

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041610**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.14

(21) Номер заявки
202092992

(22) Дата подачи заявки
2019.07.11

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

(54) **СЕЛЕКТИВНЫЕ СУПРЕССОРЫ РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНА**

(31) **62/697,100; 62/825,172**

(32) **2018.07.12; 2019.03.28**

(33) **US**

(43) **2021.04.15**

(86) **PCT/US2019/041342**

(87) **WO 2020/014440 2020.01.16**

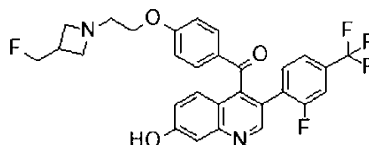
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Коэн Джеффри Дэниел, Солл Дэниел
Джон (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Лыу Т.Н.,
Строкова О.В. (RU)**

(56) **US-A9-2017197915
US-A1-2007015817
US-A1-2011281847**

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



их фармацевтически приемлемые соли, фармацевтические композиции, применения и способы применения.

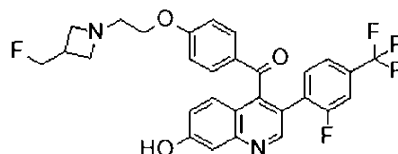
B1**041610****041610****B1**

Уровень техники

Селективные супрессоры рецептора эстрогена (ССРЭ) связываются с рецептором эстрогена (РЭ) и подавляют опосредованную РЭ транскрипционную активность. Это разрушение и даунрегуляция, вызванные ССРЭ, может быть полезно при лечении нарушений пролиферации клеток, таких как рак. Некоторые примеры низкомолекулярных ССРЭ описаны в литературе (см., например, WO 2005073204, WO 2014205136 и WO 2016097071). Однако известные ССРЭ пока не так полезны, как это необходимо для эффективного лечения рака. Например, обнаружение ССРЭ с лучшими фармакокинетическими (ФК) и фармакодинамическими (ФД) свойствами, более высокой эффективностью при клиническом применении и хорошей биодоступностью при пероральном введении было бы очень полезным при лечении рака. Чистый антагонист ССРЭ с сильным ингибированием опосредованной РЭ транскрипции был бы особенно полезен при лечении рака. Существует потребность в новых ССРЭ для лечения таких видов рака, как рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка и рак легких, а также мутации из-за возникающей резистентности. В частности, существует потребность в новых ССРЭ для лечения РЭ-позитивного рака груди, рака желудка и/или рака легких.

Суть изобретения

В данном документе предлагается соединение формулы



и его фармацевтически приемлемые соли и его фармацевтические композиции.

Также предлагаются способы применения, описанного в данном документе соединения, его фармацевтически приемлемых солей и фармацевтических композиций для лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких. Способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся пациенту.

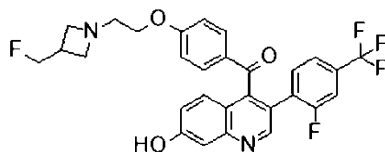
Кроме того, предлагается соединение, описанное в данном документе, и его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. Описанное в данном документе соединение и его фармацевтически приемлемые соли можно использовать в лечении рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака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

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

Описание

В данном документе описано новое тетрациклическое соединение и его фармацевтические соли, которые действуют как ССРЭ. Эти ССРЭ могут использоваться либо в качестве отдельных агентов, либо в комбинации с другими классами лекарственных средств, включая селективные модуляторы рецептора эстрогена (СМРЭ), ингибиторы ароматазы, ингибиторы CDK4, ингибиторы CDK6, ингибиторы PI3K и ингибиторы mTOR для лечения рака груди, позитивного по рецептору гормонов.

Новое соединение, описанное в данном документе, представляет собой соединение формулы



Также описаны фармацевтически приемлемые соли соединения. В соответствии с номенклатурой ИЮПАК соединение может быть названо (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанол.

В данном документе также описана фармацевтическая композиция, включающая соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с фармацевтически приемлемым эксципиентом, носителем или разбавителем.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых добавок. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая добавка(и)" относится к одному или нескольким носителям, разбавителям и эксципиентам, которые совместимы с другими добавками к композициям или составам и не вредны для пациента. Соединение или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, вводимых различными путями, такими как перорально или внутривенно. Биодоступность часто является фактором лечения рака, и может быть полезна возможность адаптировать способы введения и фармацевтические композиции для контроля или оптимиза-

ции биодоступности активного ингредиента. Пероральная биодоступная композиция ССРЭ была бы особенно полезной. Считается, что соединение или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, обладают пероральной биодоступностью. Примеры фармацевтических композиций и способов их получения можно найти в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen Jr, Editor, 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и эксципиентов включают следующее: физиологический раствор, воду, крахмал, сахара, маннит и производные силикона; связывающие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; каолин и бентонит; полиэтиленгликоли.

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

В данном документе также описано соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль для использования в терапии. Соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, можно использовать при лечении рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких. Например, рак может быть РЭ-позитивным раком груди, РЭ-позитивным раком желудка или РЭ-позитивным раком легких. Например, соединение или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить перорально.

Кроме того, соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли можно использовать при производстве лекарственного средства для лечения рака. Например, лекарство можно вводить перорально. Типы рака, для лечения которых могут быть использованы описанные в данном документе лекарственные средства, включают рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка или рак легких. В частности, рак может быть РЭ-позитивным раком груди, РЭ-позитивным раком желудка или РЭ-позитивным раком легких.

Соединение, описанное в данном документе, и его фармацевтически приемлемые соли могут иметь клиническое применение в качестве единственного агента или в комбинации с другими противораковыми агентами для лечения рака, такого как рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак простаты, рак матки, рак желудка и рак легких. При использовании в комбинации с другими противораковыми средствами соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли можно использовать одновременно, последовательно или отдельно с другими противораковыми агентами. Примером другого противоракового агента, которое может быть объединено с описанным в данном документе соединением, является 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этоксифенил}-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол.

Применяемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемым солям, которые при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению. Предпочтительно желаемый эффект представляет собой ингибирование пролиферации опухолевых клеток, гибель опухолевых клеток или оба. Соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, дневные дозировки обычно находятся в точном диапазоне от около 100 до около 2000 мг.

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

В данном документе термин "пациент" относится к человеку, который поражен определенным заболеванием, расстройством или патологическим состоянием.

Соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, можно получить различными способами, известными в данной области техники, некоторые из которых проиллюстрированы ниже в синтезах и в примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно объединять различным образом или объединять со стадиями из других методик с получением соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемых солей. Продукты стадий синтеза можно выделять стандартными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрацию, растирание и кристаллизацию. Указанные реагенты и исходные материалы легко доступны специалистам в данной области техники.

На необязательной стадии может быть получена фармацевтически приемлемая соль соединения, описанного в данном документе, посредством взаимодействия соответствующего свободного основания

изобретения с подходящей фармацевтически приемлемой кислотой в подходящем растворителе в стандартных условиях. Кроме того, указанные соли можно получать одновременно с удалением азот-защитных групп. Возможное образование фармацевтически приемлемых солей хорошо известно. См., например, Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al., "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); и Berge, S.M., et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977). Специалистам в данной области техники будет понятно, что соединение, описанное в данном документе, может быть легко превращено и выделено в виде фармацевтически приемлемой соли.

Если не указано иное, используемые в данном документе сокращения определены в соответствии с *Aldrichimica Acta*, Vol. 17, No. 1, 1984, или общепринятыми значениями для специалистов в данной области техники. Другие сокращения определены следующим образом: "ППК" относится к площади под кривой; "BSA" относится к альбумину бычьей сыворотки; "DCM" относится к дихлорметану или метилхлориду; "DMA" относится к диметиламину; "DMEM" относится к среде Игла, модифицированной Дульбекко; "DMF" относится к N,N-диметилформамиду; "DMSO" относится к диметилсульфоксиду; "ДНК" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; "кДНК" относится к комплементарной ДНК; "ДНКаз" относится к дезоксирибонуклеазе; "DTT" относится к дитиотреитолу; "EC₅₀" относится к концентрации агента, которая вызывает 50% ответ целевой активности по сравнению с заранее определенным позитивным контрольным соединением (абсолютная EC₅₀); "EDTA" относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; "РЭ α " относится к рецептору эстрогена альфа; "EtOAc" относится к этилацетату; "EtOH" относится к этанолу; "FBS" относится к фетальной бычьей сыворотке; "HBSS" относится к сбалансированному солевому раствору Хэнка; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пипазинэтансульфоновой кислоте; "IC₅₀" относится к концентрации агента, которая вызывает 50% максимальной ингибирующей реакции, возможной для этого агента, (относительная IC₅₀) или концентрации агента, которая вызывает 50% ингибирование активности целевого фермента по сравнению с контролем плацебо (абсолютное IC₅₀); "iPrOH" относится к изопропанолу или изопропиловому спирту; "BV" относится к внутривенному введению; "Ki" относится к константе ингибирования; "MeOH" относится к метиловому спирту или метанолу; "MTBE" относится к метил-трет-бутиловому эфиру; "PBS" относится к физиологическому раствору с фосфатным буфером; "ПО" относится к пероральному введению; "РП α " относится к рецептору прогестерона альфа; "QD" относится к дозировке один раз в день; "РНК" относится к рибонуклеиновой кислоте; "РНКаз" относится к рибонуклеазе; "ОТ-ПЦР" относится к полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; "ОТ-кПЦР" относится к количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; "THF" относится к тетрагидрофурану; и "XPhos Pd G2" относится к хлор-(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладию(II).

Следующие синтезы и примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение.

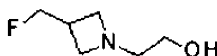
Синтезы и примеры

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



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

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



HCl

Растворяют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ол (529 г, 4 моль) в MTBE (2,6 л) и охлаждают до 0°C. Добавляют раствор HCl/EtOH (492 мл, 30 мас.%) по каплям в течение 30 мин, затем перемешивают при 0°C в течение 30 мин. Фильтруют твердые частицы и промывают осадок на фильтре MTBE (2×200

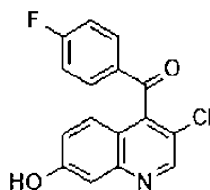
мл). Сушат в атмосфере N_2 в течение 8 ч с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 580 г (86%) указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 134,0 (M+H).

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



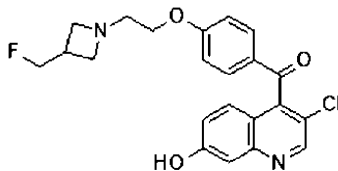
Охлаждают смесь 4-бром-3-хлор-7-метоксихинолина (70 г, 254 ммоль) и THF (1 л) до $-40^{\circ}C$ в атмосфере N_2 , что приводит к осаждению материала. Добавляют изопропил-магнийхлорид (2М в THF, 254 мл, 509 ммоль) в течение 20 мин и перемешивают смесь в течение 1 ч. Добавляют раствор 4-фторбензоилхлорида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

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



Добавляют трибромид бора (1М в DCM, 295 мл, 295 ммоль) к смеси (3-хлор-7-метоксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанона (31 г, 98 ммоль) в DCM (217 мл) и перемешивают смесь при комнатной температуре в течение 3 дней. Медленно выливают смесь в раствор двухосновного фосфата калия (2М в воде, 700 мл) и воды (200 мл) при $0^{\circ}C$. Позволяют смеси нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 1 ч. Концентрируют раствор в вакууме для удаления органических растворителей, фильтруют, собирают фильтрат и сушат фильтрат в вакууме при $45^{\circ}C$ в течение ночи. Обрабатывают твердые вещества смесью DCM/гептан (1:1, 450 мл) и перемешивают в течение ночи. Собирают твердые вещества и сушат в вакууме в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 32 г (количественный выход) указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 302,0 (M+H).

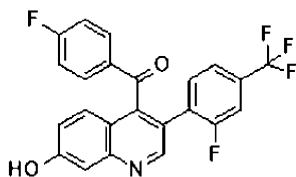
Синтез 5. (3-Хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанон



Добавляют 2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этан-1-ола гидрохлорид (3,90 г, 23,0 ммоль) к перемешиваемому раствору (3-хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-фторфенил)метанона (5,00 г, 15,3 ммоль) в DMF (75 мл) с последующим добавлением гидроксида натрия (60% в минеральном масле, 3,07 г, 76,6 ммоль). Перемешивают в атмосфере N_2 и нагревают до $40^{\circ}C$ в течение 45 мин. Гасят раствор водой и концентрируют. Разделяют остаток между 20% iPrOH/ $CHCl_3$ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и разделяют, водный раствор экстрагируют 2×20% iPrOH/ $CHCl_3$, объединяют органические экстракты, сушат объединенные органические слои над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют фильтрат с получением неочищенного продукта в виде темно-красного масла. Неочищенный продукт очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют градиентом 5-10% 7N NH_3 в

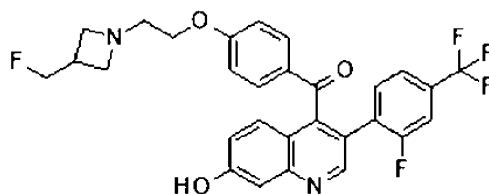
MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 5,31 г (84%) указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 415,0 (M+H).

Синтез 6. (4-Фторфенил)-[3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидрокси-4-хинолил]метанон



Дегазируют/продувают $5 \times N_2$ смесь (3-хлор-7-гидрокси-4-хинолил)-(4-фторфенил)метанона (140 г, 440,8 ммоль), 2-фтор-4-(трифторметил)фенилбороновой кислоты (183,3 г, 881,7 ммоль), карбоната калия (184,6 г, 1,3 моль), 2-метил-2-бутанола (1,7 л) и воды (0,56 л). Добавляют XPhos Pd G2 (7,1 г, 8,82 ммоль) и нагревают при $80^\circ C$ в течение 2 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры и упаривают органический растворитель. Добавляют EtOAc (1 л) и воду (0,2 л). Органический слой отделяют и сушат над сульфатом магния. Фильтруют этот материал через силикагель и концентрируют досуха. Растирают неочищенный материал со смесью гексанов (1,25 л) и МТВЕ (0,25 л) с получением твердого вещества. Фильтруют твердое вещество и сушат под вакуумом. Растворяют твердое вещество в THF (1,5 л) и добавляют поглотитель SiliaMetS® Thiol (150 г). Перемешивают смесь при комнатной температуре. Фильтруют поглотитель и упаривают фильтрат досуха с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 185,5 г (96%) указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 430,0 (M+H).

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

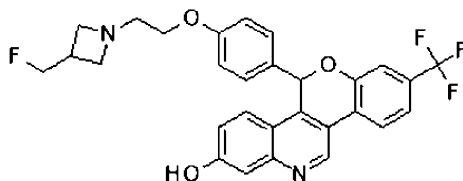


В сосуд, оборудованный впускным отверстием для N_2 , добавляют THF (2,8 л), трет-бутоксид калия (274,5 г, 2,45 моль) и 2-(3-(фторметил)азетидин-1-ил)этан-1-ол (168 г, 1,22 моль). Перемешивают смесь в течение 10 мин. По каплям добавляют раствор (4-фторфенил)-[3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидрокси-4-хинолил]метанона (350 г, 0,81 моль) в THF (0,7 л). Перемешивают при комнатной температуре в течение часа. Гасят реакционную смесь 1N HCl до pH 8 и разбавляют EtOAc (4 л). Отделяют органический слой и промывают рассолом (2 л). Сушат раствор над сульфатом магния, фильтруют раствор и концентрируют досуха с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 415 г (93,8%) указанного в заголовке соединения в виде бледно-коричневого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 543,2 (M+H).

Альтернативный пример 1.

Дегазируют/продувают $N_2 \times 5$ смесь (3-хлор-7-гидроксихинолин-4-ил)-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)метанона (200 мг, 0,48 ммоль), 2-фтор-4-(трифторметил)фенилбороновой кислоты (158 мг, 0,72 ммоль), карбоната калия (202 мг, 1,45 ммоль), 2-метил-2-бутанола (3 мл) и воды (1 мл) в сосуде для СВЧ. Добавляют XPhos Pd G2 (12 мг, 0,015 ммоль), герметизируют смесь и помещают в микроволновую печь при $80^\circ C$ в течение 2 ч. Разделяют остаток между МТВЕ и насыщенным раствором хлорида аммония. Разделяют слои и экстрагируют водную фазу МТВЕ. Органические экстракты объединяют, сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют фильтрат с получением оранжевого остатка. Неочищенный материал очищают колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют смесью 5% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения. После этого синтеза получали 205 мг (78%) указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества с ЭС/МС (m/z): 543,2 (M+H).

Пример 2. Рацемический 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5H-[1]бензопирано[4,3-c]хинолин-2-ол



Охлаждают раствор (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанона (5,27 г, 9,71 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл) до $5^\circ C$.

Добавляют триэтилборгидрид лития (1М в THF, 30,0 мл, 30,0 ммоль). Убирают охлаждающую баню и перемешивают 1,5 ч при комнатной температуре. Смесь гасят водой. Добавляют насыщенный раствор NH_4Cl и EtOAc. Разделяют слои и экстрагируют водный слой EtOAc. Органические экстракты объединяют, сушат над безводным MgSO_4 , фильтруют и концентрируют фильтрат. Растворяют неочищенный остаток в THF (100 мл). Добавляют гидрид натрия (60% в минеральном масле, 1,94 г, 48,5 ммоль). Нагревают раствор с обратным холодильником в течение 1,5 ч. Добавляют дополнительно гидрид натрия (60% в минеральном масле, 1,94 г, 48,5 ммоль), затем нагревают с обратным холодильником еще 30 мин. Охлаждают раствор до комнатной температуры и гасят водой. Добавляют EtOAc и насыщенный раствор NH_4Cl . Разделяют слои и экстрагируют водный слой EtOAc. Органический экстракт объединяют, сушат над безводным MgSO_4 , фильтруют и концентрируют фильтрат. Очищают остаток колоночной хроматографией на силикагеле, элюируют градиентом 5-7% MeOH в DCM с получением указанного в заголовке соединения (3,70 г, 72%) в виде светло-желтого пенистого вещества. ЭС/МС (m/z): 525,2 (M+H).

Биологические анализы

Взаимосвязь между экспрессией рецептора эстрогена и некоторыми видами рака описана в литературе (для рака груди см., например, Puhalla S., Bhattacharya S., Davidson N., Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care, *Molecular Oncology*, 2012, 6:222-236; Kennecke H., Yerushalmi R., Woods R., Cheang MCU, Voduc D., Speers C.H., Nielsen T.O., Gelmon K., Metastatic behavior of breast cancer subtypes, *J. Clin Oncol.*, 2010, 28(20):3271-3277; для рака яичников см., например, O'Donnell A.J., Macleod K.G., Burns D.J., Smyth J.F., Langdon S.P., Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen, *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12(4):851-66; Walker G., MacLeod K., Williams A.R., Cameron D.A., Smyth J.F., Langdon S.P., Estrogen regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.*, 2007, 106(3):461-8; Smyth J.F., Gourley C., Walker G., MacKean M.J., Stevenson A., Williams A.R., et al., Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: The use of letrozole in estrogen receptor-positive patients, *Clin Cancer Res*, 2007, 13(12):3617-22; для рака простаты см., например, Bonkohoff H, Fixemer T, Hunsicker I and Remberger K, Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostate lesions, *Am J. Pathol.*, 1999, 155:641-647; для рака эндометрия и матки см., например, Krasner C., Aromatase inhibitors in gynecologic cancer, *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, 2007, Aug-Sep; 106(1-5):76-80; Boisen M.M., Andersen C.L., Sreekumar S., et al., Treating gynecologic malignancies with selective estrogen receptor downregulators (SERDs): Promise and challenges, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2015, 418:322-3330; для рака легких см., например, Baik C.S., Eaton K.D. et al., Estrogen signaling in lung cancer: An opportunity for novel therapy, *Cancer*, 2012, 4:969-988; Marquez-Garban D.C., Chen H-W., Goodglick L., Fishbein M.C. and Pietras R.J., Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer. *Steroid enzymes and cancer*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009, 1155:194-205; Hamilton D.H., Griner L.M., Keller J.M., Hu X., Southall N., Marugan J., David J.M., Ferrer M. and Palena C., Targeting estrogen receptor signaling with fulvestrant enhances immune and chemotherapy mediated cytotoxicity of human lung cancer, *Clin Cancer Res.*, 2016, 22(24): 6204-16; Rodriguez-Lara V., Hernandez-Martinez J.M., Arrieta O., Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J. Thoracic Disease*, 2018, 10(1):482-497; для рака желудка см., например, Tang W., Liu R., Yan Y., Pan X., Wang M., Han X., Ren H., and Zhang Z., Expression of estrogen receptors and androgen receptor and their clinical significance in gastric cancer, *Oncotarget*, 2017, 8(25) 40765-777).

Следующие анализы демонстрируют, что приведенные в качестве примеров соединения являются сильными разрушителями РЭα дикого типа и мутантных белков. Результаты анализов также демонстрируют, что приведенные в качестве примеров соединения являются сильными антагонистами РЭα дикого типа и мутантных рецепторов и ингибируют опосредованную РЭ транскрипционную активность. Кроме того, анализы демонстрируют, что соединение примера 1 ингибирует пролиферацию клеточных линий РЭ+ рака груди и передачу сигналов РЭα и рост опухоли в ксенотрансплантированной модели РЭ-позитивного рака груди.

Анализ конкурентного связывания РЭα (дикий тип) и РЭα (Y537S мутант).

Целью следующих анализов конкурентного связывания РЭ является определение аффинности связывания тестируемого соединения к РЭα (дикий тип) и РЭα (Y537S мутант) см. Fanning et al., "Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation," *eLife* 2016; 5:e12792.

Проводят анализ конкурентного связывания в буфере, содержащем 50 mM HEPES, pH 7,5, 1,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 1 мг/мл яичного альбумина и 5 mM DTT, используя 0,025 мкCi на лунку ^3H -эстрадиола (118 Ci/ммоль, 1 мКи/мл), 7,2 нг/лунку РЭα (дикий тип), или 7,2 нг/лунку РЭα (Y537S мутант). Добавляют тестируемое соединение в 10 различных концентрациях в диапазоне от 10000 до 0,5 nM и определяют неспецифическое связывание в присутствии 1 мкM 17-β эстрадиола. Инкубируют реакцию связывания (140 мкл) в течение 4 ч при комнатной температуре и затем добавляют холодный декстран-угольный буфер (70 мкл) (содержащий на 50 мл аналитического буфера 0,75 г древесного угля и 0,25 г декстрана) к каждой реакции. Перемешивают планшеты в течение 8 мин на орбитальном шейкере при 4°C и затем центрифугируют при 3000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Перено-

сят аликвоту (120 мкл) смеси в другой 96-луночный белый планшет с плоским дном (Costar) и добавляют сцинтилляционную жидкость Perkin Elmer Optiphase Supermix (175 мкл) в каждую лунку. Герметизируют планшеты и энергично перемешивают на орбитальном шейкере. После инкубации в течение 2,5 ч считывают данные планшетов на счетчике Wallac Microbeta. Рассчитывают IC_{50} с использованием 4-параметрической логистической кривой и рассчитывают % ингибирования при 10 мкМ. Преобразовывают значения IC_{50} для соединения в K_i , используя уравнение Ченга-Прусоффа. Результаты этого анализа показывают, что соединение примера 1 связывается с рекомбинантным РЭα дикого типа с K_i (нМ) $3,78 \pm 0,74$ ($n=3$) и связывается с мутантным РЭα (Y537S) с K_i (нМ) $21,24 \pm 2,12$ ($n=3$).

Результаты этого анализа демонстрируют аффинность связывания и эффективность приведенного в качестве примера соединения против РЭα дикого типа и мутантных белков (ESR1 Y537S).

Анализ разрушения РЭα в клетках MCF7.

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

Культивируют клетки MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 0,01 мг/мл человеческого инсулина 1 и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают в 384-луночные планшеты с плоским дном при плотности 4000 клеток на лунку в среде DMEM без фенолового красного (20 мкл), содержащей 10% очищенной углем FBS. Клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе для культивирования клеток (5% CO_2 , относительная влажность 95% и 37°C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 6 до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, и для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Промывают клетки один раз PBS (20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 ч. Промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2×), и блокируют 3% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 и 0,1% TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку), в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичное антитело (20 мкл) (РЭα (Клон SP1) моноклональное антитело кролика №RM-9101-S, Thermo Scientific) в разведении 1% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 на лунку, герметизируют планшеты и инкубируют в течение ночи при 4°C. На следующий день промывают клетки PBS, содержащим 0,05% TWEEN® 20 (2×), и инкубируют с вторичным антителом (20 мкл/лунку) (разведение 1:1000, козий антикроличий IgM ALEXA FLUOR™ 488) в PBS 1% BSA в течение 105 мин при комнатной температуре. После промывания планшетов PBS (2×20 мкл) добавляют PHКазу (Sigma) (20 мкл, 50 мкг/мл) и йодид пропидия, разведенный в PBS, 1:1000 на лунку (20 мкл). Герметизируют чашки и инкубируют 1 ч при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РЭα. Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют клетки, позитивные по рецептору эстрогена, по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % клеток, позитивных по рецептору эстрогена. IC_{50} определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Результаты этого анализа демонстрируют, что соединение формулы (I) представляет собой ССРЭ с сильной разрушающей активностью РЭα в клетках. В частности, результаты показывают сильное разрушение РЭα соединением примера 1 в клетках MCF7 рака груди. Используя этот анализ, относительное значение IC_{50} (мкМ) для соединения примера 1 составляет $2,16 \pm 0,96$ нМ ($n=15$).

Индукционный анализ РПα в клетках MCF7.

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

Культивируют MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 0,01 мг/мл человеческого инсулина 1 и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают клетки (до слияния на 70%) в 384-луночные планшеты с плоским дном с плотностью 4000 клеток на лунку в объеме 20 мкл в среде DMEM без фенолового красного, содержащей 10% FBS (очищенный углем). Клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе для культивирования клеток (5% CO_2 , относительная влажность 95% и 37°C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в

клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки с добавлением тестируемого соединения (5 мкл) из планшета для серийного разведения в планшет с клетками, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с конечной концентрацией в диапазоне доз тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, а для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37°C и 5% CO₂ течение 24 ч. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Промывают клетки один раз PBS (20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 ч. Дважды промывают клетки PBS (20 мкл), содержащим 0,05% TWEEN® 20, и блокируют 3% BSA в PBS, содержащем 0,05% TWEEN® 20 и 0,1% TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку), в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичное антитело (20 мкл) (моноклональные антитела рецептора прогестерона мыши к человеку, клон PgR 636 Dako, M3569) в разведении 1% BSA/PBS с 0,05 TWEEN® 20 на лунку, герметизируют планшеты и инкубируют в течение ночи при 4°C.

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

Используя этот анализ, относительная IC₅₀ (мкМ) соединения примера 1 составляет >2 мкМ. Результаты этого анализа не демонстрируют значительной агонистической активности примера 1 в отношении клеток MCF7 рака груди. Эти результаты также демонстрируют, что соединение примера 1 является чистым антагонистом РЭα в клетках MCF7 рака груди.

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

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

Культивируют MCF7-ESR1 Y537N-682 (сгенерированные редактированием гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон № 682) в среде DMEM с добавлением 10% FBS и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина и помещают клетки (до достижения 70% конфлюэнтности) в 384-луночные планшеты с плоским дном при плотности 4000 клеток на лунку в среде DMEM, не содержащей фенолового красного, 10% FBS (объем 20 мкл) (очищенный углем). Клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе для культивирования клеток (5% CO₂, относительная влажность 95% и 37°C) и позволяют клеткам прикрепиться к планшету. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений соединения (1:3) в диапазоне от 6 до 0,0003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 2 до 0,0001 мкМ. Для максимальной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, а для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч. Фиксируют клетки, добавляя 14% параформальдегид (10 мкл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Промывают клетки PBS (1×20 мкл) и инкубируют с PBS (20 мкл), содержащим 0,5% (об./об.) TWEEN® 20, в течение 1 ч. Промывают клетки PBS (2×20 мкл), 0,05% TWEEN® 20, и блокируют 3% BSA в PBS, 0,05% TWEEN® 20 и 0,1% TRITON™ X-100 (20 мкл/лунку), в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляют 1:500 первичное антитело (20 мкл) (моноклональное антитело рецептора прогестерона мыши к человеку, клон PgR 636 Dako, M3569) в разведении 1% BSA/PBS 0,05 TWEEN® 20 на лунку, герметизируют планшеты и инкубируют в течение ночи при 4°C.

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

Используя этот анализ, относительное значение IC_{50} (мкМ) для соединения примера 1 составляет $7,602 \pm 4,804$ нМ ($n=14$). Эти результаты демонстрируют сильное ингибирование РП α и функциональный антагонизм при помощи примера 1 в клетках MCF7 (ESR1 Y537N, гетерозиготный мутант) рака груди. Таким образом, соединение примера 1 является сильным антагонистом мутанта РЭ α (Y537N) и сильным ингибитором транскрипции, опосредованной РЭ α . РП α (PGR) также является мишенью транскрипции РЭ α , и результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование опосредованной РЭ α транскрипции РП α .

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

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

Выполняют условия анализа, как подробно описано в анализе Асумен разрушения РЭ α выше, используя клеточную линию MCF7, за исключением того, что перед распределением тестируемого соединения удаляют среду с планшета и предварительно обрабатывают все лунки, кроме лунок с негативным контролем (столбец 24 планшета), аналитической средой, содержащей 0,47 нМ эстрадиола, в течение 30 мин. В этом анализе проводят иммуноокрашивание для обнаружения РП α и сканирование планшетов с помощью ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный цитометр для микропланшетов, производимый TTP LABTECH LTD] для измерения РП α . Анализ изображений основан на клеточных флуоресцентных сигналах для идентификации позитивных клеток. Определяют клетки, позитивные по РП α , по средней интенсивности. Используют общую интенсивность 575-640 нм от йодида пропидия/ДНК для идентификации отдельных клеток. Результат анализа составляет % клеток, позитивных по РП α . IC_{50} определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Используя этот анализ, относительное значение IC_{50} (мкМ) для соединения примера 1 составляет $15,75 \pm 9,037$ нМ ($n=15$). Результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование РП α и функциональный антагонизм примером 1 в клетках MCF7 рака груди. Таким образом, соединение примера 1 является сильным антагонистом белка дикого типа РЭ α и сильным ингибитором транскрипции, опосредованной РЭ α . РП α (PGR) также является мишенью транскрипции РЭ α , и результаты этого анализа демонстрируют сильное ингибирование опосредованной РЭ α транскрипции РП α .

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

Целью следующих анализов пролиферации клеток обычно является определение того, оказывает ли тестируемое соединение влияние на пролиферацию клеток, жизнеспособность клеток и цитотоксичность в ответ на лечение в экспериментах с культурами клеток. За пролиферацией клеток следят, отслеживая количество клеток с течением времени, и используемый анализ йодида пропидия позволяет непрерывно измерять жизнеспособность клеток с течением времени.

Высевают клетки MCF7 (приобретенные у ATCC HTB-22) с плотностью 2000 клеток на лунку в среде DMEM, свободной от фенолового красного, 10% FBS (объем 20 мкл) (очищенный углем) в 384-луночный планшет для культивирования клеток с прозрачным дном. Помещают MCF7-ESR1 Y537N-682 (созданные путем редактирования гена CRISPR/Cas9 гена ESR1 в клетках MCF7, клон № 682) в среду DMEM с добавлением 10% FBS и 1% антибиотиков пенициллина/стрептомицина при плотности 1000 клеток на лунку. Инкубируют планшеты при 37°C и 5% CO₂. На следующий день вводят в клетки тестируемое соединение. Используют акустический дозатор Echo 555 для получения серийных разведений тестируемого соединения (1:3) в диапазоне от 60 до 0,003 мкМ. Дозируют клетки, добавляя 5 мкл из планшета для серийного разведения в планшет для клеток, получая конечную концентрацию DMSO 0,2% с диапазоном доз конечной концентрации тестируемого соединения от 20 до 0,001 мкМ. Для максималь-

ной точки используют среду, содержащую 0,2% DMSO, а для минимальной точки используют фулвестрант, разведенный до конечных концентраций 2 мкМ в среде для выращивания, содержащей 0,2% DMSO. После дозирования тестируемого соединения инкубируют планшеты с клетками при 37°C и 5% CO₂. Через семь дней после добавления тестируемого соединения вынимают планшеты из инкубатора и добавляют 96%-ный холодный этанол (65 мкл) в каждую лунку. Через 30 мин удаляют среду и добавляют РНКазу (20 мкл, 50 мкг/мл) (Sigma) и раствор йодида пропидия 1:1000 в PBS на лунку. Герметизируют чашки и инкубируют 1 ч при комнатной температуре на столе (в защищенном от света месте). Сканируют планшеты при помощи ACUMEN EXPLORER™ [лазерно-сканирующий флуоресцентный цитометр для планшетов, производимый TTP LABTECH LTD]. Клеточная линия MCF-7 растет, образуя агрегаты, количество клеток как количество объектов не может быть использовано для считывания; таким образом, количество клеток может быть оценено с помощью предполагаемого количества клеток (рассчитывается с помощью параметра площади (отношение общей площади к общей популяции клеток (заданный диапазон пиковой интенсивности FL-1 (ПИ) и средней площади отдельных популяций клеток (определяется по периметру))). IC₅₀ определяют путем аппроксимации кривой для логистического уравнения с четырьмя параметрами для каждого вывода с использованием GENE DATA™.

Используя этот анализ, относительная IC₅₀ (нМ) соединения примера 1 в MCF7 ESR1 дикого типа составляет 9,243±1,741 нМ (n=2), а в мутантных клетках MCF7-ESR1 Y537N составляет 7,960±3,691 нМ (n=6). Эти результаты демонстрируют сильную антипролиферативную активность и ингибирование роста клеток при помощи примера 1 в клетках MCF7 рака груди (ESR1 дикого типа) и MCF7 (мутант ESR1 Y537N).

Анализ целевого ингибирования In Vivo (ЦИ IV) (анализ PGR RT-qPCR) в опухолях MCF7.

Целью этого анализа ЦИ IV является измерение способности тестируемого соединения (ССРЭ) ингибировать экспрессию (транскрипцию) гена PGR (рецептора α-прогестерона) ниже РЭа в ксенотрансплантатных опухолях, имплантированных мышам.

Имплантируют самкам мышей NOD SCID (22-25 г) от Envigo RMS, Inc., Мэдисон, Висконсин подкожно 5×10⁶ РЭ-позитивные клетки MCF7 рака груди (ATCC, № HTB-22) в область правого фланга в 1:1 раствор HBSS + MATRIGEL™ (200 мкл). Имплантируют гранулы 17-β эстрадиола (0,18 мг/гранула, высвобождение 90 дней, от Innovative Research) подкожно за 1 день до имплантации опухолевых клеток. Измеряют рост опухоли и массу тела дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации. Когда размер опухоли достигнет 250-350 мм³, рандомизируют животных и группируют их в группы по пять животных. Вводят животным несколько доз тестируемого соединения в специфическом для тестируемого соединения растворителе (1% гидроксипропилцеллюлоза/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногаситель в очищенной воде) или только растворитель перорально в течение 3 дней и собирают опухоли и кровь через желаемые интервалы времени после последней дозы. Умерщвляют животных, используя анестезию изофлураном и вывих шейных позвонков. Быстро замораживают опухоли и хранят при -80°C до обработки для выделения РНК и анализа RT-qPCR. Собирают кровь в пробирки с EDTA, замедляют вращение для сбора плазмы и замораживают при -80°C в 96-луночном планшете. Определяют воздействие тестируемого соединения при помощи масс-спектрометрии.

Измельчают опухоли в жидком азоте и лизируют в буфере для лизиса 1×РНК (из наборов для выделения РНК) с использованием шариков Matrix D (MP Biomedical, № 6913-500) в клеточном дезинтеграторе FASTPREP-24 TM (MP Biomedical). Переносят лизаты опухолей в свежие пробирки после вращения при 14000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Выделяют РНК из опухолевых лизатов при помощи набора PURELINK® RNA Mini (Invitrogen № 12183018A) или RNeasy Mini Kit (Qiagen № 74104 и № 74106). Удаляют загрязнения ДНК при помощи набора PURELINK® DNase (Invitrogen № 12185010) или набора RNase-Free DNase (Qiagen № 79254). Измеряют концентрацию выделенной РНК, разбавив образцы водой, свободной от РНКазы, и измеряют поглощение при 260 нм на считывателе для планшетов (Spectra-Max190). Вычитают среднее измерение поглощения при 260 нм пустого опыта (только вода, не содержащая РНКазу) из измерений при 260 нм всех других образцов РНК. Разводят образцы РНК до равных концентраций в воде, свободной от РНКазы. Синтезируют кДНК из разбавленной РНК, используя систему синтеза первой цепи для RT-PCR (Invitrogen, № 18080-051). Для проведения RT-qPCR, сначала разбавляют кДНК в воде, свободной от РНКазы. Объединяют 2× Absolute Blue qPCR ROX Mix (Thermo, № AB-4139/A), праймер PGR (Thermo, Hs01556702_m1) и разведенную кДНК для каждой реакции в планшете для PCR (Applied Biosystems, № 4309849). Амплифицируют кДНК, инкубируя образцы в течение 2 мин при 50°C, а затем 15 мин при 95°C в термоциклере (севератор ABI Prism 7900HT). Продолжают инкубировать при 95°C в течение 15 с, а затем при 50°C в течение 60 с, всего 40 циклов. Циклы нормализованы по домашнему гену и используются для расчета % ингибирования PGR по сравнению с одним растворителем. Анализируют каждый образец в двух экземплярах и используют средние числа для расчетов. Рассчитывают целевой процент ингибирования (PGR) при помощи Excel и XL Fit.

Результаты этого анализа демонстрируют, что соединение примера 1 ингибирует экспрессию РПα (PGR) в модели ксенотрансплантатной опухоли. Кроме того, соединение примера 1 ингибирует экспрессию РПα (PGR) на 57% в модели ксенотрансплантатной опухоли в течение 24 ч с дозой 30 мг/кг

при пероральном введении. Эти результаты демонстрируют значительное и устойчивое ингибирование антагонистической активности РЭа и опосредованной РЭа транскрипционной активности *in vivo* на модели ксенотрансплантированной опухоли.

Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* в MCF7 ксенотрансплантированной опухоли, имплантированной мышам.

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

Размножают клетки MCF7 рака груди человека (ATCC № HTB-22) в культуре, собирают и вводят 5×10^6 клеток в растворе HBSS+MATRIGEL™ 1:1 (200 мкл) подкожно в задний правый бок самок мышей NOD SCID (22-25 г, Envigo RMS, Inc). За 24 ч до имплантации клеток MCF7 имплантируют гранулы эстрогена (0,18 мг/гранулу, 17β эстрадиол, 90-дневное высвобождение, Innovative Research) подкожно. Измеряют рост опухоли и массу тела дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации. Когда размер опухоли достигнет 250-350 мм³, рандомизируют животных и группируют их в группы по пять животных. Готовят тестируемое соединение в подходящем растворителе (1% гидроксиэтилцеллюлоза/0,25% TWEEN® 80/0,05% пеногасителя в очищенной воде) и вводят через желудочный зонд в течение 42 дней. Определяют ответ опухоли путем измерения объема опухоли два раза в неделю в течение курса лечения. При измерении объема опухоли в качестве общей меры токсичности принимают массу тела.

Было обнаружено, что при использовании в этом анализе соединение примера 1 имеет значения дельта Т/С%, как показано в таблице ниже. Эти результаты показывают, что соединение примера 1 демонстрирует хорошую пероральную биодоступность для мышей и значительную противоопухолевую активность или регрессию опухоли на MCF7 ксенотрансплантированной модели рака груди человека.

Исследование ингибирования роста опухоли *in vivo* в MCF7 ксенотрансплантированной опухоли, имплантированной мышам.

Модель опухоли	Доза (мг/кг)	График	Дельта Т/С% или % регрессии	р-значение
MCF7 (Ксенотрансплантат рака груди)	30	QD	-36	<0,001*

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

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

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

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

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

Анализ пероральной биодоступности у крыс.

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

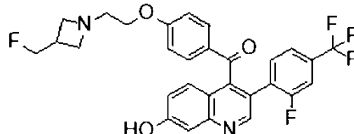
Испытываемое соединение вводят крысам линии Спрега-Доули внутривенно (ВВ) в количестве 1 мг/кг (с применением растворителей 20% CAPTISOL® в 25 мМ натрий-фосфатном буфере, достаточное количество для pH 2; или 25% DMA, 15% EtOH, 10% пропиленгликоля, 25% 2-пирролидона и 25% очищенной воды) и перорально (ПО) в количестве 10 мг/кг (с применением растворителя 1% гидроксиэтилцеллюлозы, 0,25% полисорбата 80, 0,05% пеногасителя 1510-US и достаточное количество очищенной воды). Серийные образцы крови отбирали через 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 12 ч после ВВ болюсного введения дозы и через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 12 ч после перорального введения дозы. После обработки коагулянтом EDTA плазму получали путем центрифугирования и хранили при -70°C до анализа путем ЖХ-МС/МС. Определяли концентрацию тестируемого соединения в плазме и загружали в систему Watson LIMSTM, где для расчета площади под кривой (ППК) для ВВ и ПО ветвей применяли некомпартментный анализ. Рассчитывают пероральную биодоступность (% F) при помощи следующего уравнения:

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

Используя этот анализ соединение примера 1 показывает значение % F - 27%. Этот анализ демонстрирует, что пример 1 обладает хорошей биодоступностью при пероральном введении.

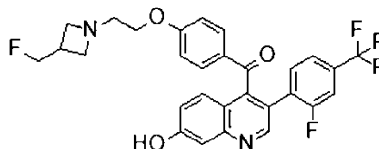
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что соединение представляет собой



3. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 или соединение по п.2 в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, носителями или разбавителями.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, дополнительно содержащая один или несколько дополнительных терапевтических агентов.

5. Способ лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или легких, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или соединения по п.2 пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что рак груди представляет собой позитивный по рецептору эстрогена (РЭ-позитивный) рак груди.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что рак желудка представляет собой РЭ-позитивный рак желудка.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что рак легких представляет собой РЭ-позитивный рак легких.

10. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или соединения по п.2 для лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что соединение вводят перорально.

12. Применение по п.10, отличающееся тем, что рак груди представляет собой РЭ-позитивный рак груди.

13. Применение по п.10, отличающееся тем, что рак желудка представляет собой РЭ-позитивный рак желудка.

14. Применение по п.10, отличающееся тем, что рак легких представляет собой РЭ-позитивный рак легких.

15. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или соединения по п.2 для производства лекарственного средства для лечения рака груди, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака матки, рака желудка или рака легких.

16. Применение по п.15, отличающееся тем, что лекарственное средство предназначено для перорального введения.

17. Способ получения 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ола, включающий охлаждение раствора (4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил){3-[2-фтор-4-(трифторметил)фенил]-7-гидроксихинолин-4-ил}метанона в 1,4-диоксане до около 5°C с последующим добавлением триэтилборгидрида лития для получения спирта, растворение спирта в тетрагидрофуране, добавление гидрида натрия и нагревание полученной смеси с обратным холодильником с получением указанного соединения.

18. Фармацевтическая композиция по п.4, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой 5-(4-{2-[3-(фторметил)азетидин-1-ил]этокси}фенил)-8-(трифторметил)-5Н-[1]бензопирано[4,3-с]хинолин-2-ол.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2