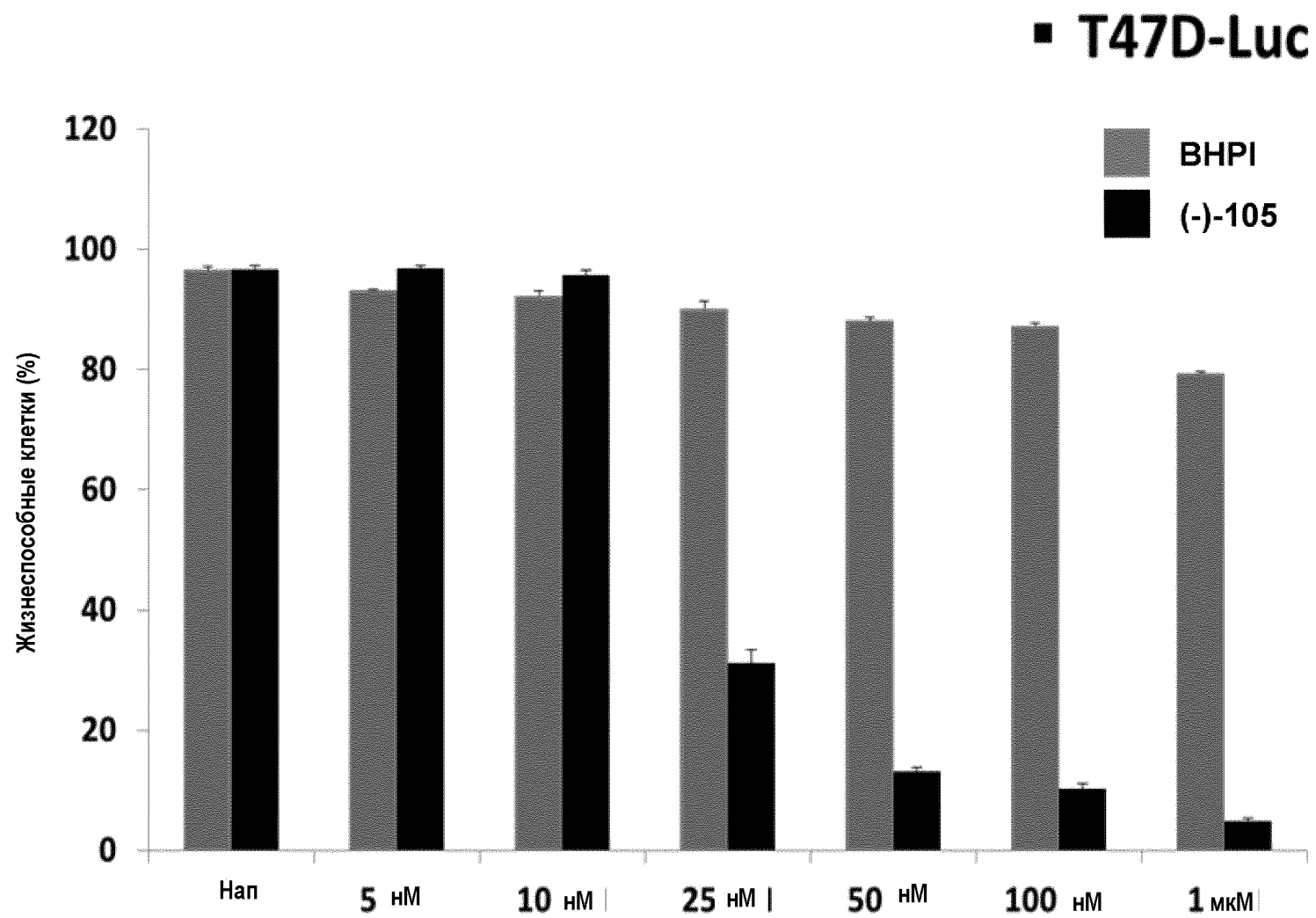
Фиг. 8



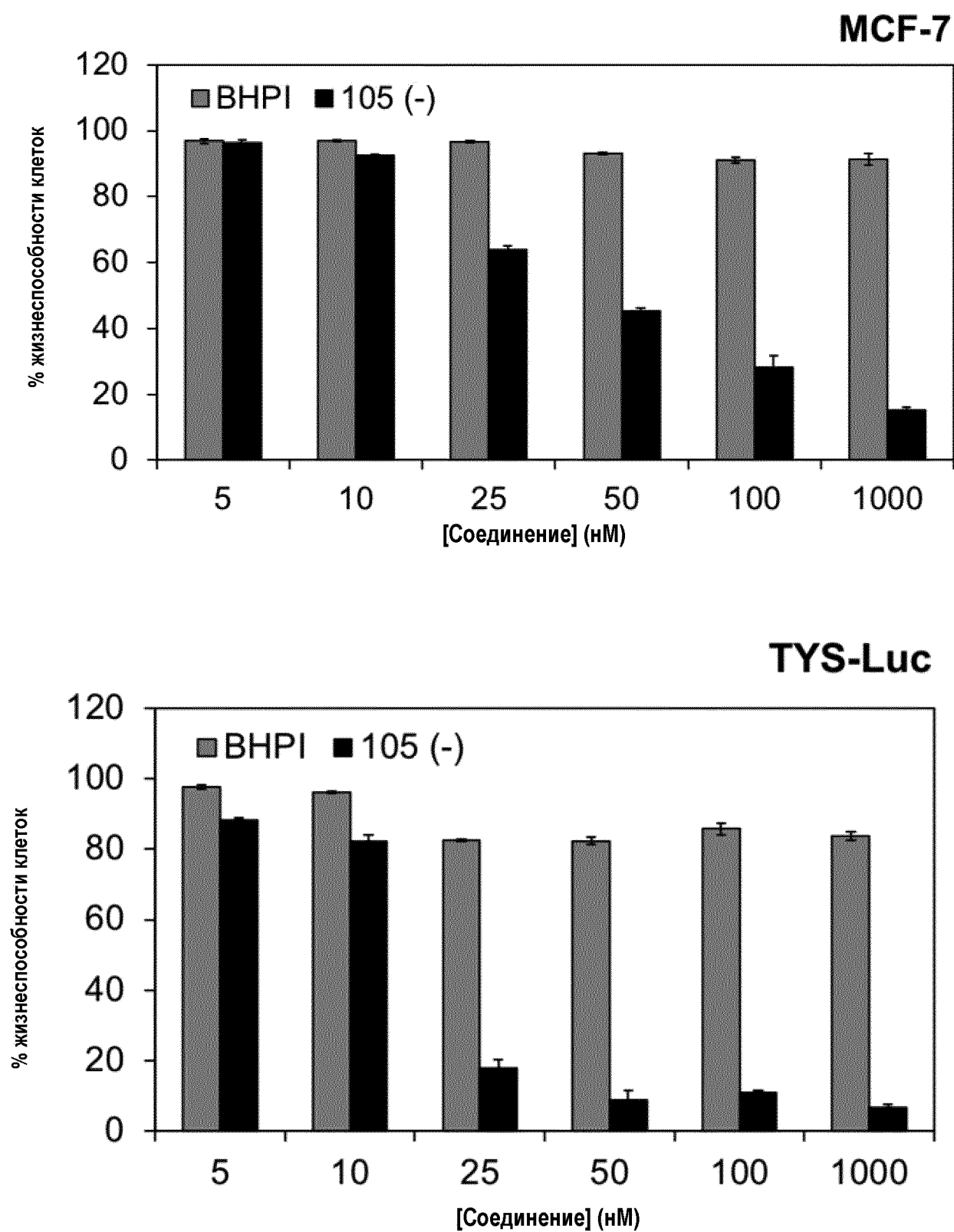
Фиг. 9



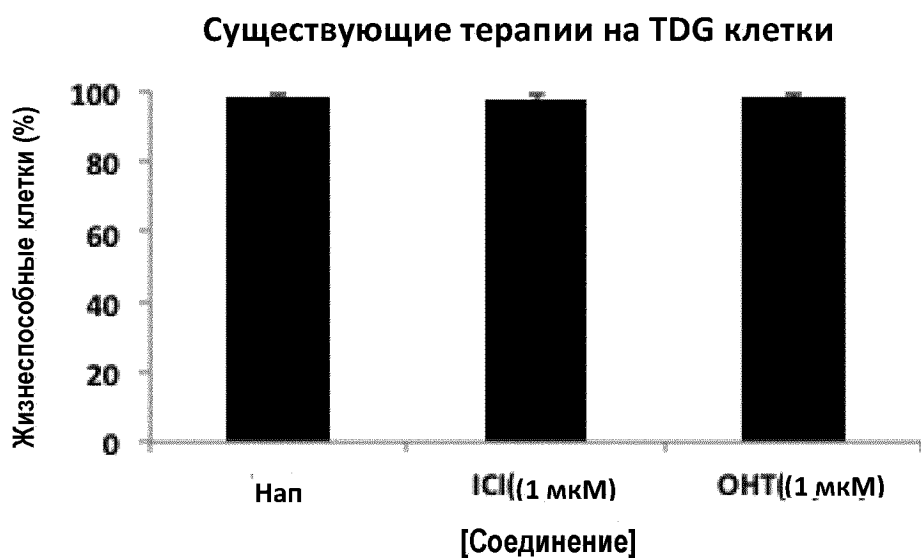
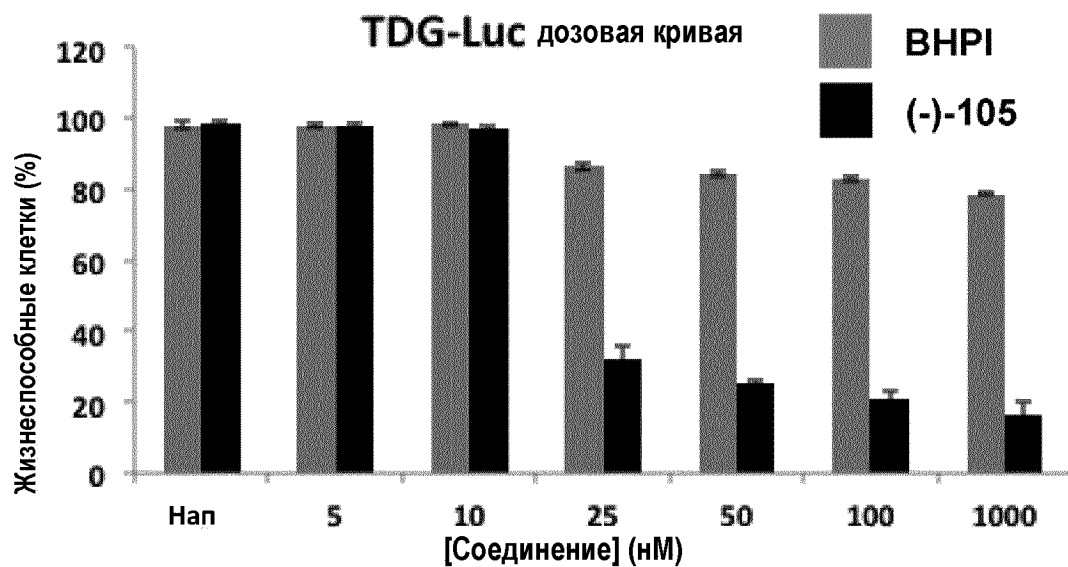
Фиг. 10



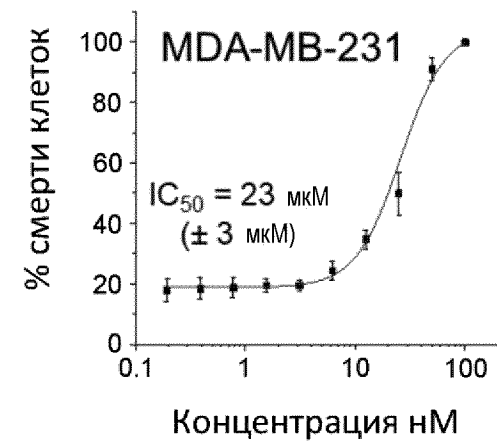
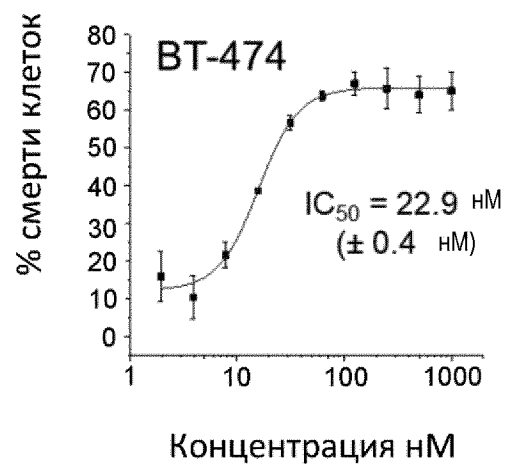
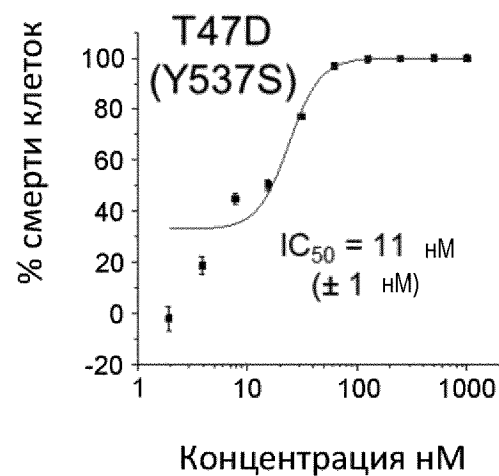
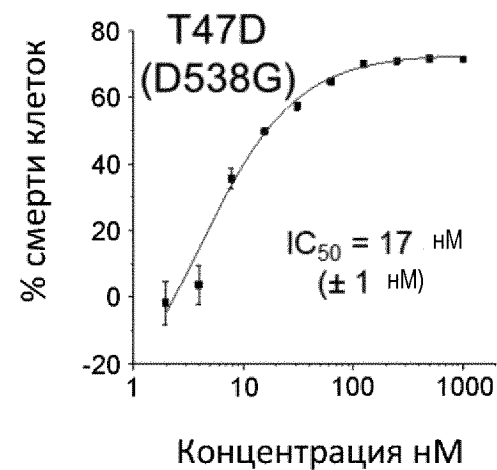
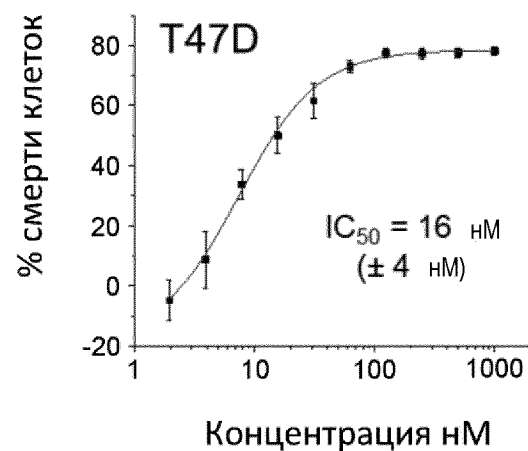
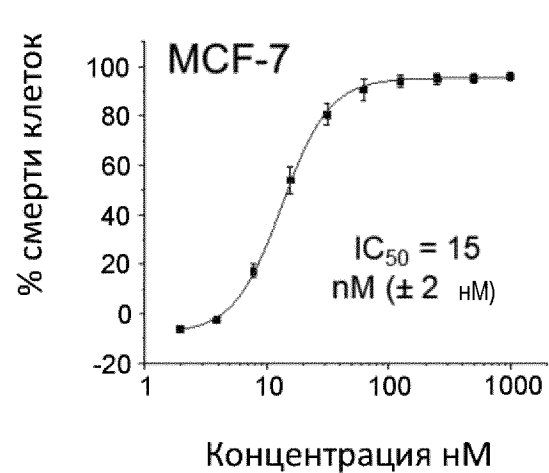
Фиг. 11



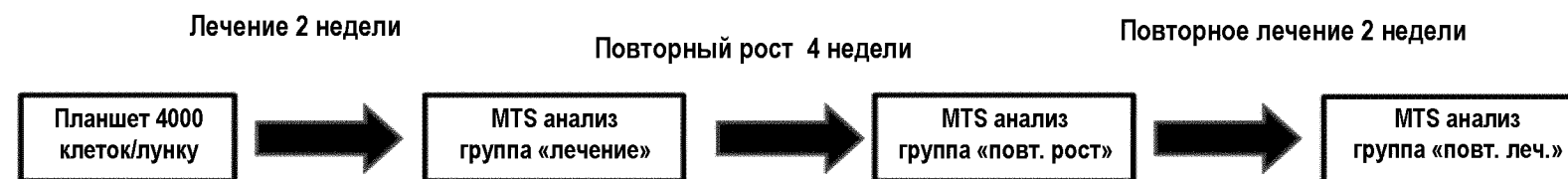
Фиг. 12



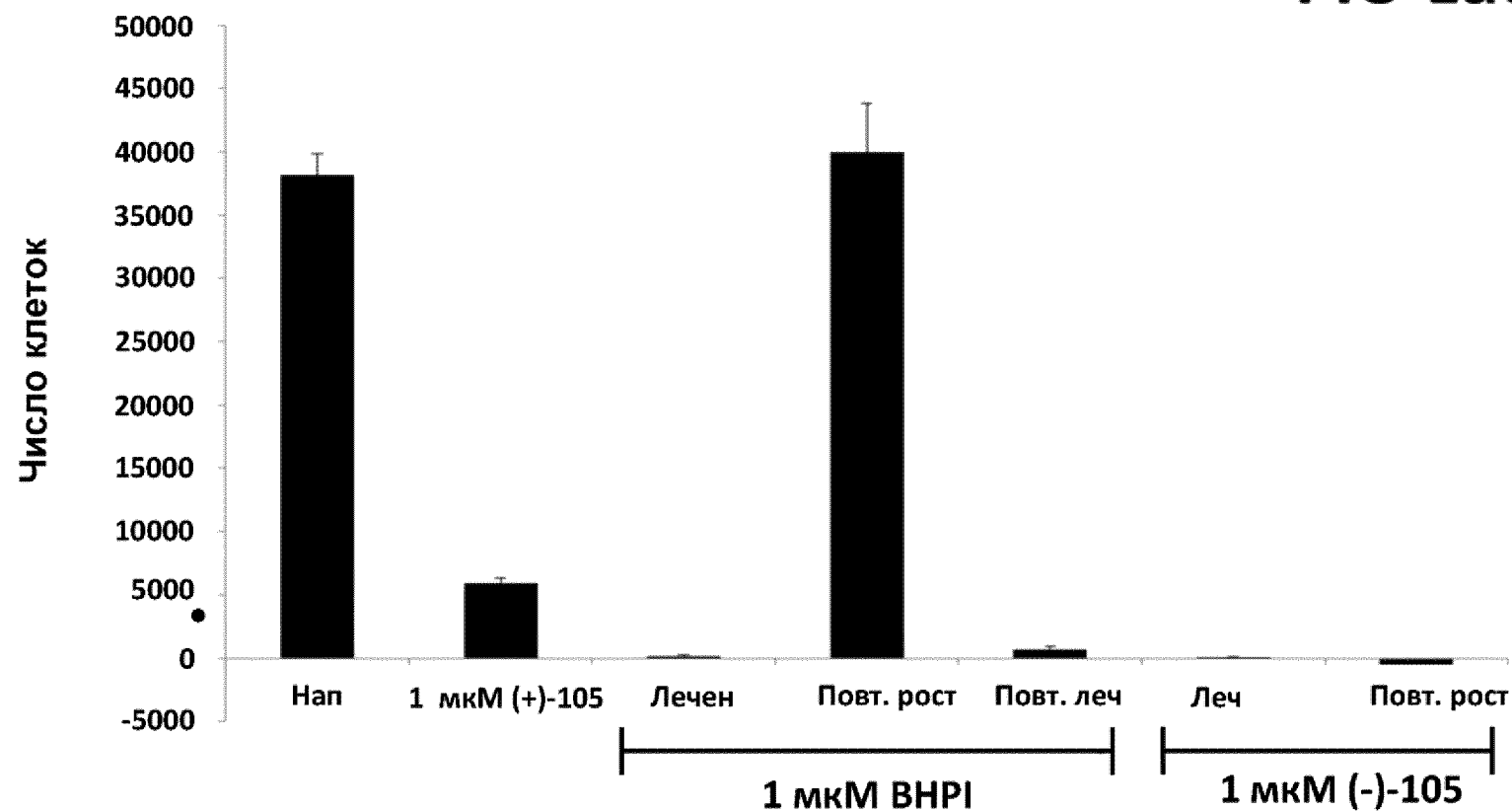
Фиг. 13



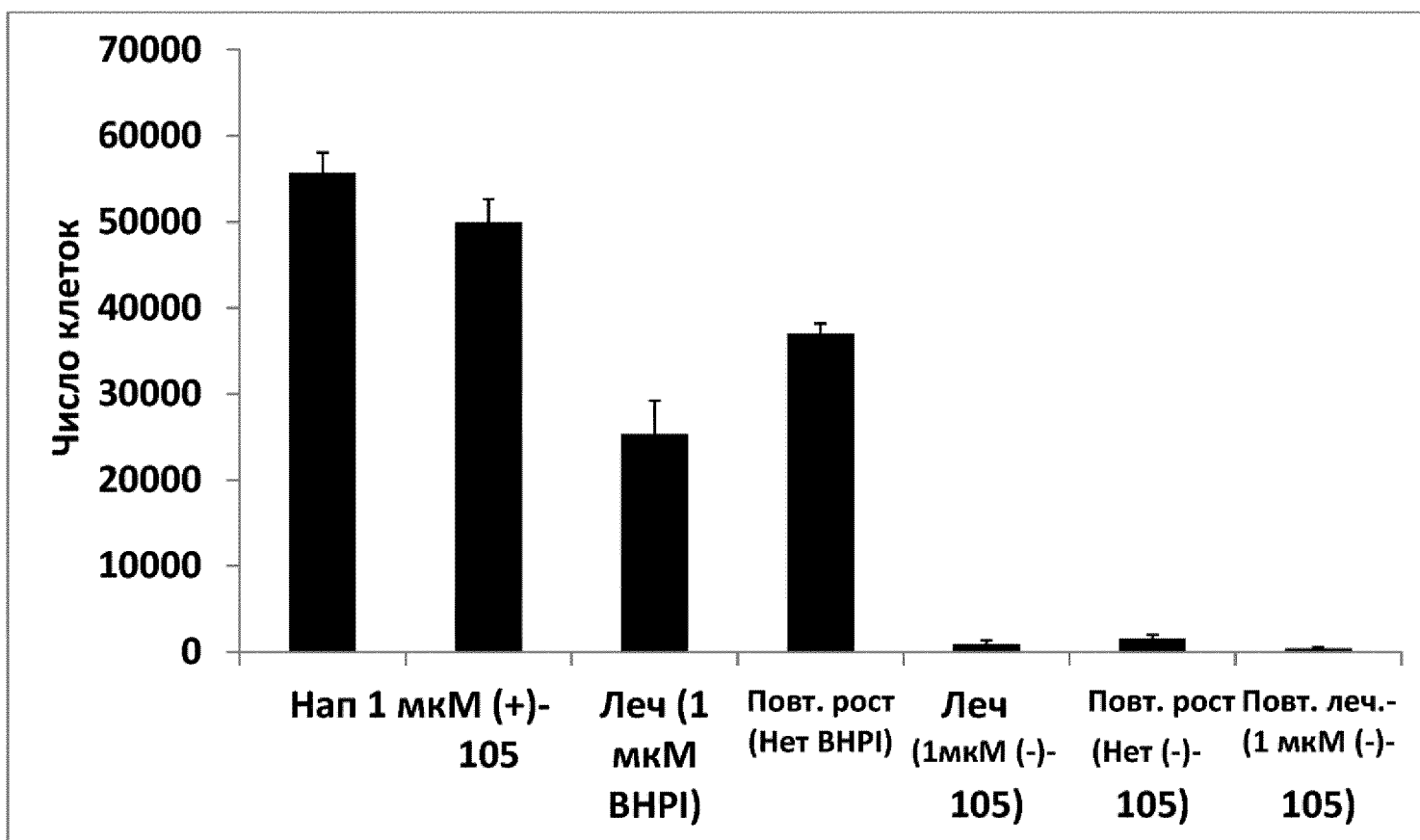
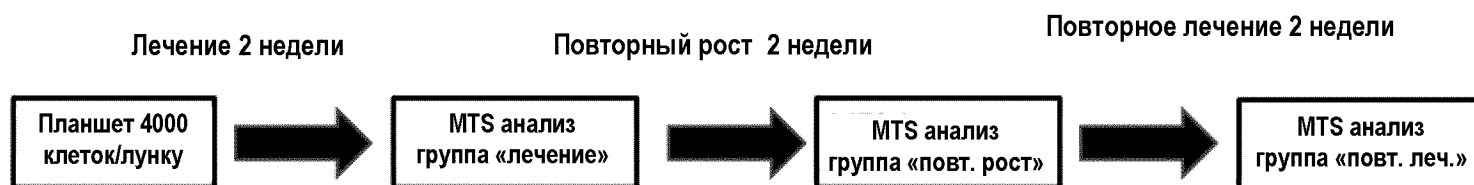
Фиг. 14



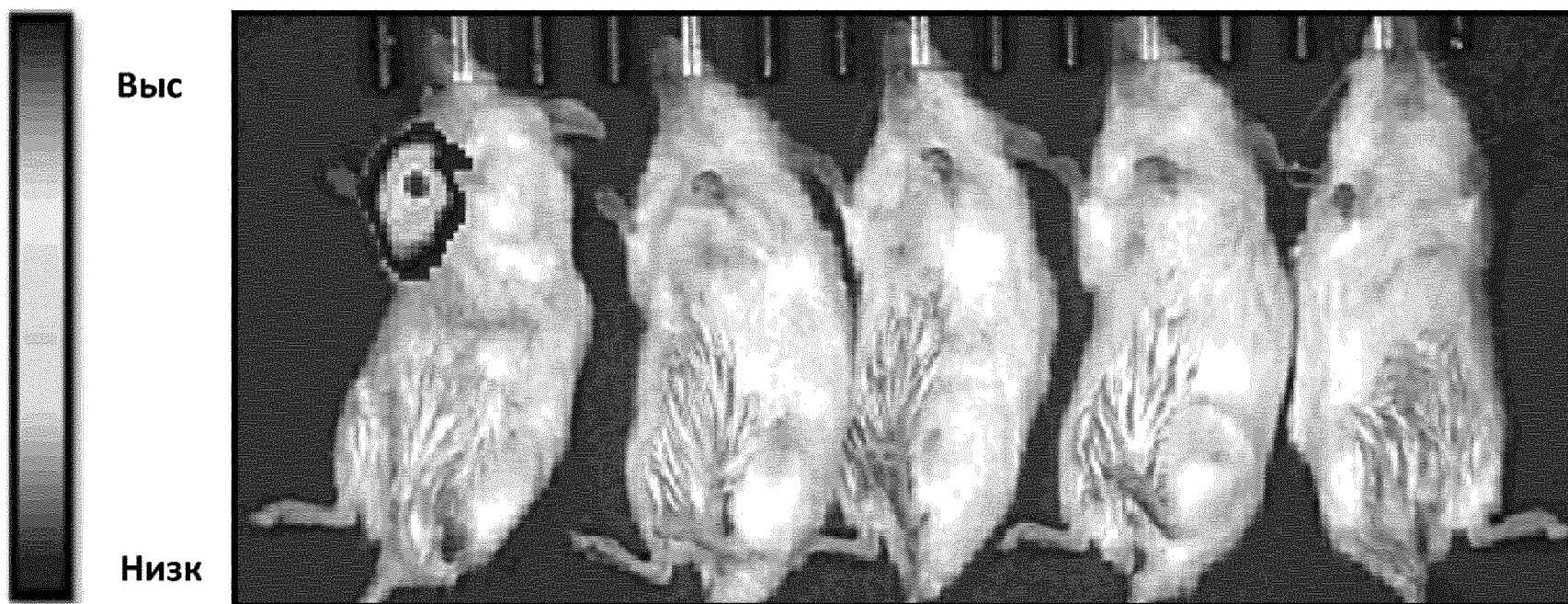
■ TYS-Luc



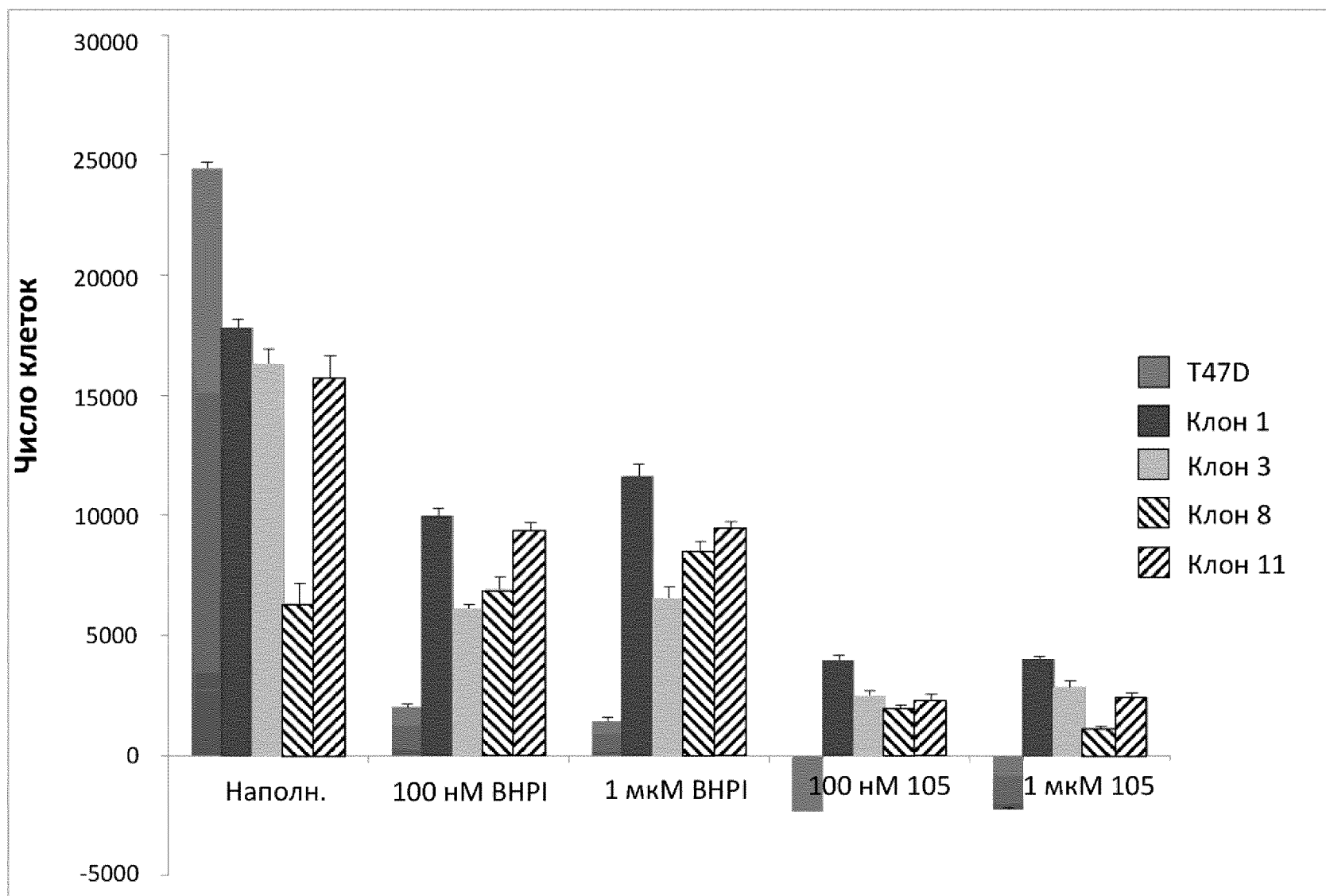
Фиг. 15



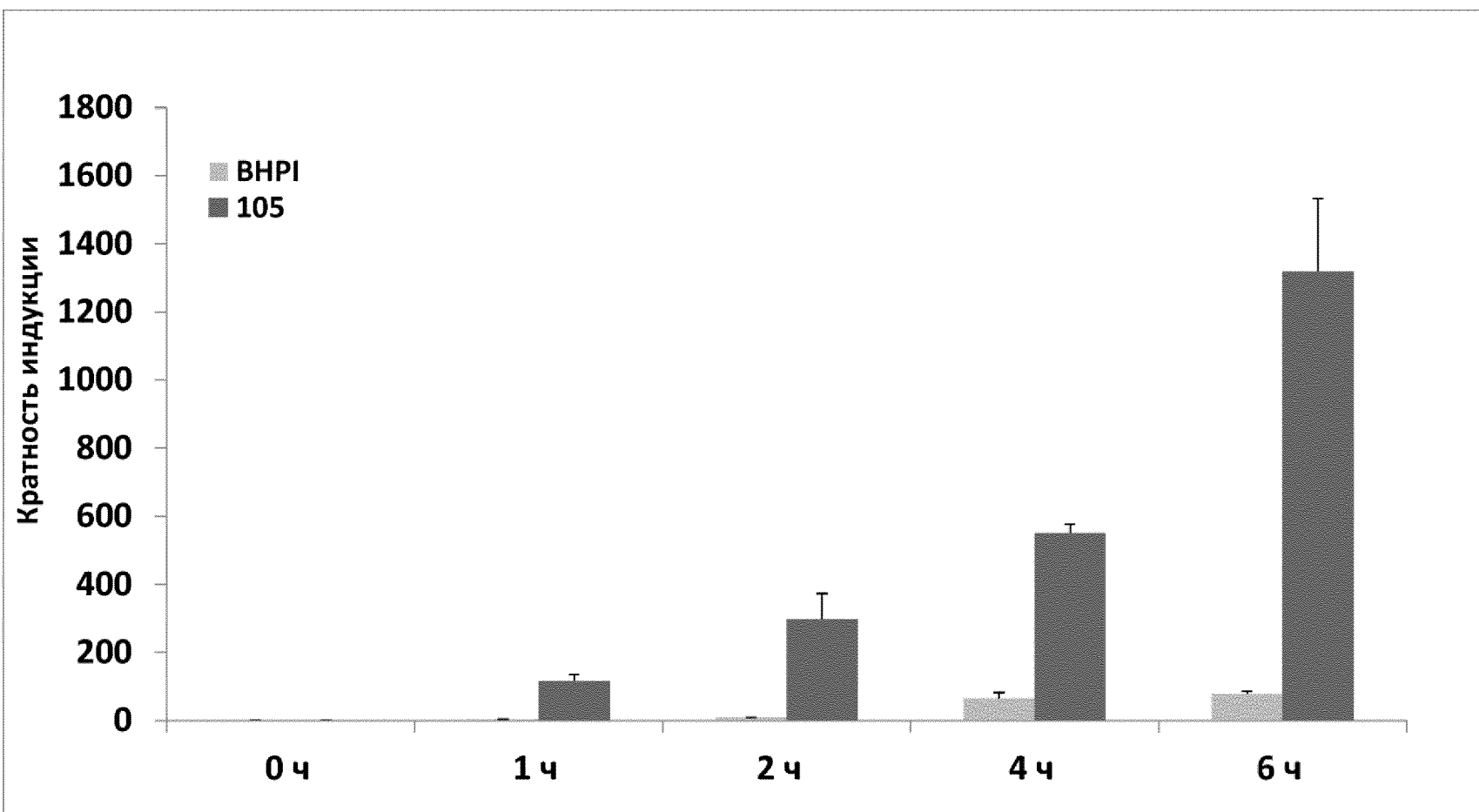
Фиг. 16



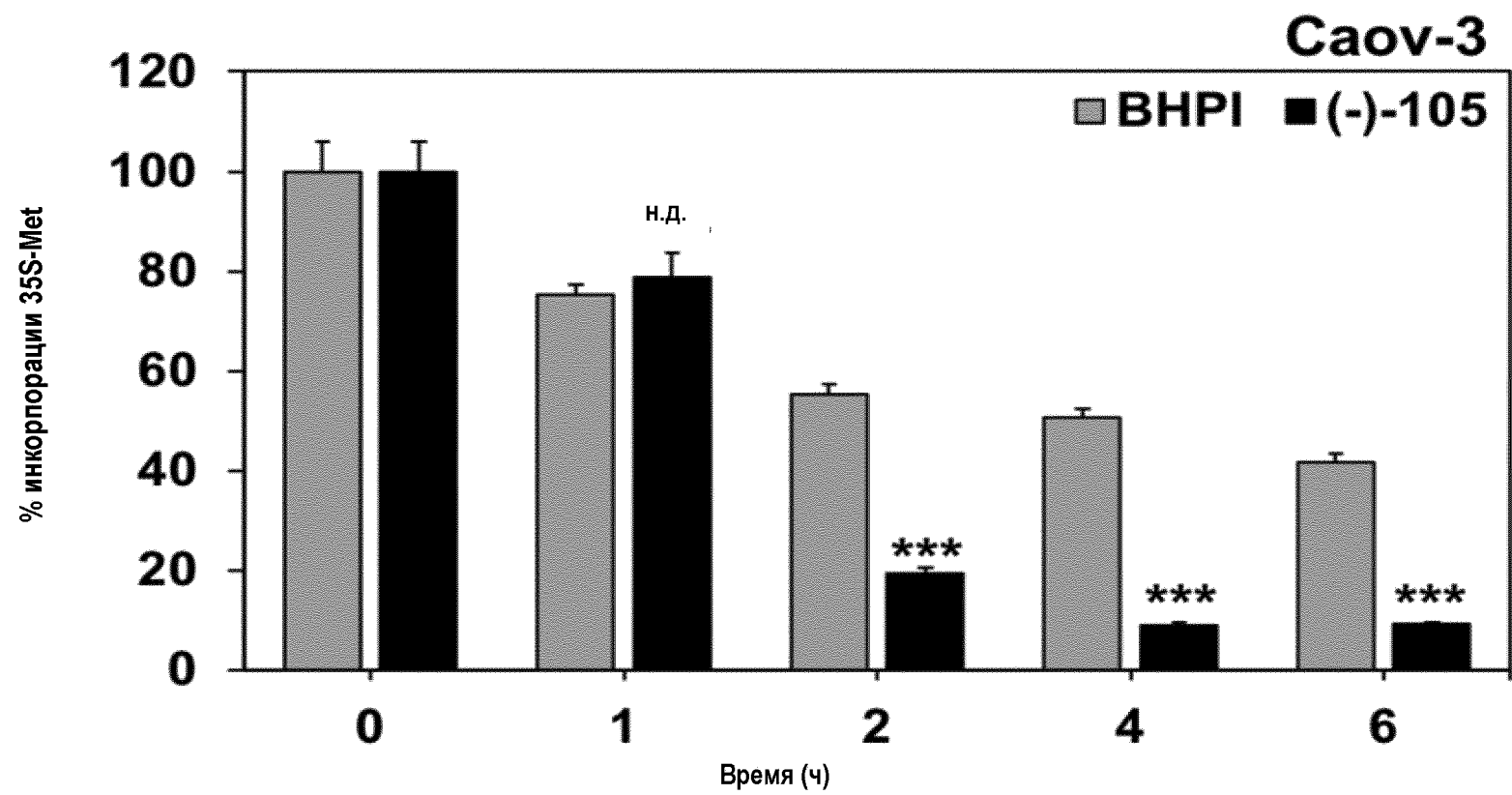
Фиг. 17



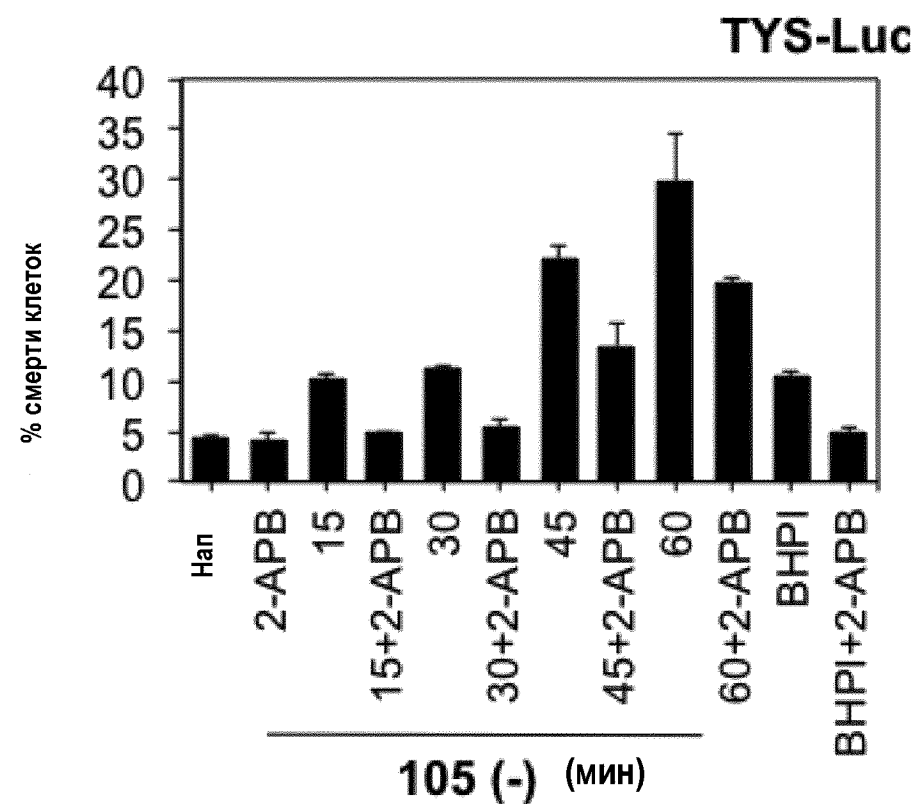
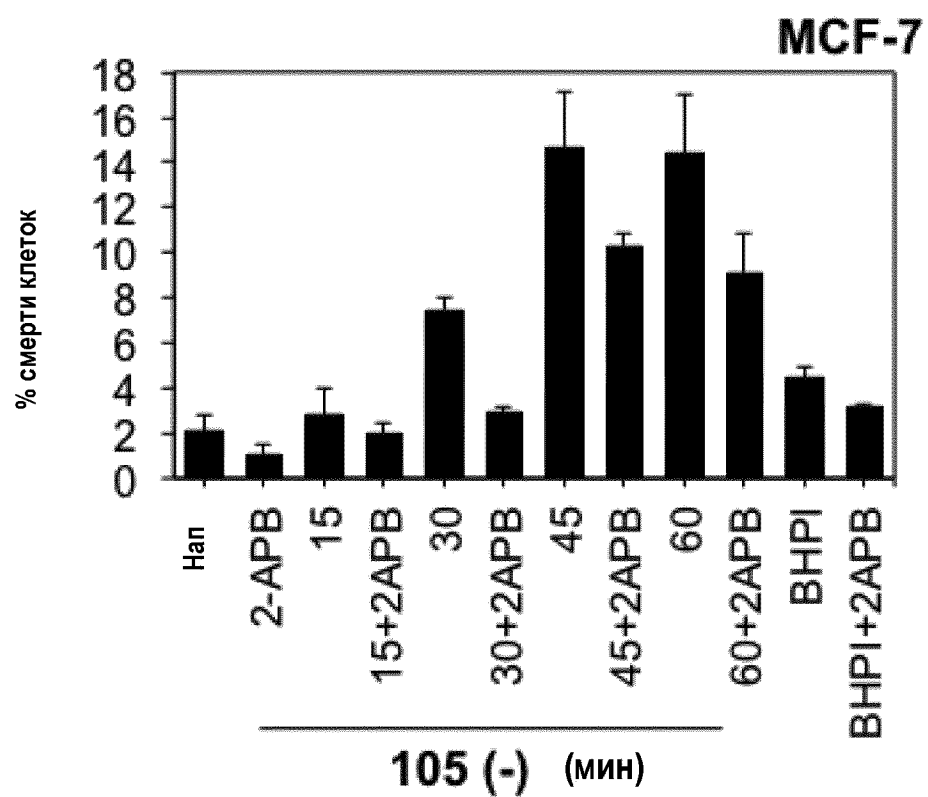
Фиг. 18



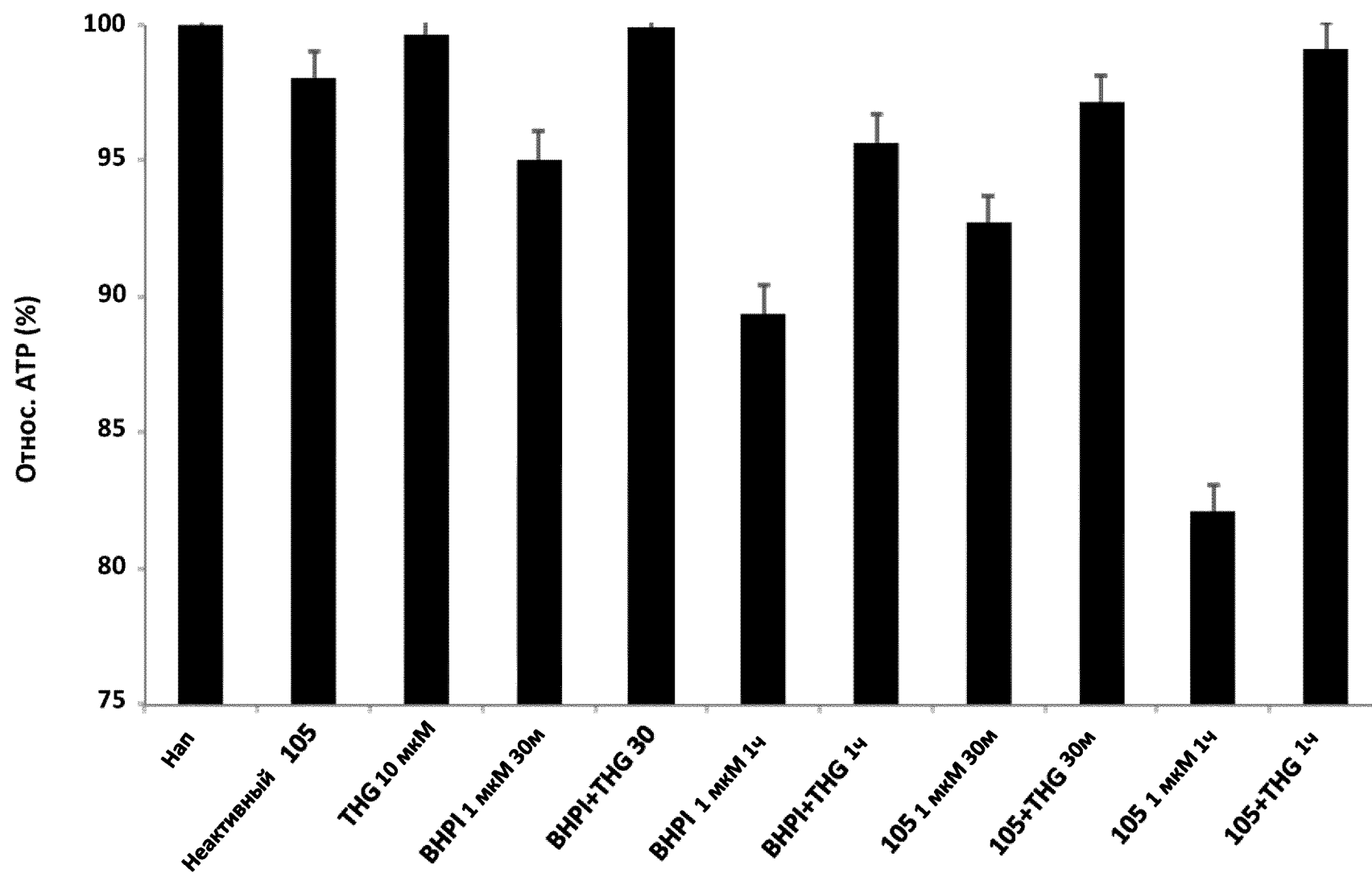
Фиг. 19



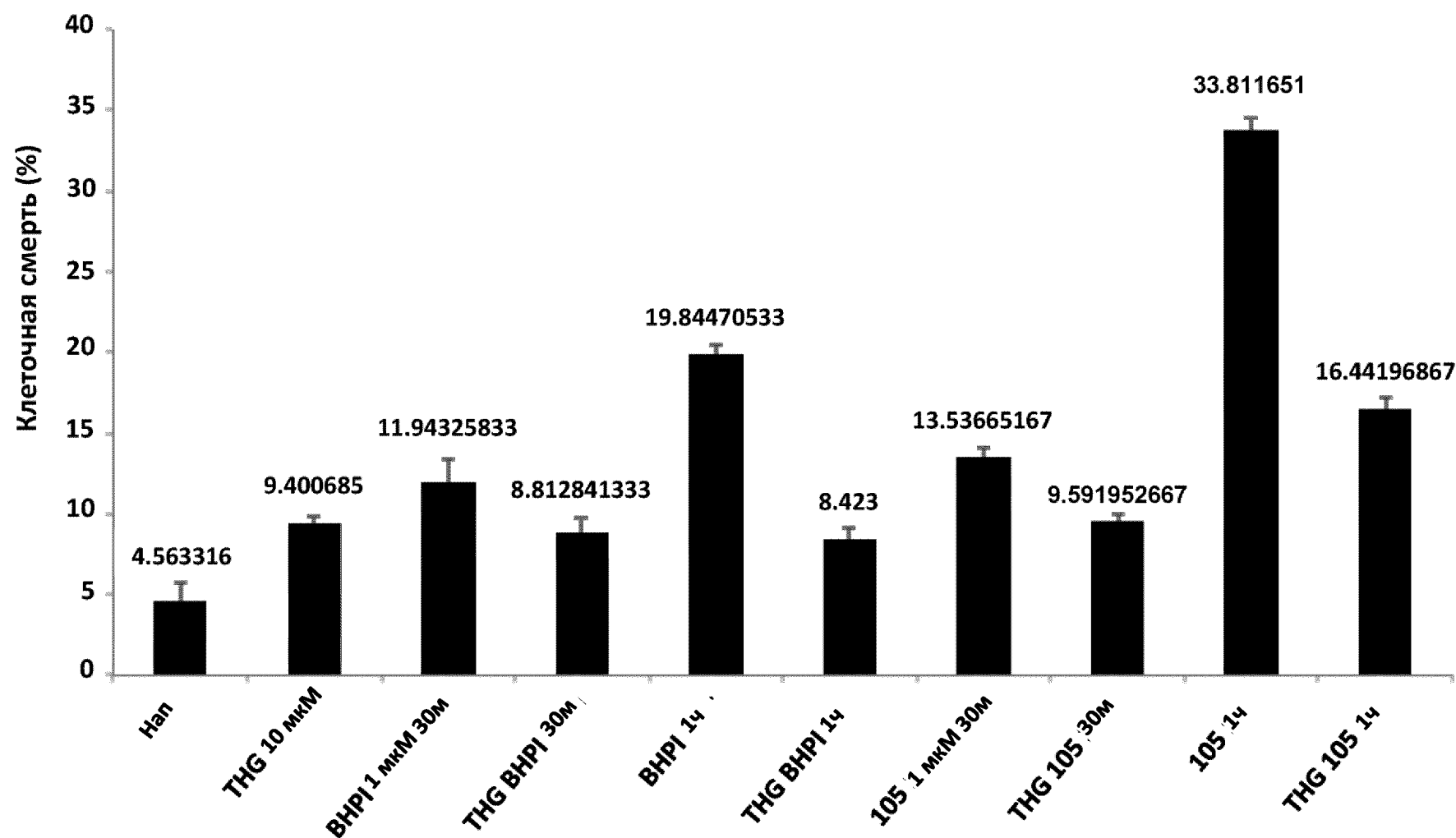
Фиг. 20



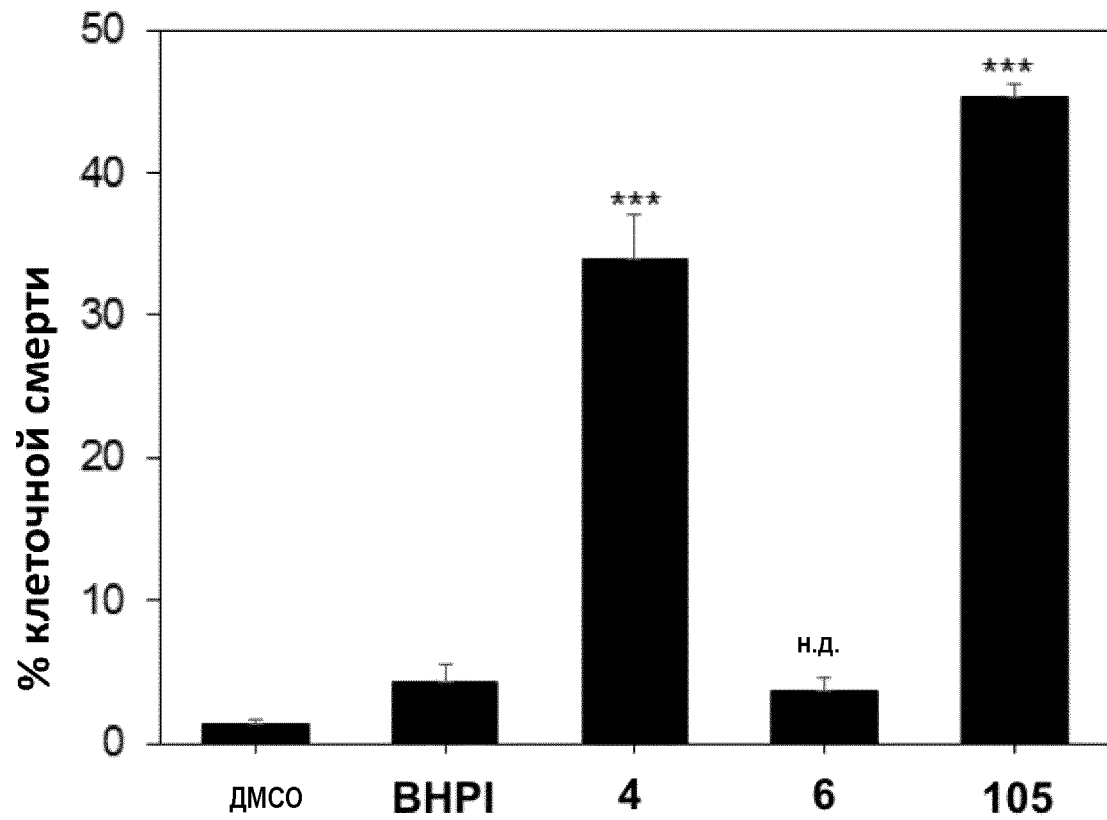
Фиг. 21



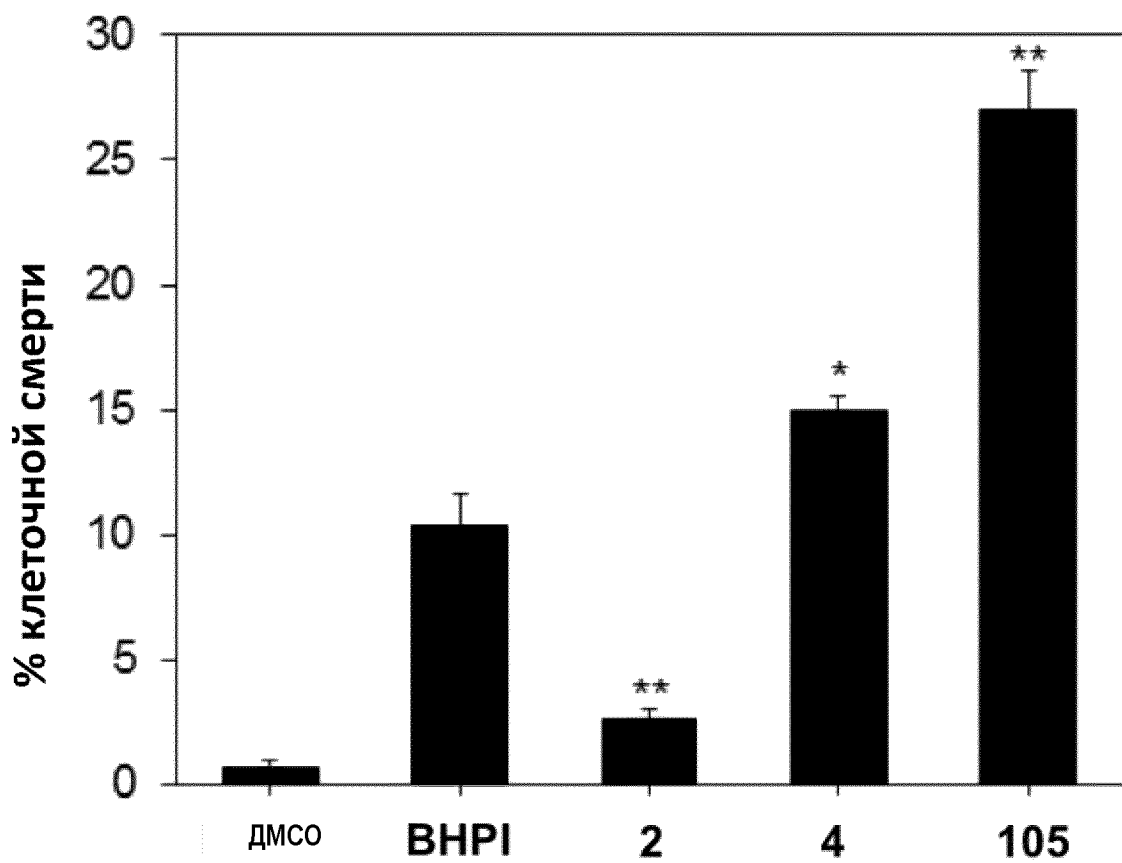
Фиг. 22



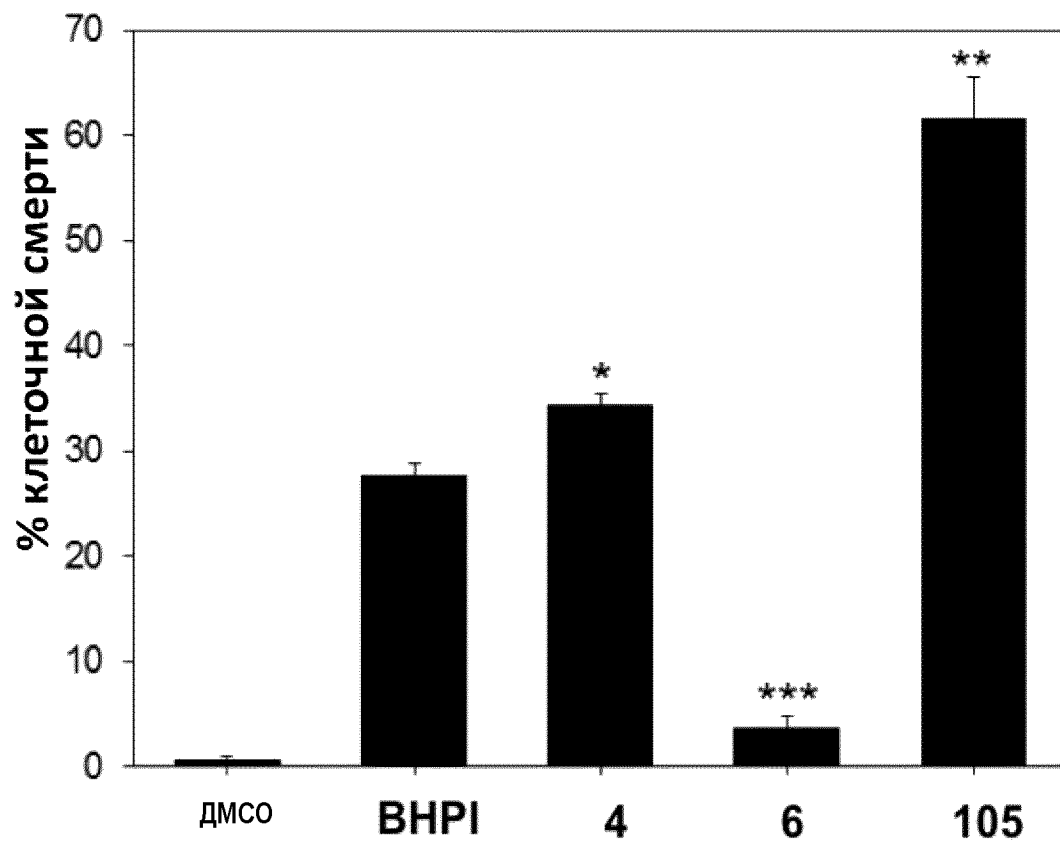
Фиг. 23



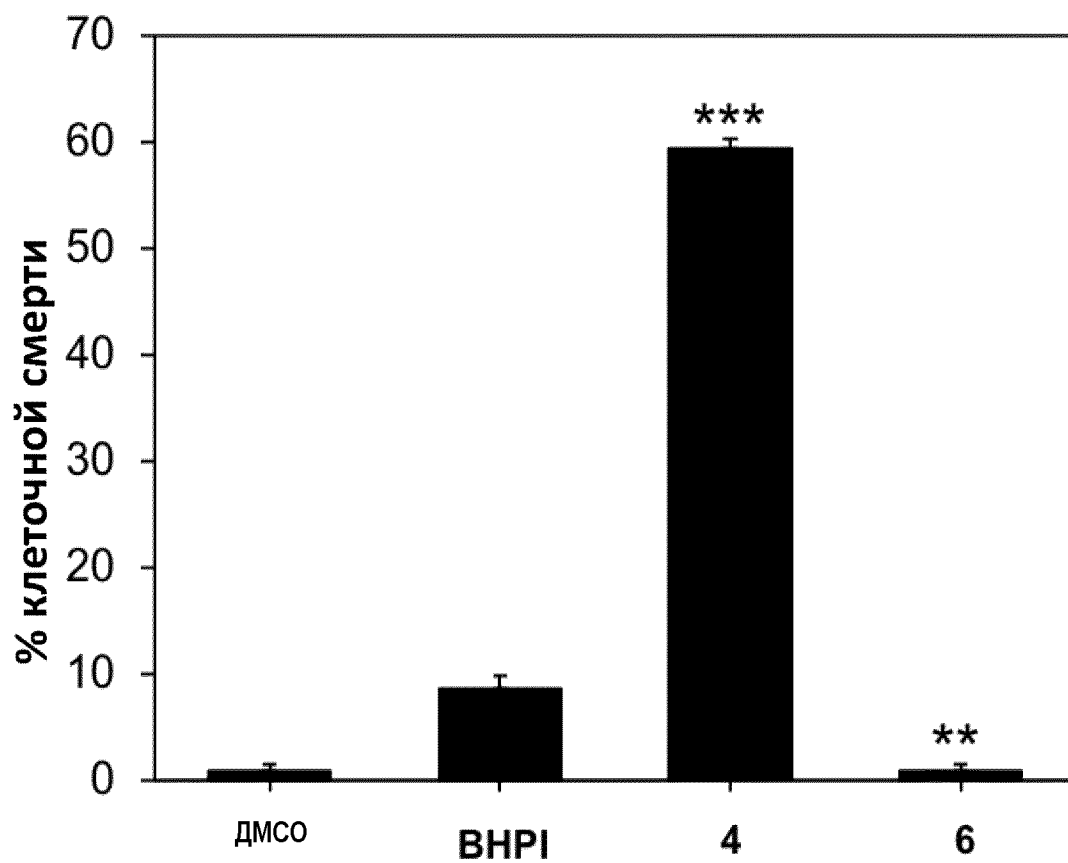
Фиг. 24



Фиг. 25

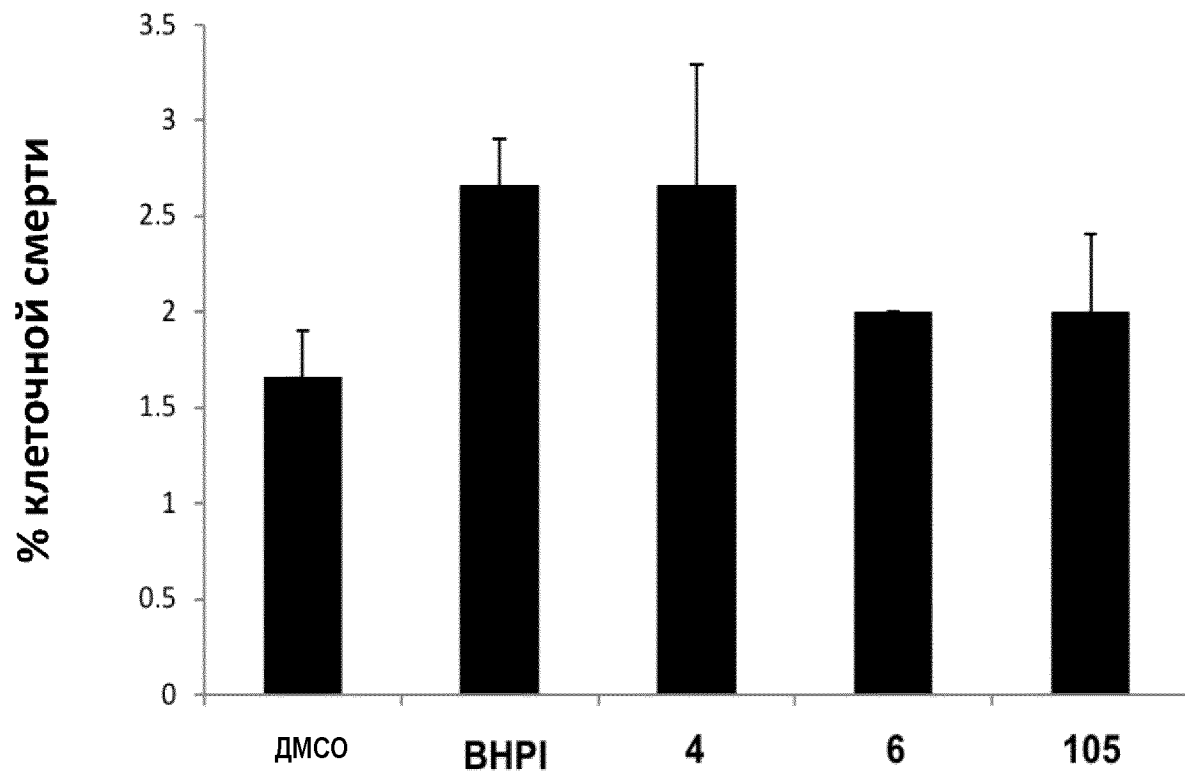


Фиг. 26

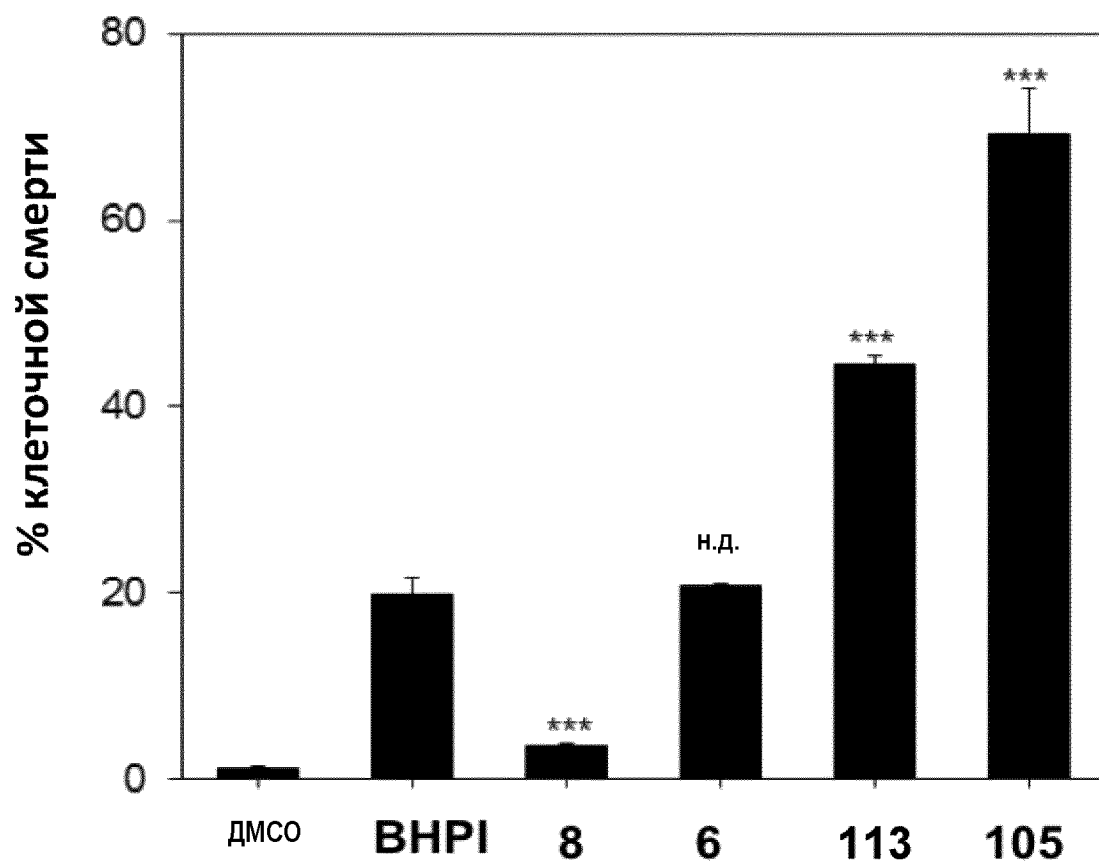


Фиг. 27

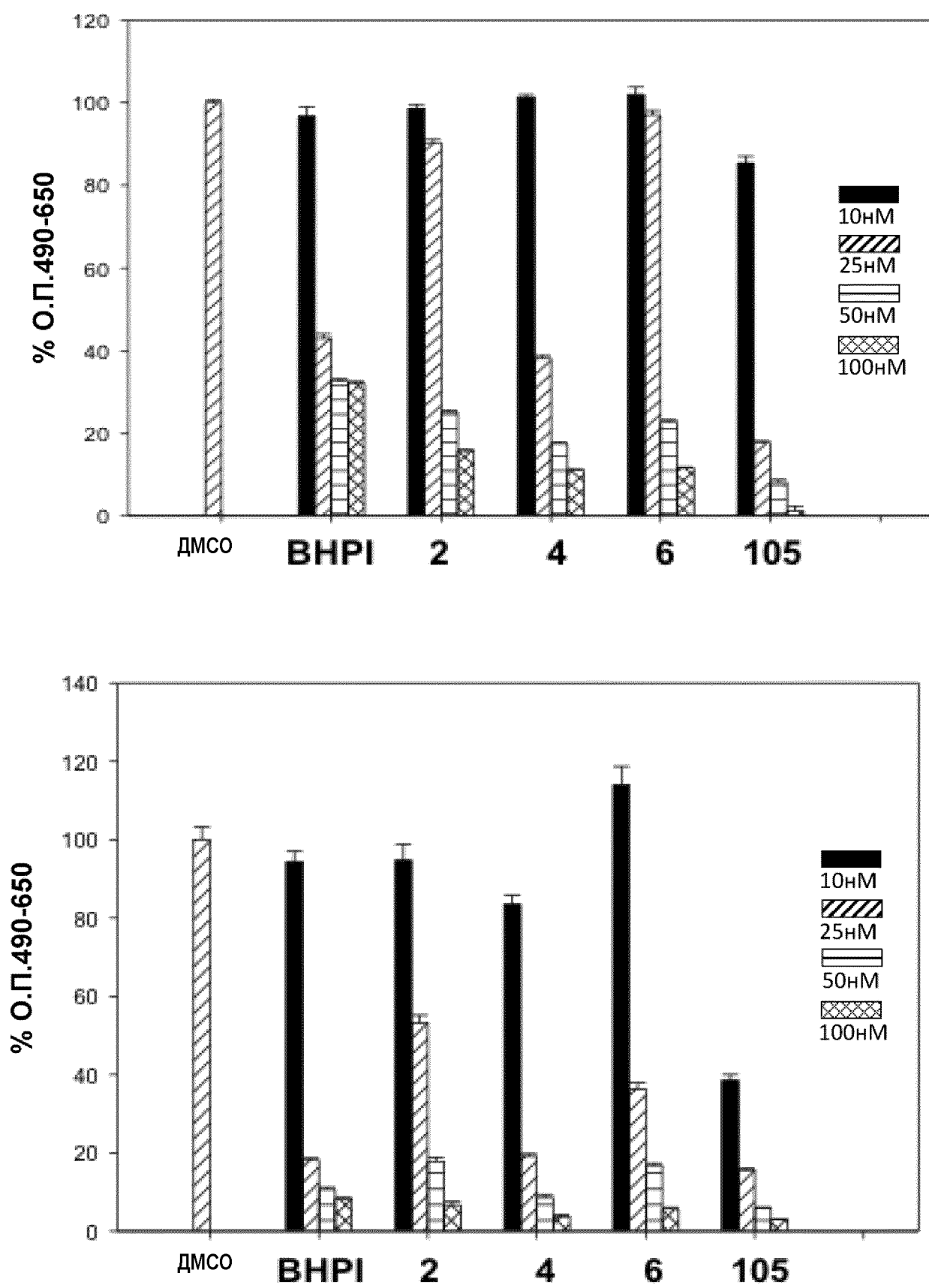
25/50



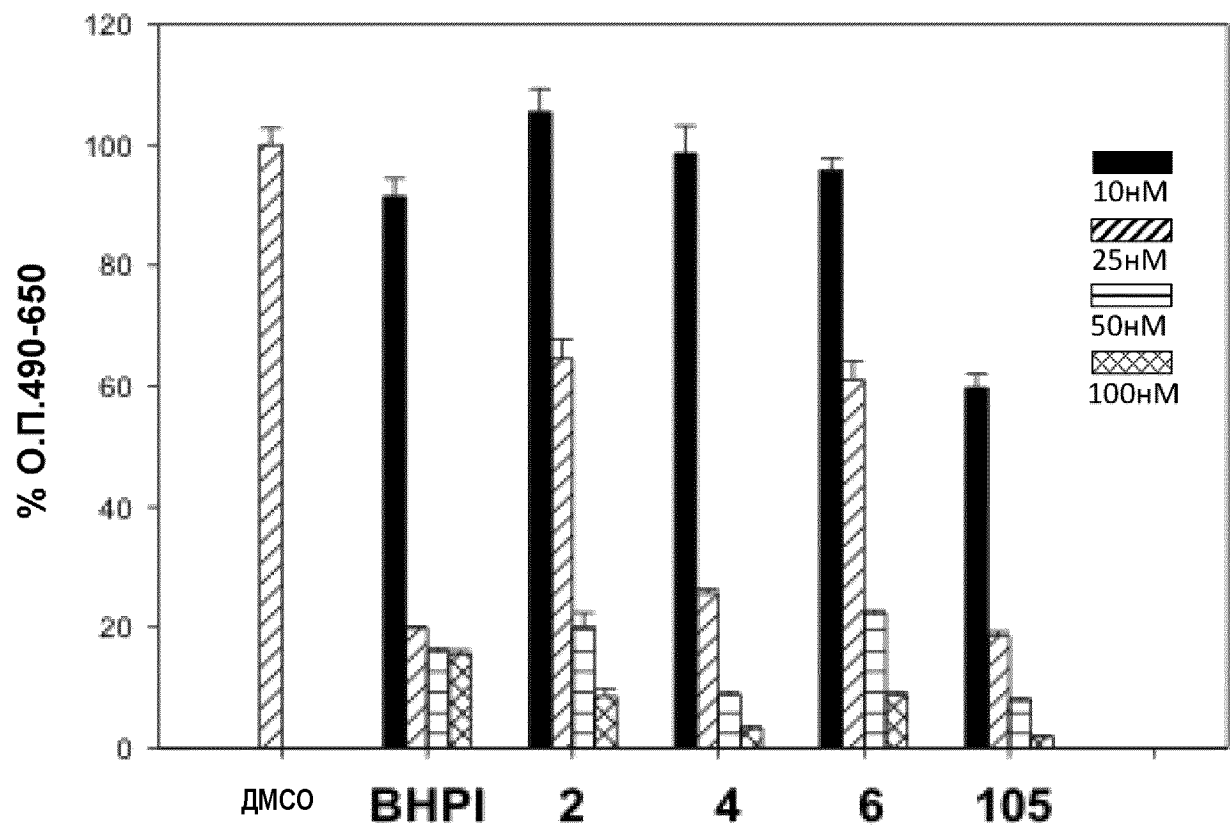
Фиг. 28

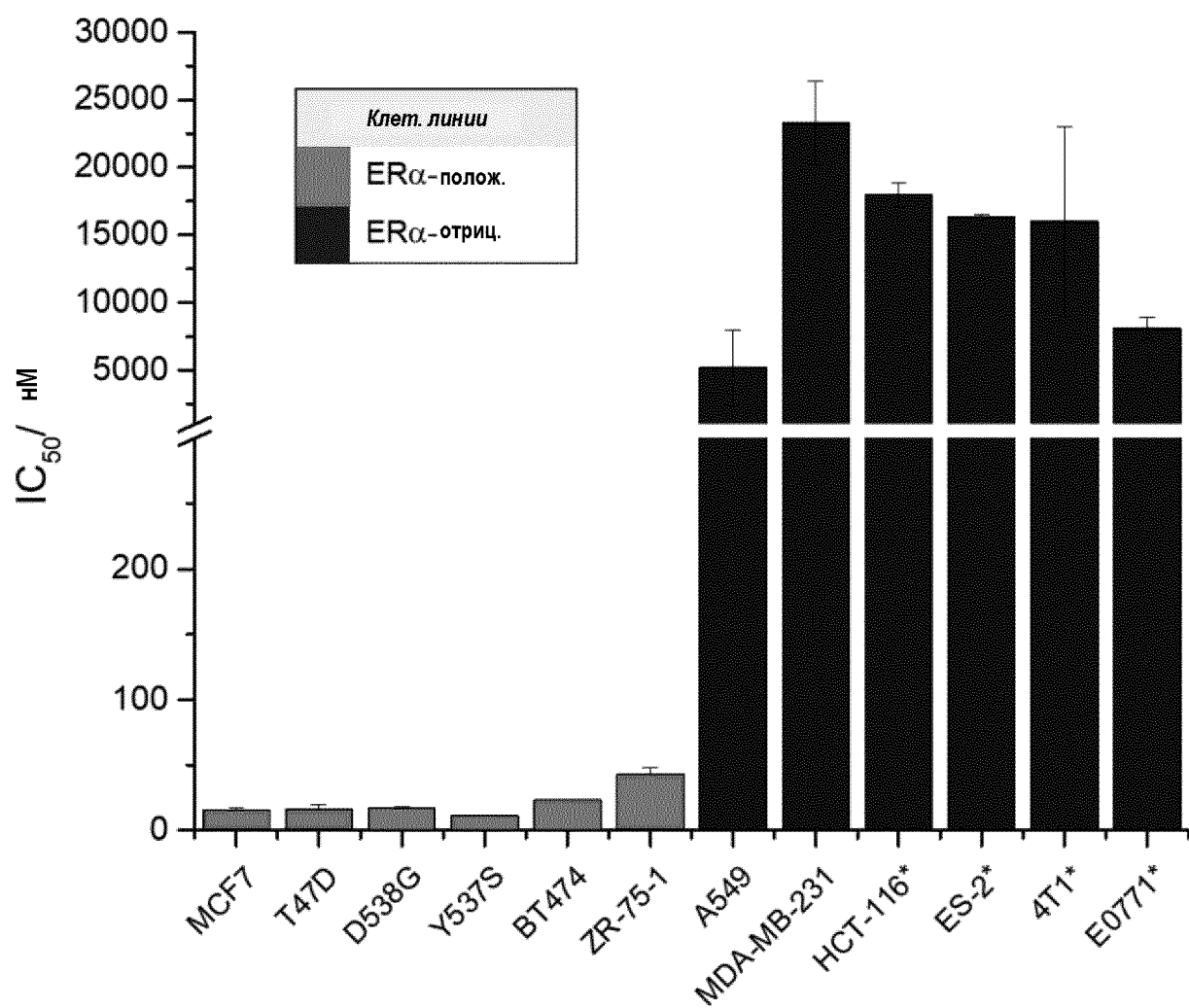


Фиг. 29

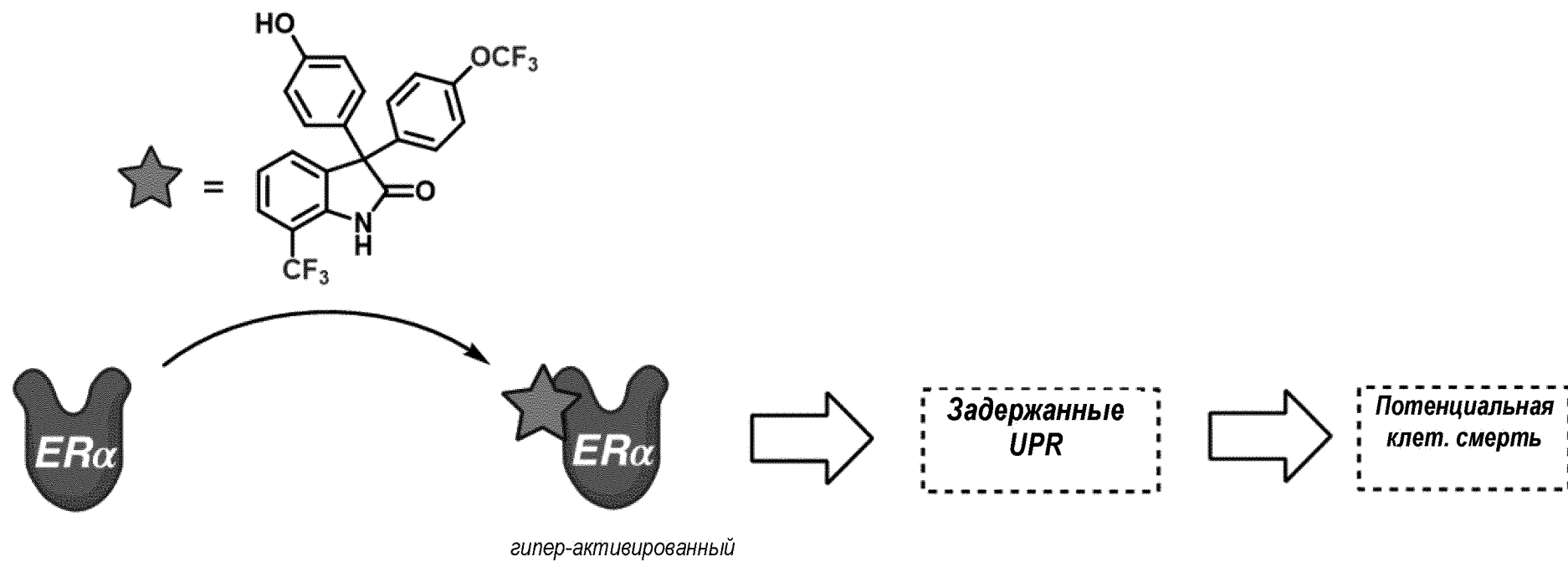


Фиг. 30

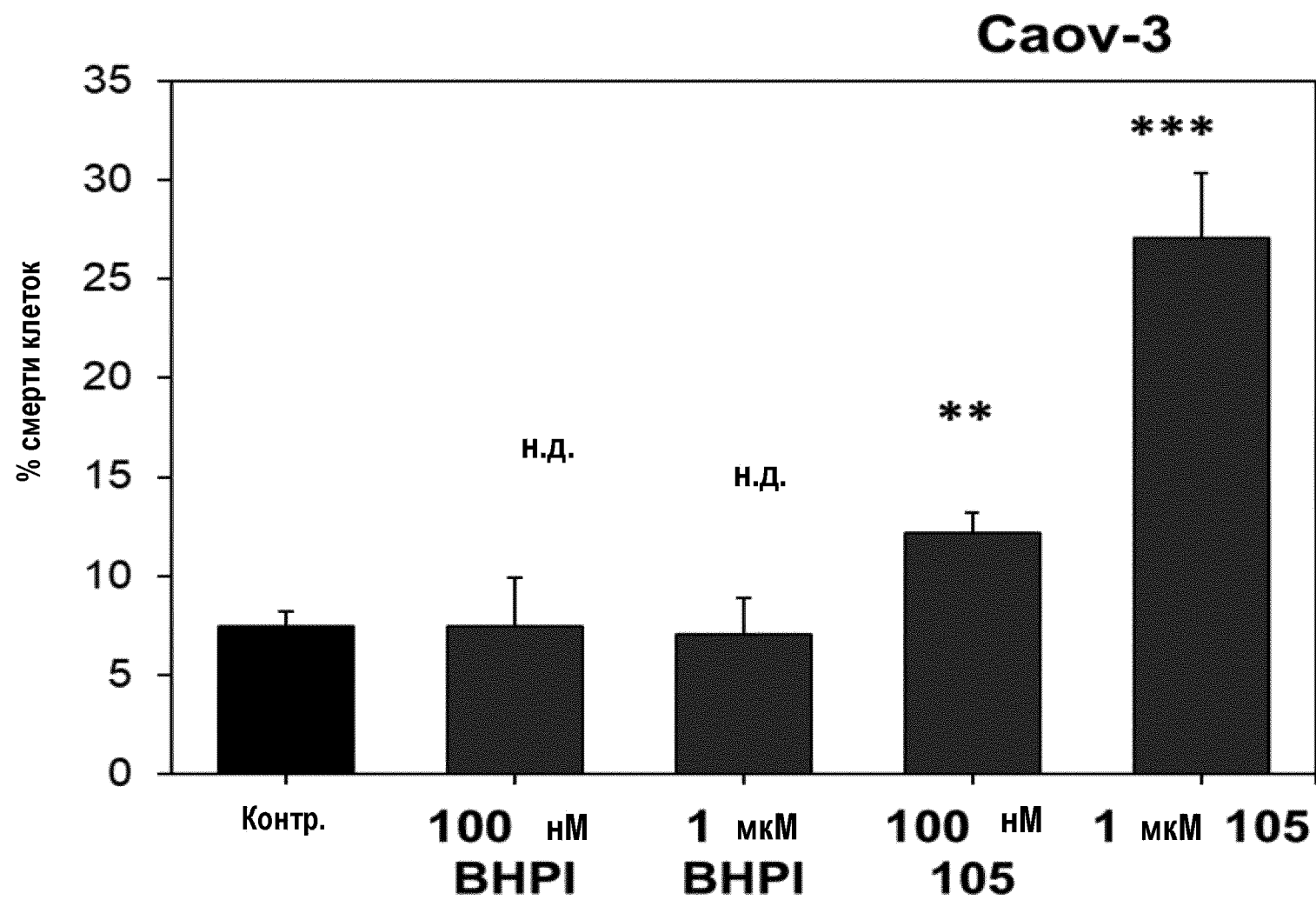
*Фиг. 30 (прод.)*



Фиг. 31

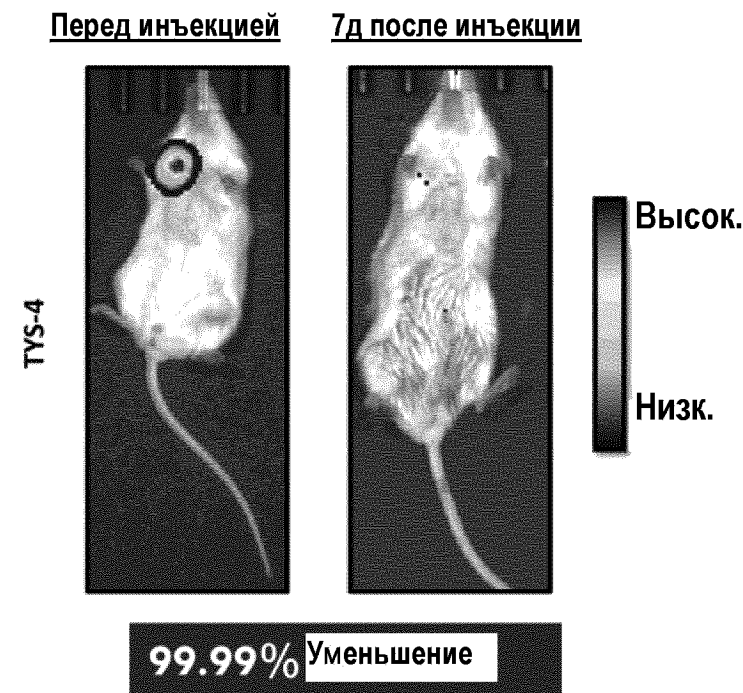
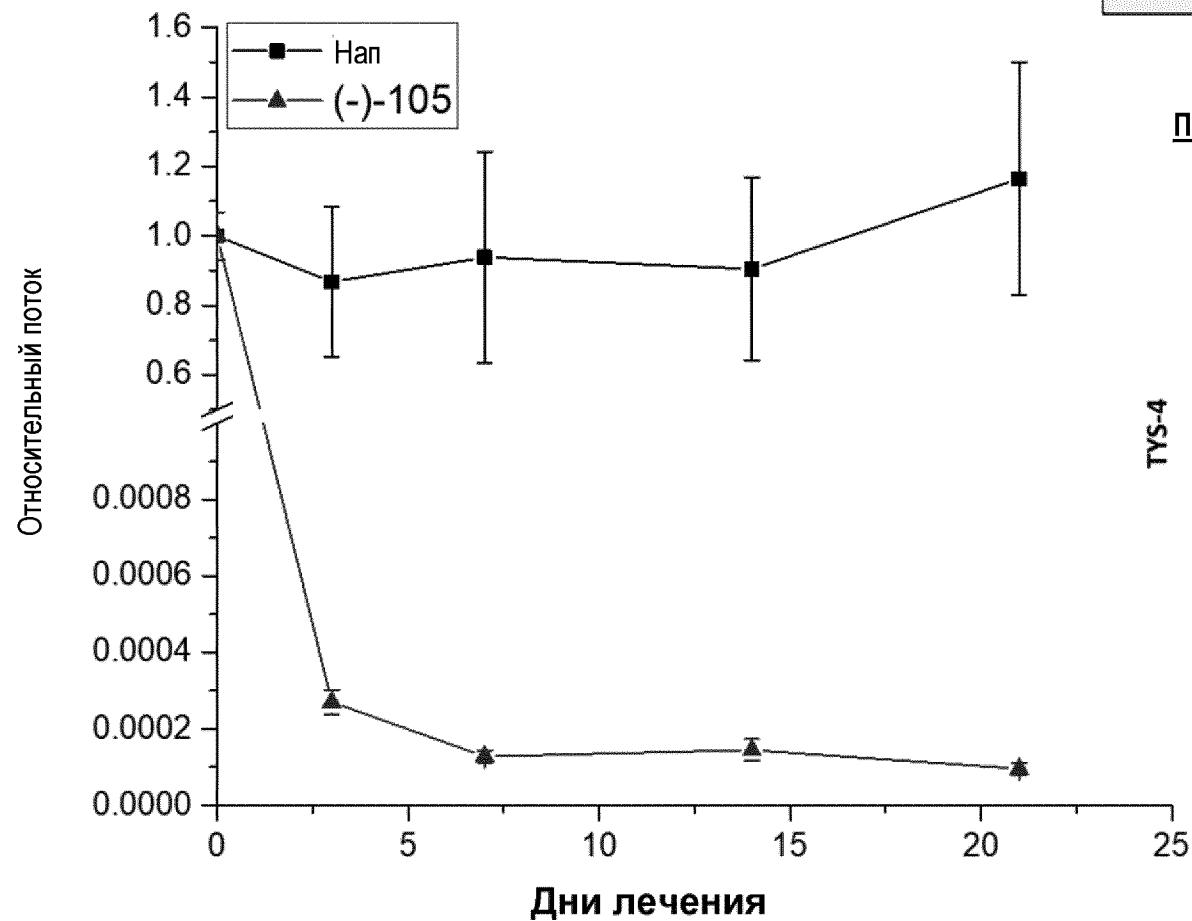


Фиг. 32

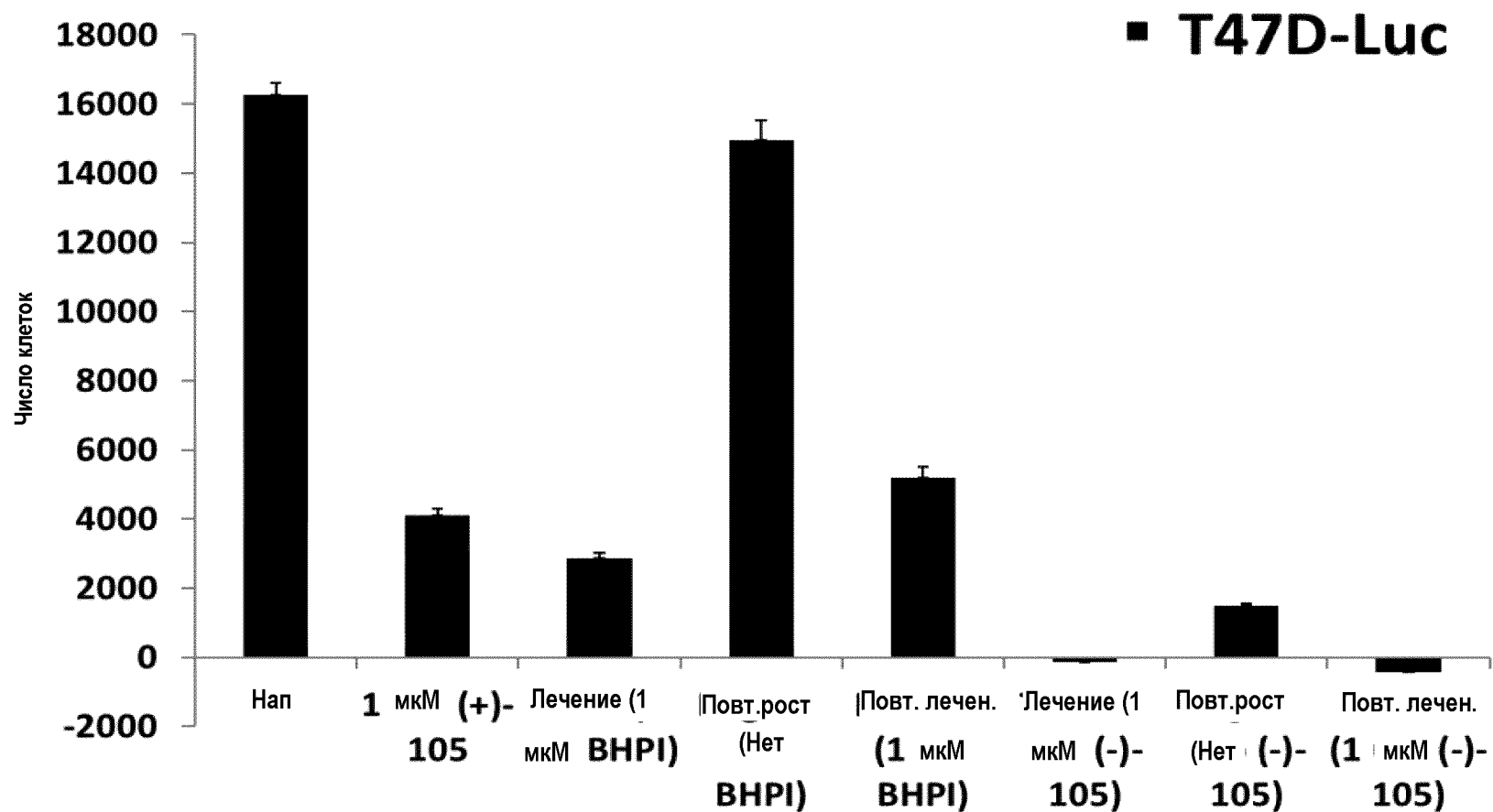
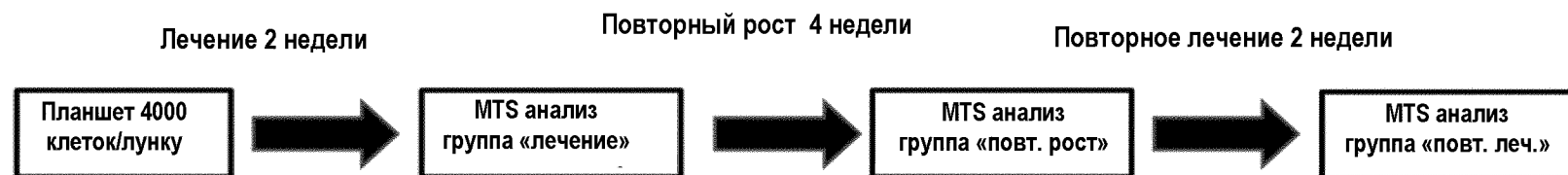


Фиг. 33

Клет. линия: **T47D Y537S Luc.**
 Резист. к лекарств. рак молочной железы

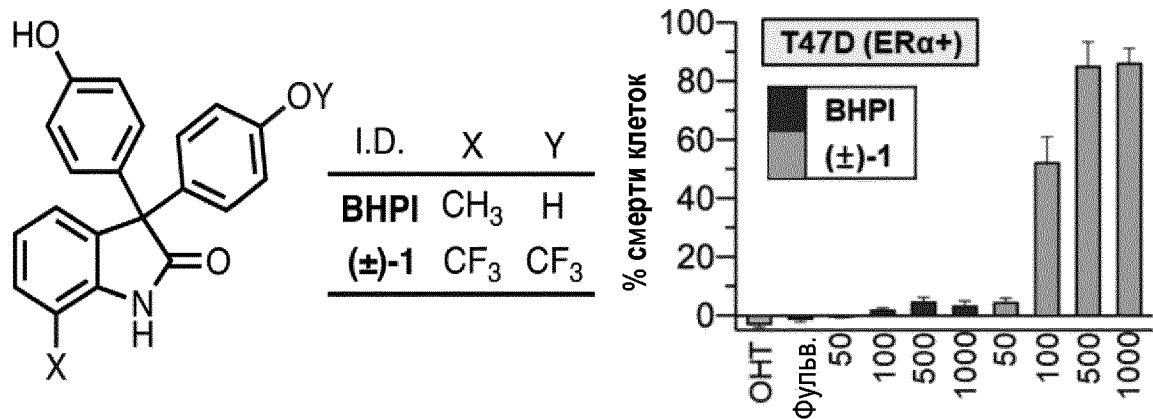


Фиг. 34

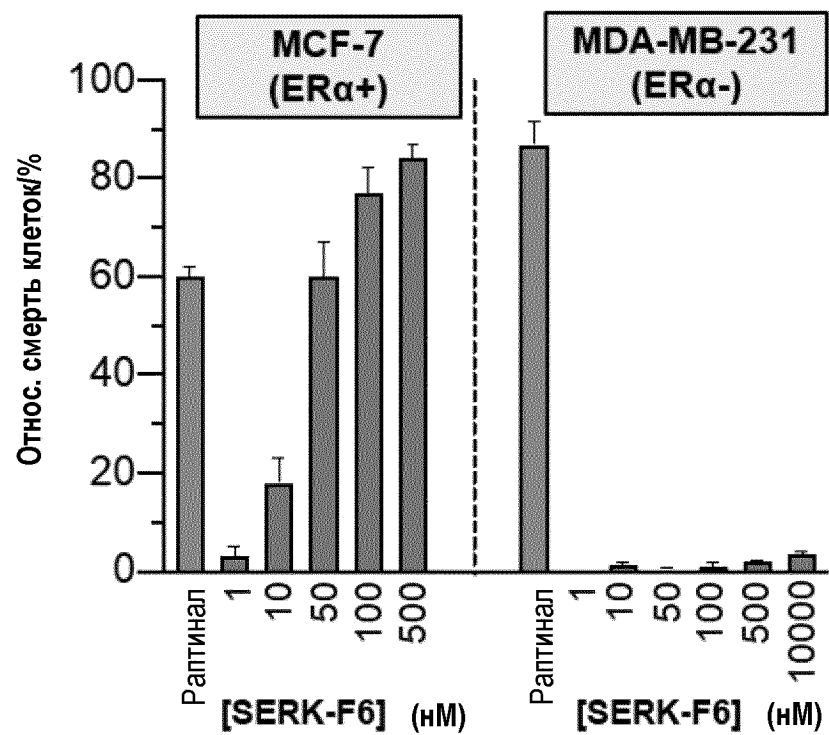


Фиг. 35

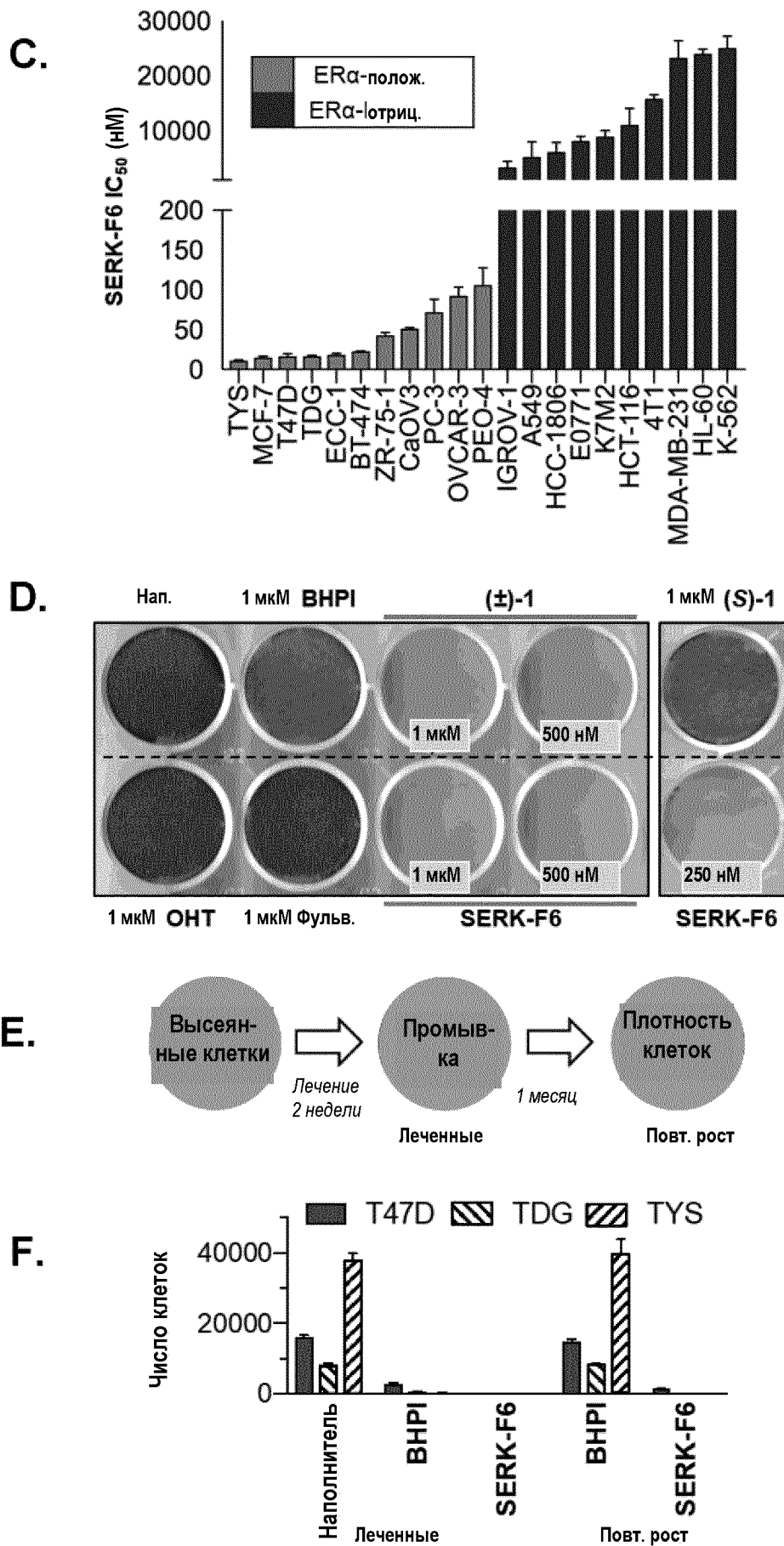
A.



B.

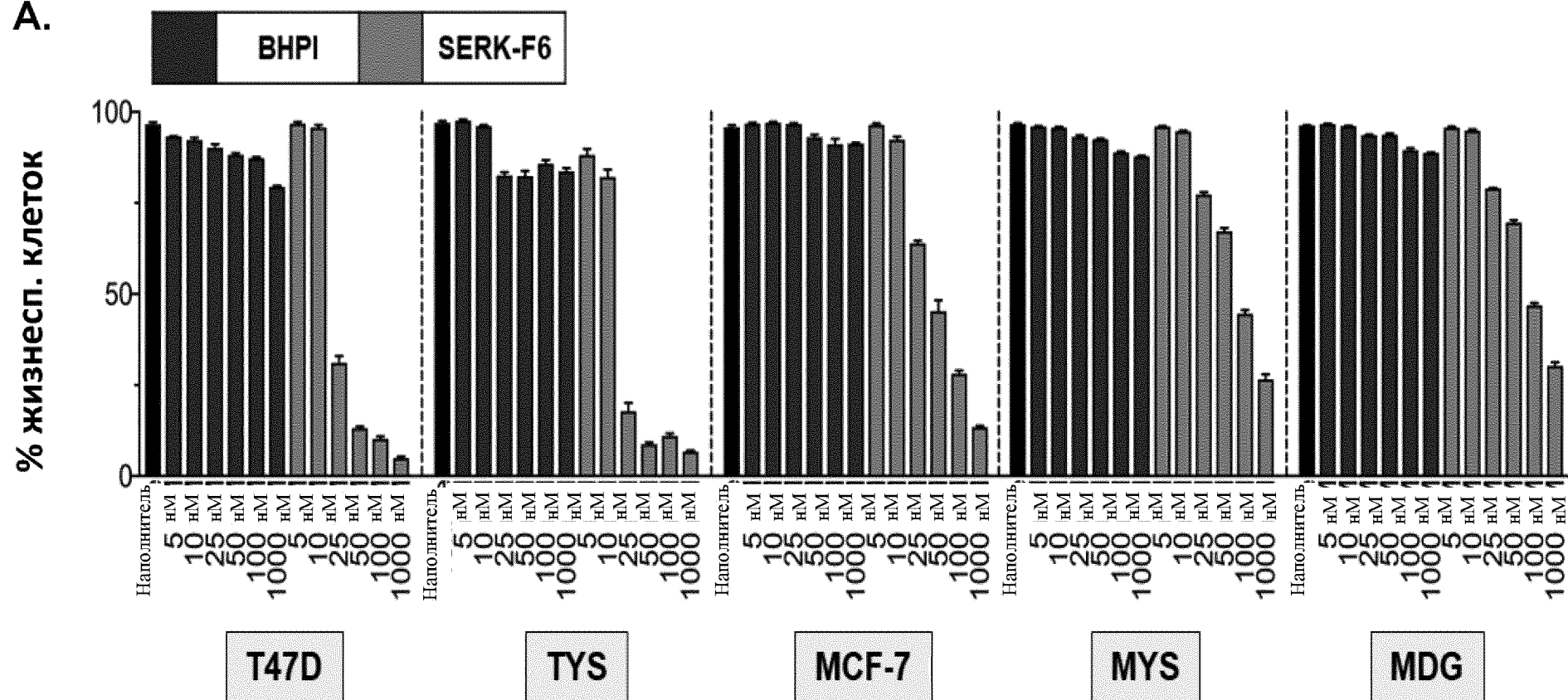


Фиг. 36



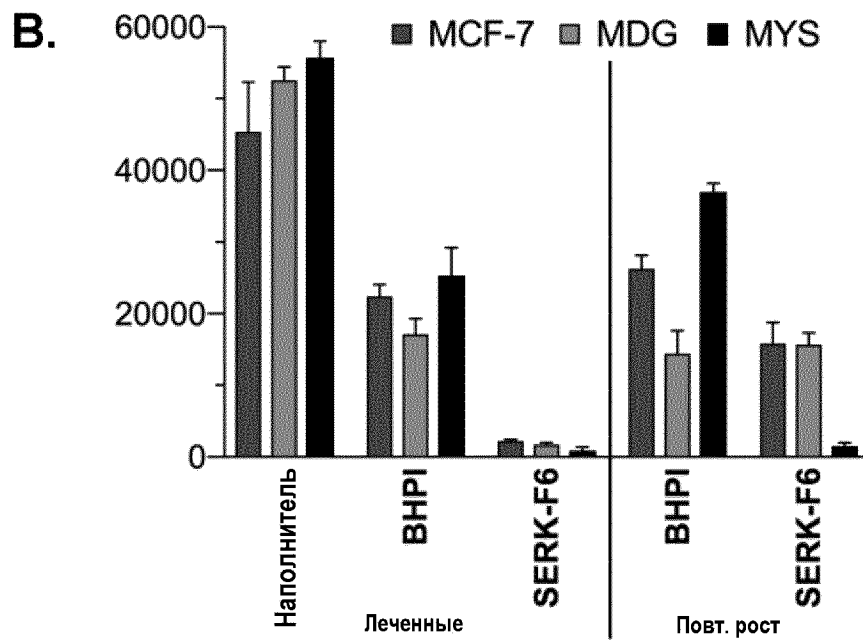
Фиг. 36 (прод.)

A.

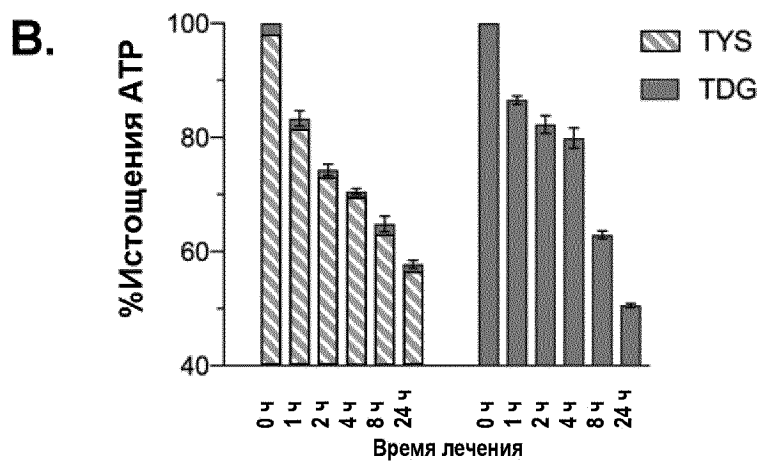
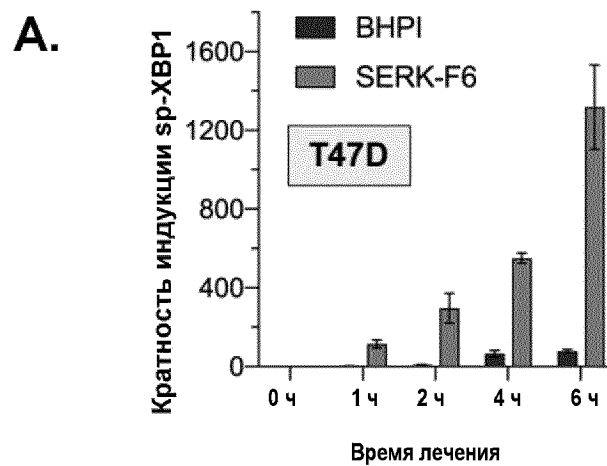


35/50

Фиг. 37

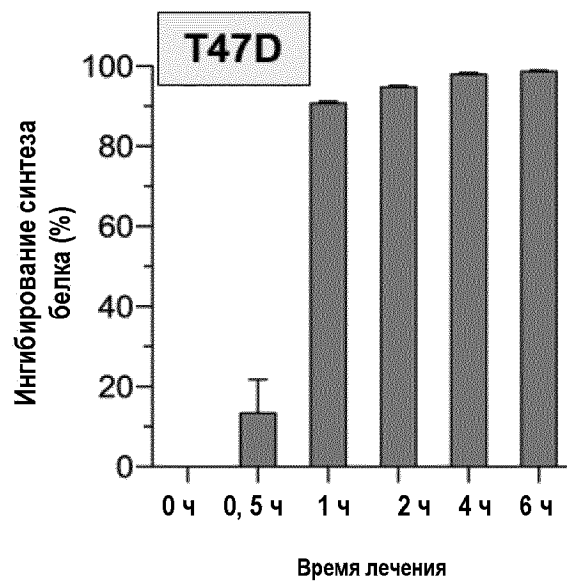


Фиг. 37 (прод.)



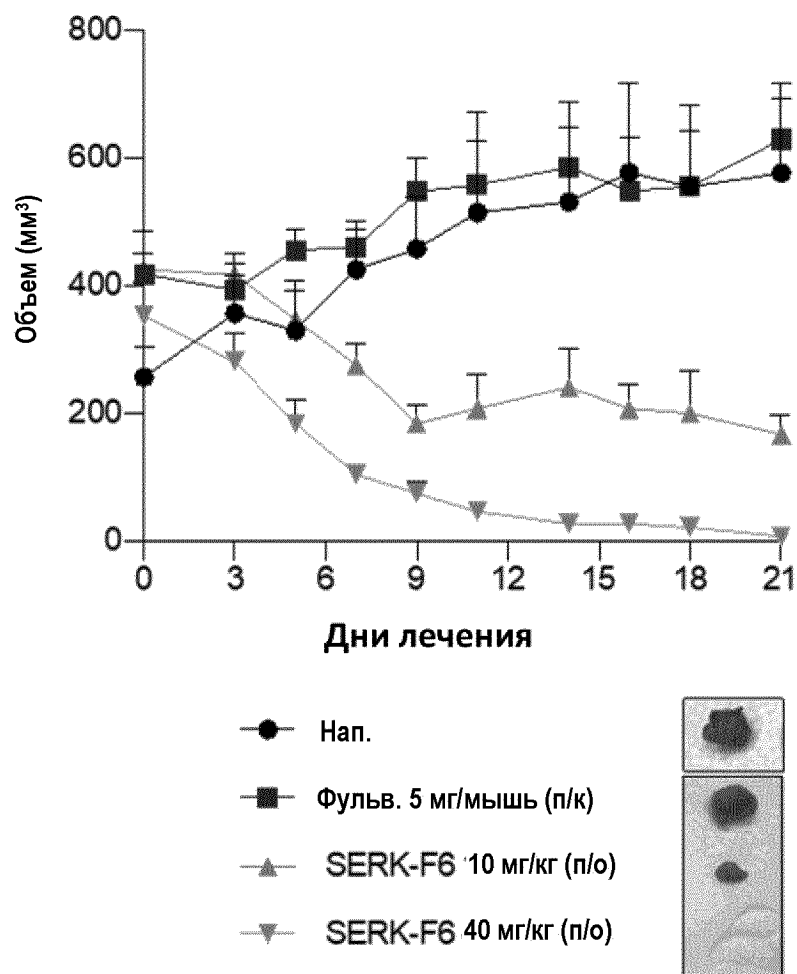
Фиг. 38

С.

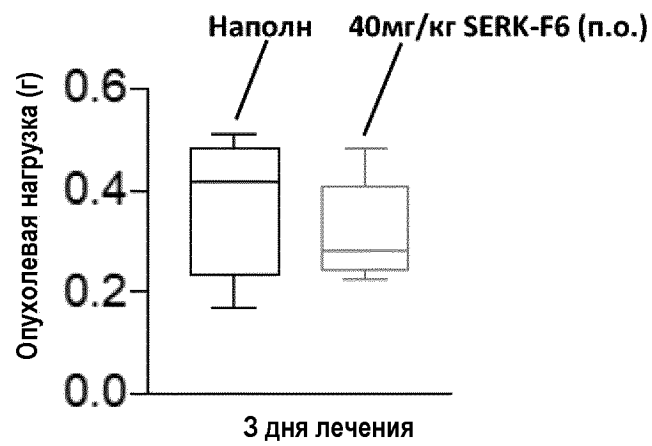
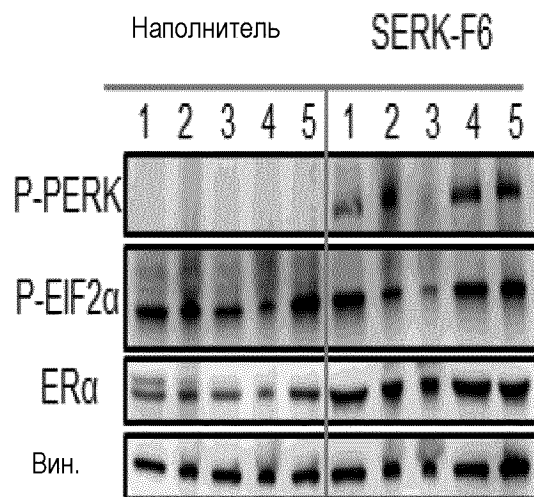
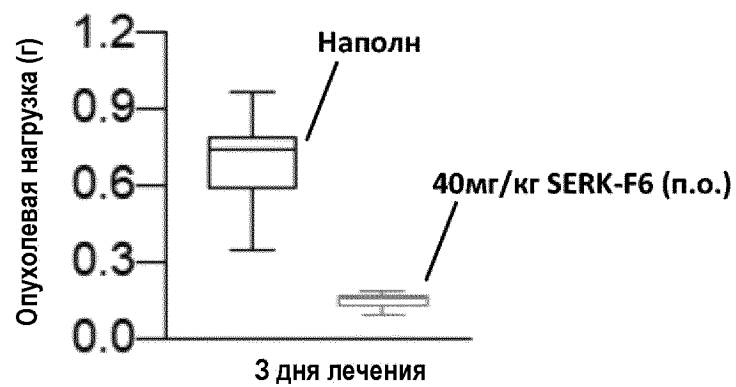


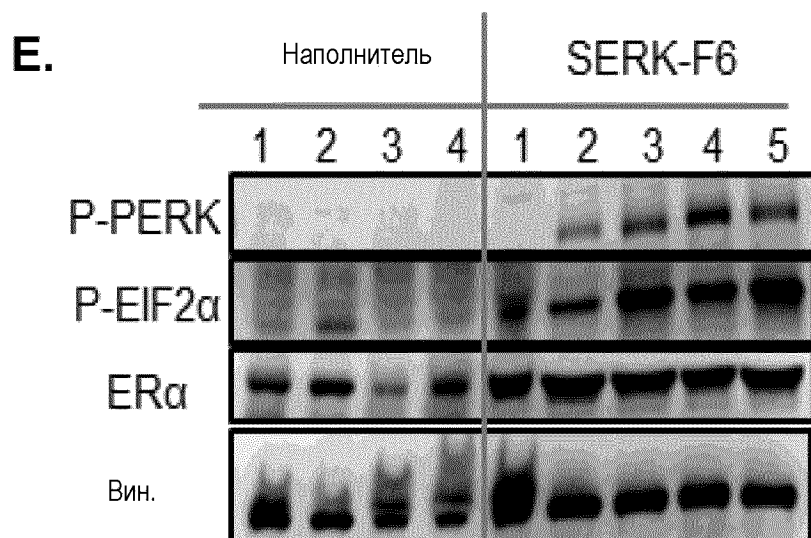
Фиг. 38 (прод.)

А.

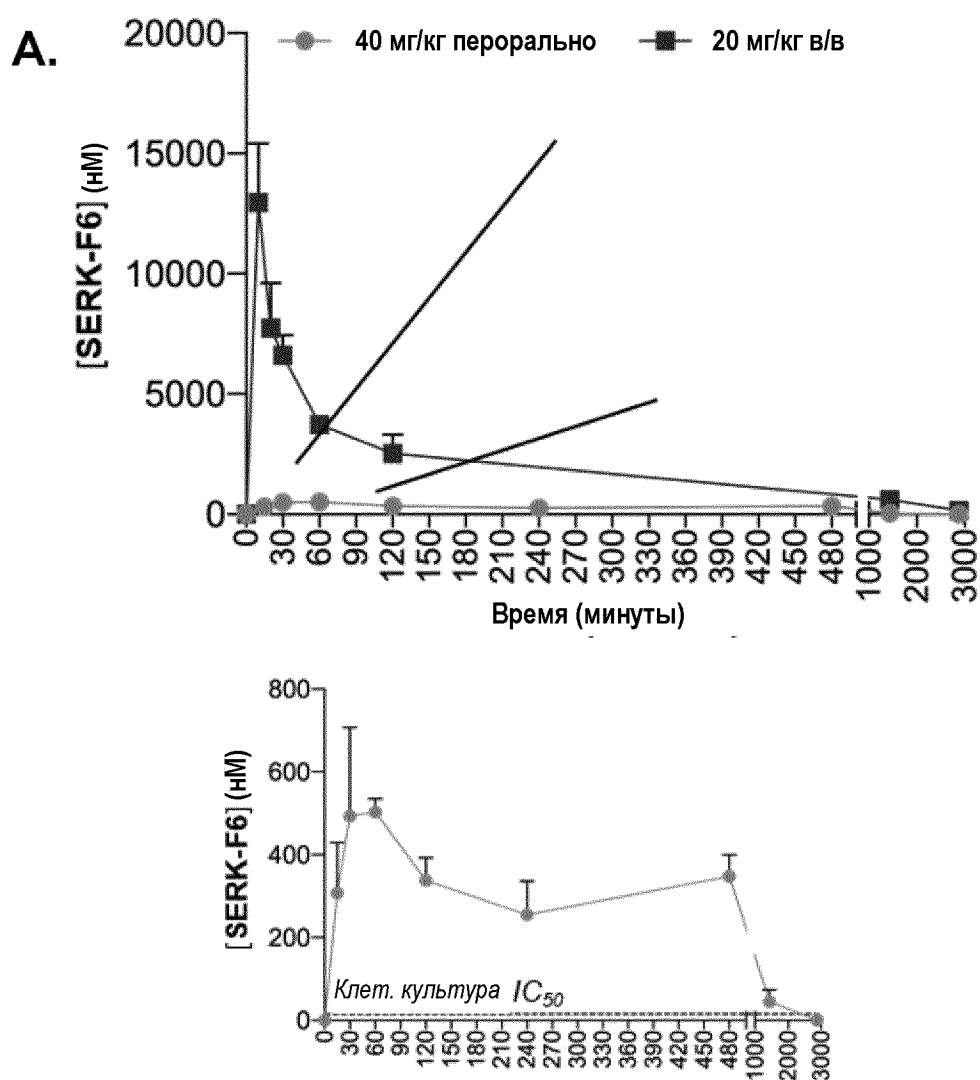


Фиг. 39

B.**C.****D.****Фиг. 39 (прод.)**



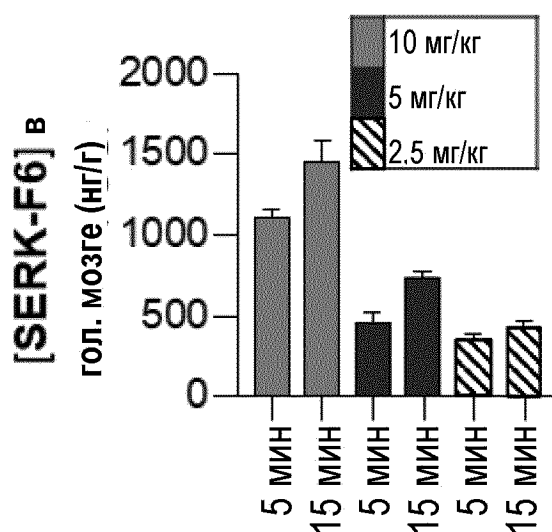
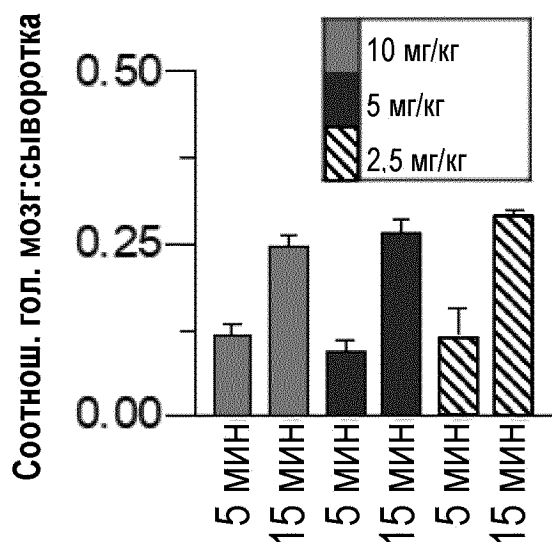
Фиг. 39 (прод.)



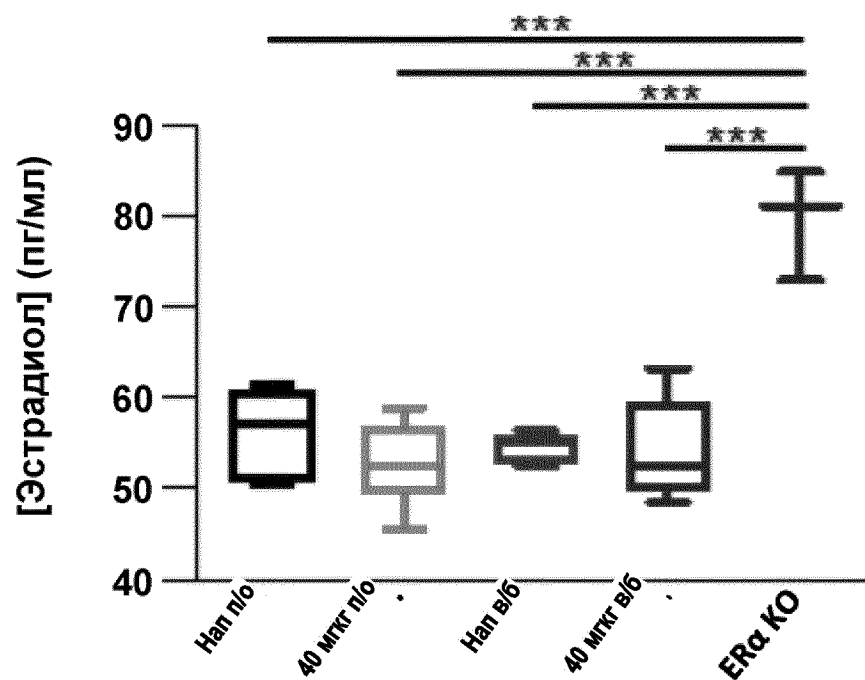
Фиг. 40

B.

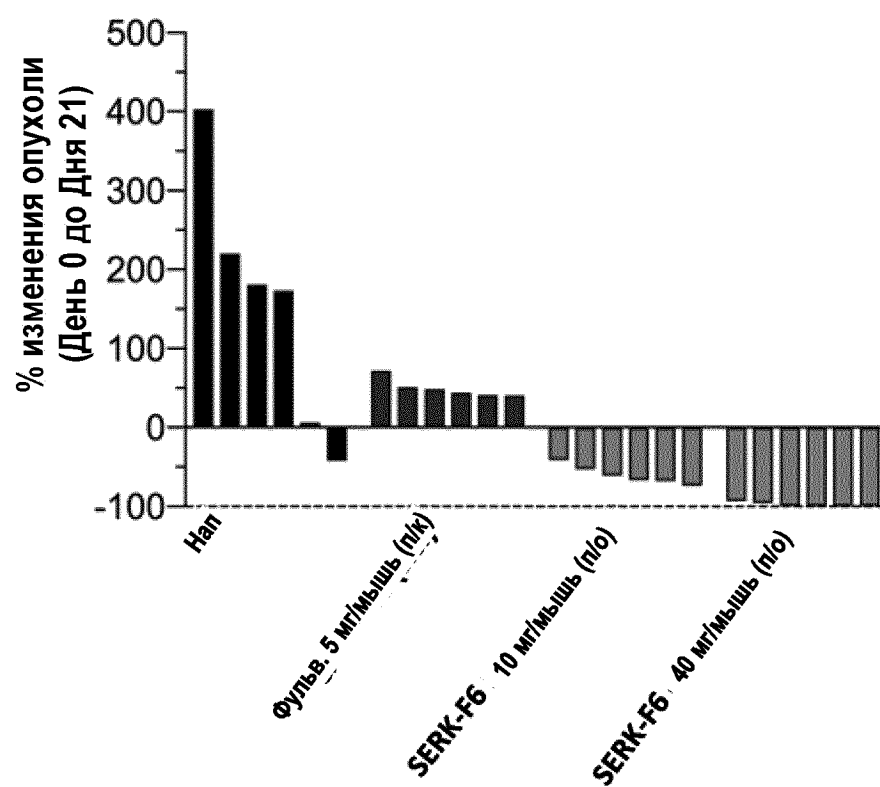
SERK-F6 40 мг/кг п/о			SERK-F6 20 мг/кг в/в		
Параметр	Ед.	Оцен.	Параметр	Ед.	Оцен.
AUC	мин*нг/мл	137077.3	AUC	мин*нг/мл	411548.4
C _{max}	нг/мл	197.104	C _{max}	нг/мл	11956.7
T _{1/2}	мин	448	T _{1/2}	мин	69.3
C _{min}	мкМ	0.435	C _{min}	мкМ	26.39

C.**D.****Фиг. 40 (прод.)**

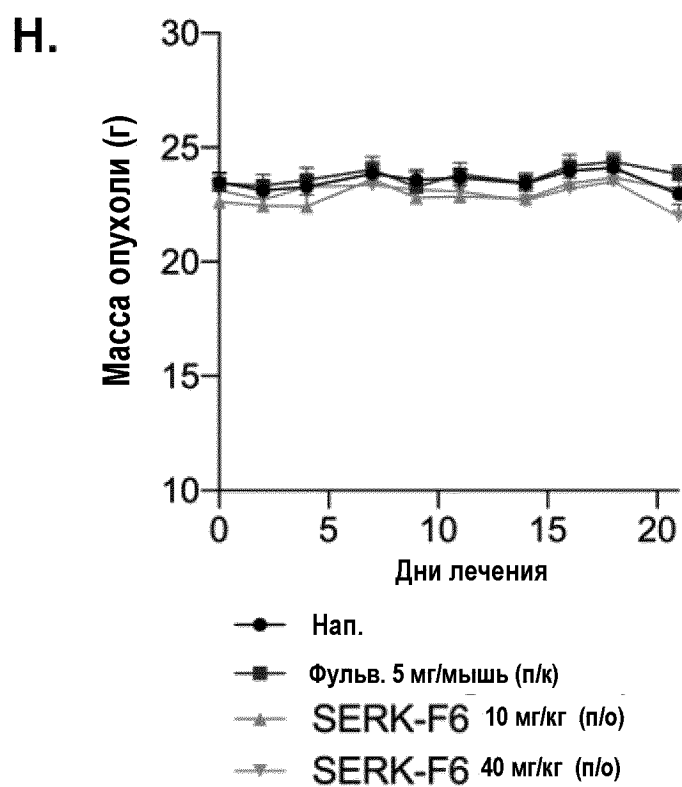
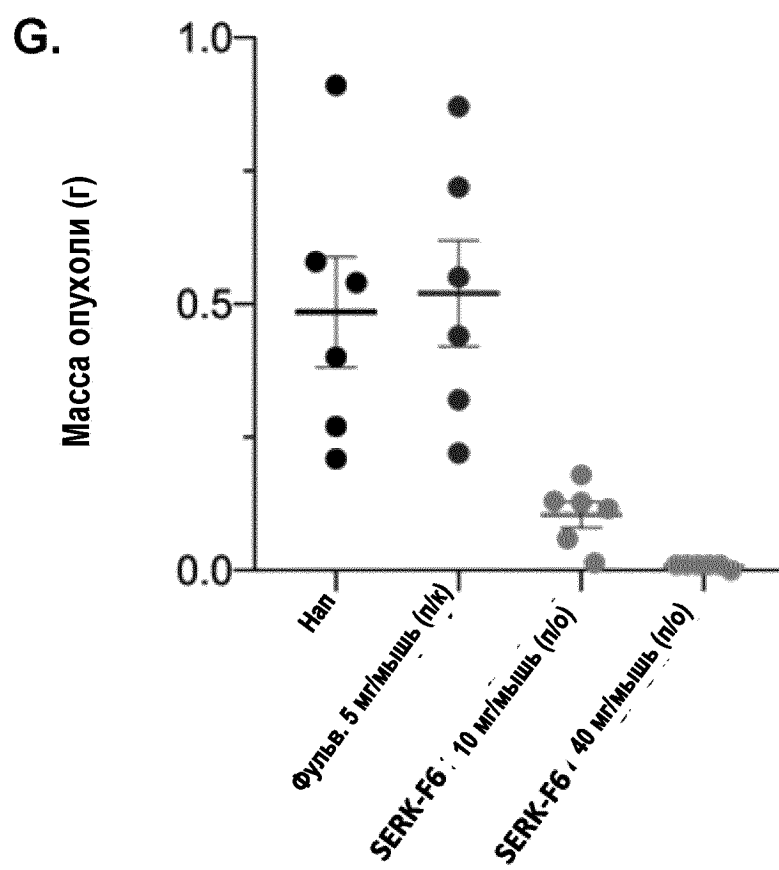
E.



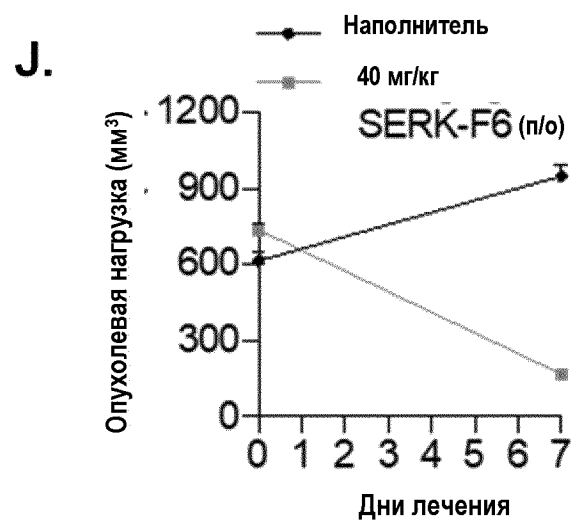
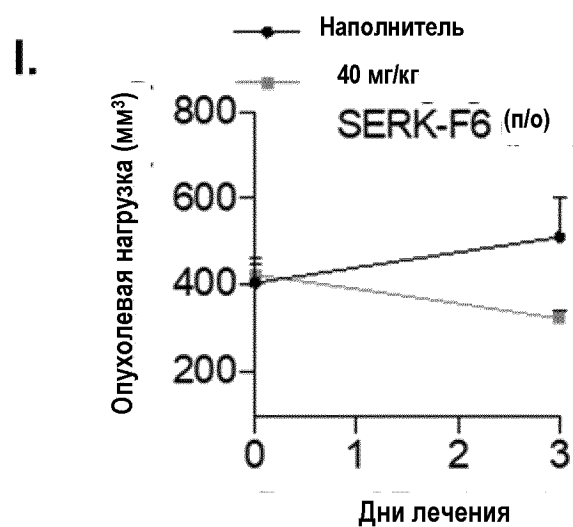
F.



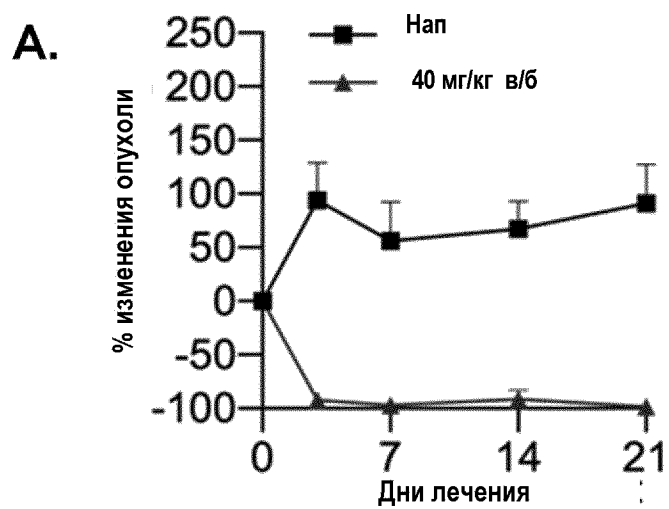
Фиг. 40 (прод.)



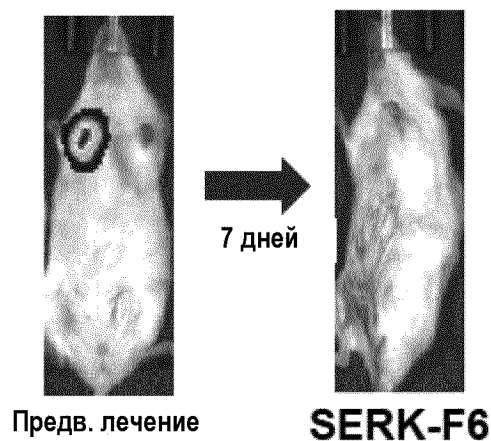
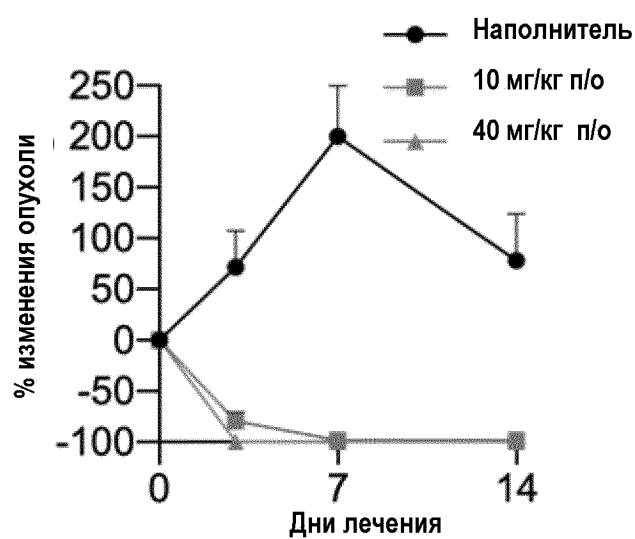
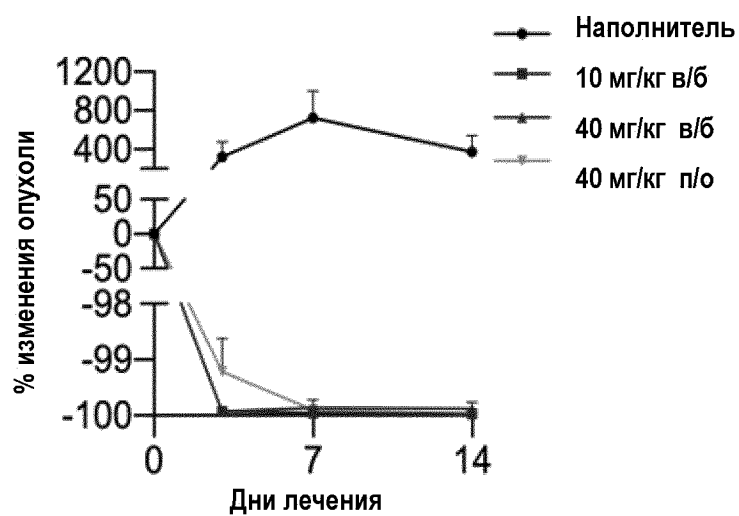
Фиг. 40 (прод.)



Фиг. 40 (прод.)



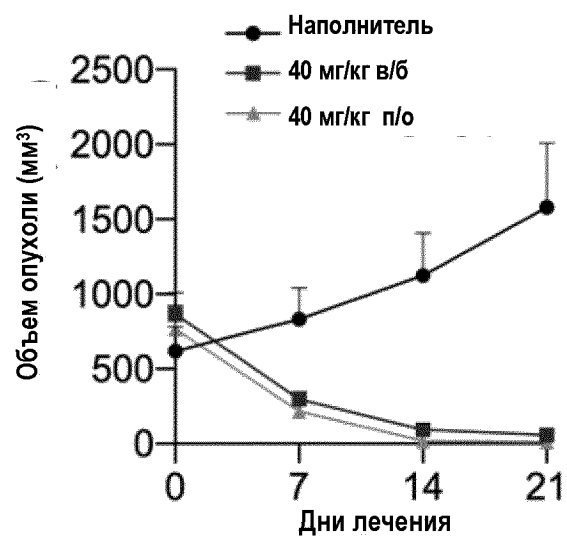
Фиг. 41

В.**С.****Д.****Фиг. 41 (прод.)**

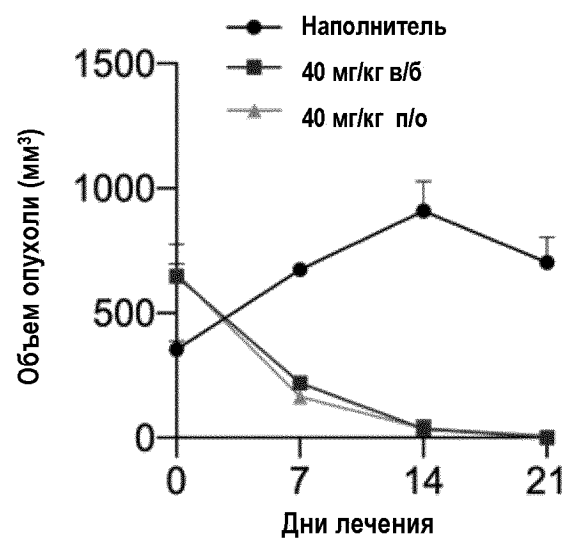
Е.



F.

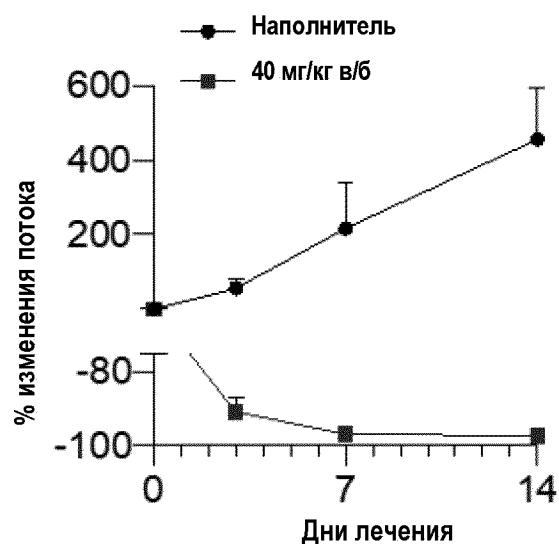


G.



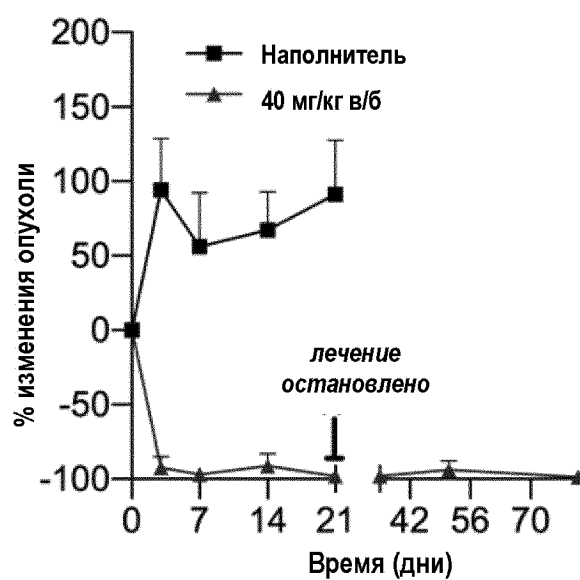
Фиг. 41 (прод.)

Н.

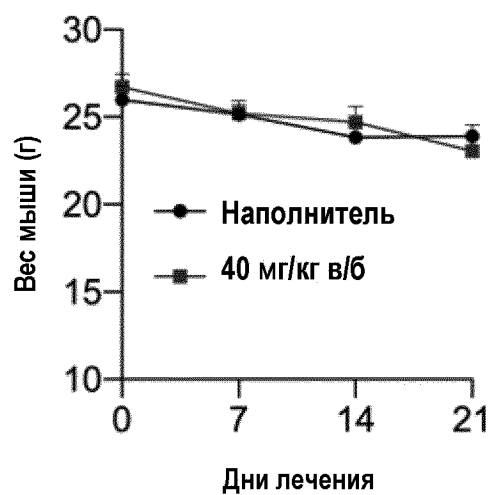


Фиг. 41 (прод.)

А.

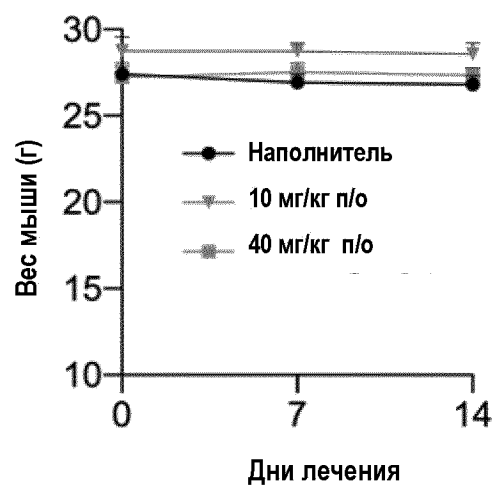


В.

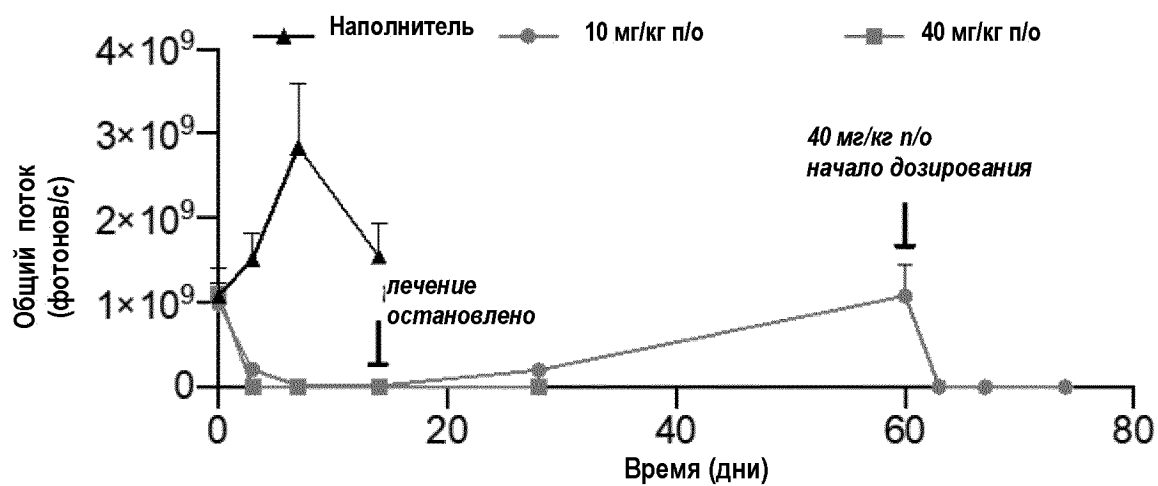


Фиг. 42

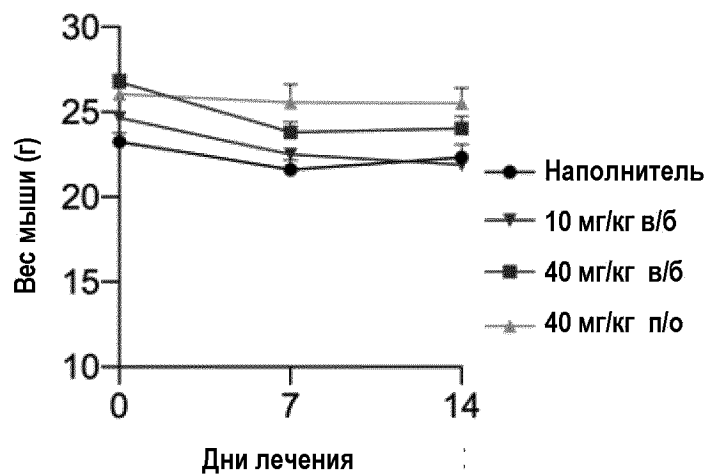
C.



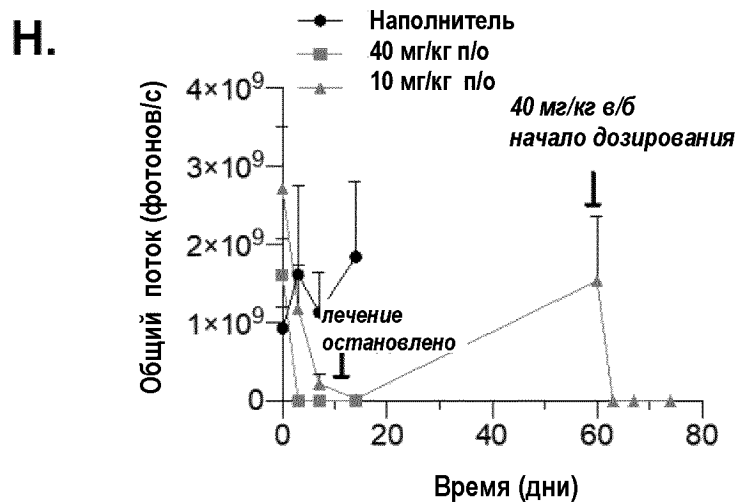
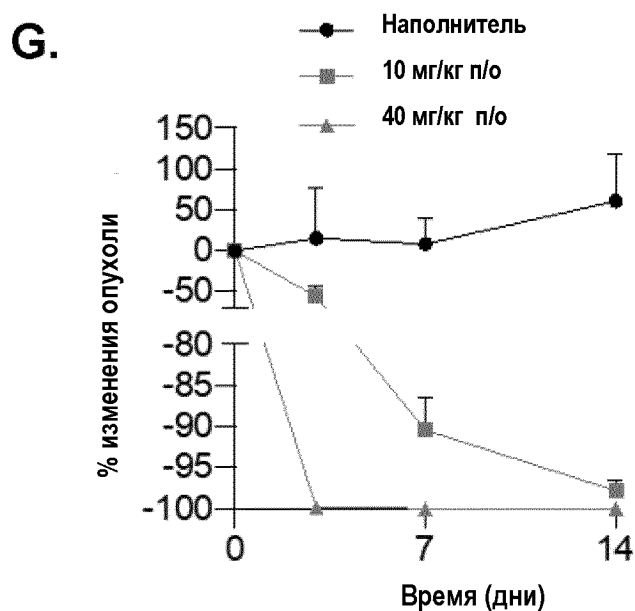
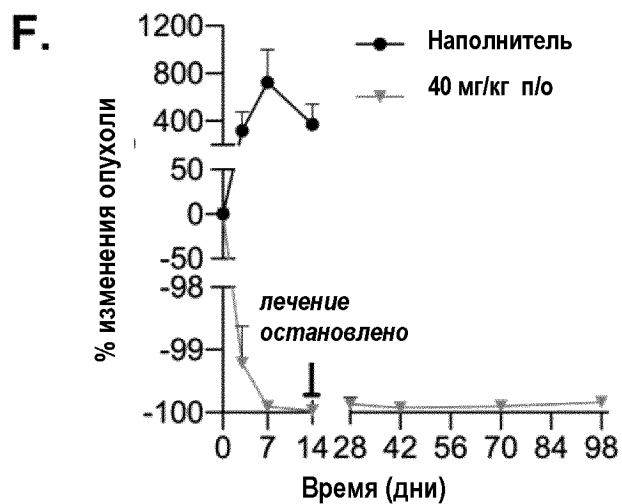
D.



E.

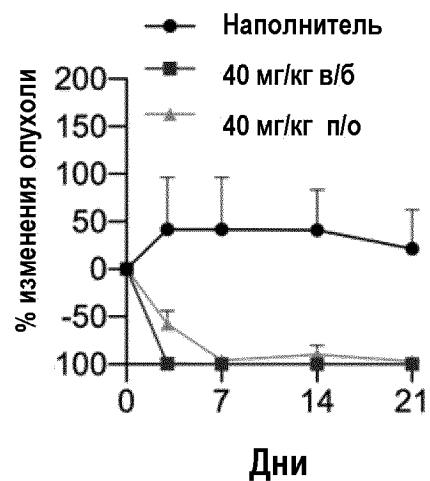


Фиг. 42 (прод.)

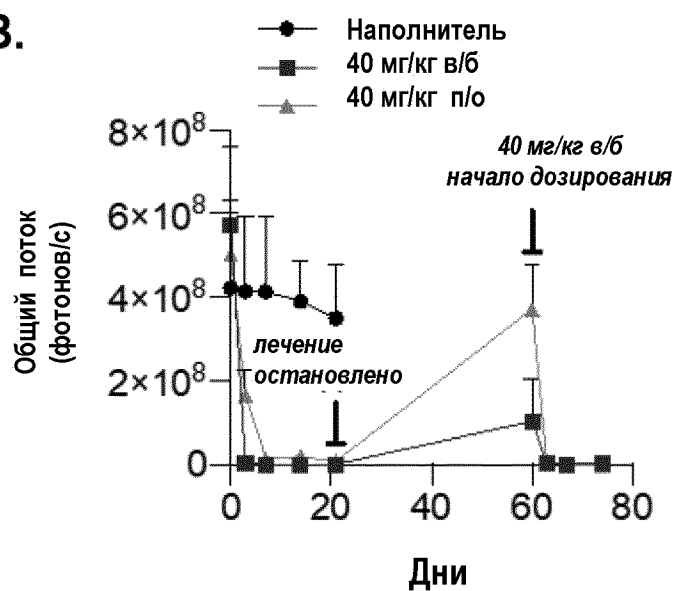


Фиг. 42 (прод.)

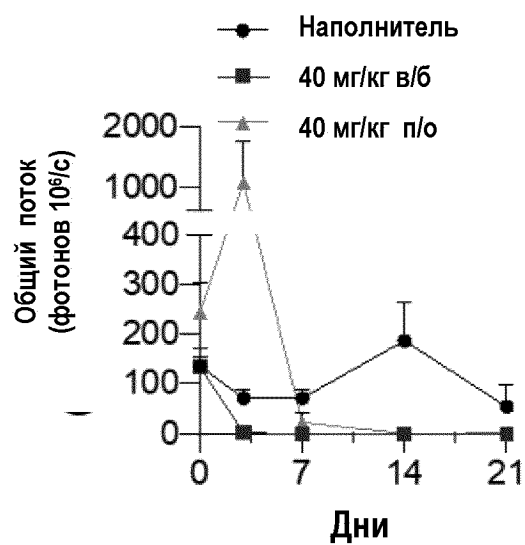
А.



В.

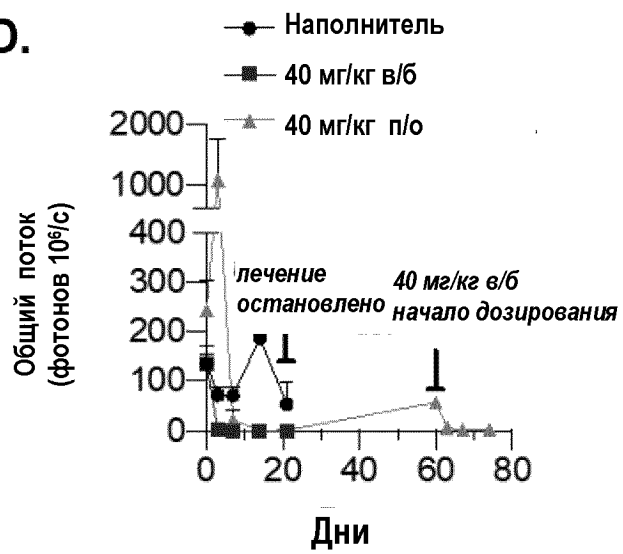


С.



Фиг. 43

D.



Фиг. 43 (прод.)