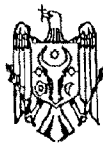




MD/EP 3820873 T2 2023.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3820873 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 491/052 (2006.01.01)  
A61K 31/436 (2006.01.01)  
A61P 35/00 (2006.01.01)

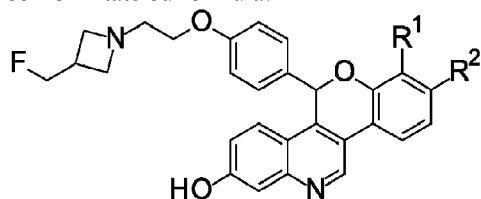
(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2021 0462</p> <p>(22) Data de depozit: 2019.07.11</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19745925.8, 2019.07.11</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3820873, 2021.05.19</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201862697100 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.07.12</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2023, 2023.05.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 47/2022, 2022.11.23</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30</p>
<p>(71) Solicitant): ELI LILLY AND COMPANY, US</p> <p>(72) Inventatori: BASTIAN Jolie Anne, US; COHEN Jeffrey Daniel, US; RUBIO Almudena, US; SALL Daniel Jon, US; MCMAHON Jennifer Anne, US</p> <p>(73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>	

(54) Degradanți selectivi ai receptorului estrogen

(57) Rezumat:

1  
Sunt furnizați noi degradanți selectivi ai receptorului estrogen (SERD-uri) în conformitate cu formula:



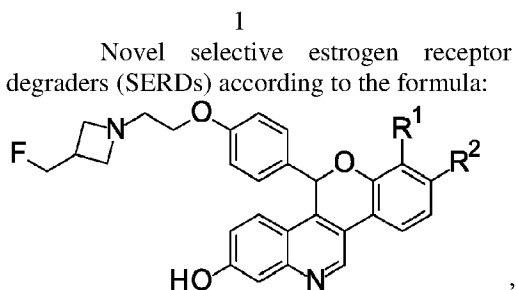
2  
săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, și compoziții farmaceutice ale acestora, în care fie R1 sau fie R2 este selectat independent dintre Cl, F, -CF3, sau -CH3, și celălalt este hidrogen, și metode pentru utilizarea acestora.

Revendicări: 16

MD/EP 3820873 T2 2023.05.31

**(54) Selective estrogen receptor degraders****(57) Abstract:**

Novel selective estrogen receptor degraders (SERDs) according to the formula:



pharmaceutically acceptable salts thereof, and pharmaceutical compositions thereof, wherein

either R1 or R2 is independently selected from Cl, F, -CF<sub>3</sub>, or -CH<sub>3</sub>, and the other is hydrogen, and methods for their use are provided.

Claims: 16

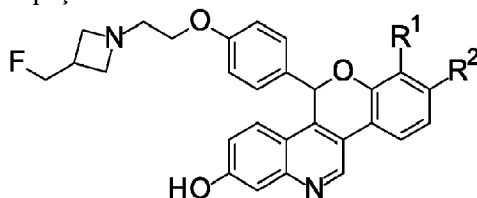
**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****Fundal**

5 Degradanții selectivi ai receptorului estrogen (SERD-uri) se leagă la receptorul estrogen (ER) și subreglează activitatea transcripțională mediată de ER. Aceste degradări și subreglări determinate de SERD-uri pot fi utile în tratamentul tulburărilor de proliferare celulară, cum ar fi cancerul.

Unele exemple micromoleculare de SERD-uri au fost divulgate în literatură (vezi, de exemplu, WO2005073204, WO2014205136, și WO2016097071). Totuși, SERD-urile cunoscute nu au fost încă atât de utile pe cât este necesar pentru a trata eficient cancerul. De exemplu, descoperirea SERD-urilor cu proprietăți farmacocinetice (PK) și farmacodinamice (PD) mai bune, cu eficiență mai ridicată în clinică, și o bună biodisponibilitate orală ar fi de mare ajutor în tratarea cancerului. Un SERD antagonist pur cu inhibare potentă a transcripției mediate de ER ar fi în mod special benefic în tratarea cancerului. Există o necesitate pentru noi SERD-uri pentru tratarea cancerelor cum ar fi cancerul la sân, cancerul ovarian, cancerul endometrial, cancerul la prostată, cancerul uterin, cancerul gastric, și cancerul pulmonar precum și mutațiile din cauza rezistenței în curs de dezvoltare. În particular există o necesitate pentru noi SERD-uri pentru a trata cancerul la sân, cancerul gastric, și/sau cancerul pulmonar pozitive ER.

**Rezumat**

Sunt furnizați aici compuși cu formula:



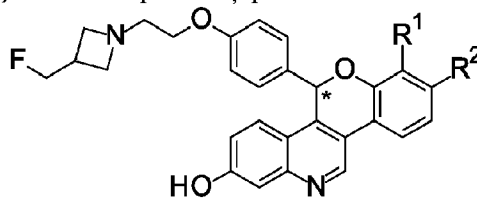
20 și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, și compoziții farmaceutice ale acestora. În această formulă fie R<sup>1</sup> sau fie R<sup>2</sup> este selectat în mod independent dintre Cl, F, -CF<sub>3</sub>, sau -CH<sub>3</sub>, și celălalt este hidrogen.

Sunt furnizați în plus compusul cum s-a descris aici, și săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia, pentru utilizare în terapie. Compușii descriși aici, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi utilizați în tratamentul cancerului la sân, cancerului ovarian, cancerului endometrial, cancerului la prostată, cancerului uterin, cancerului gastric, sau cancerului pulmonar.

**Descriere detaliată**

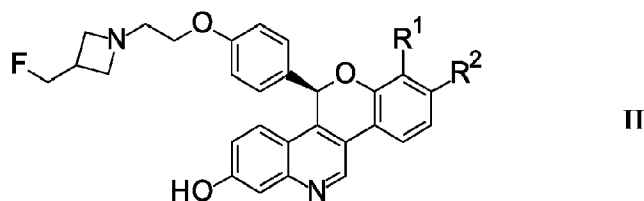
Sunt divulgați aici noi compuși tetraciclici și săruri farmaceutice ale acestora care acționează ca SERD-uri. Nou inventatele SERD-uri care sunt descrise aici asigură inhibarea transcripției mediate de ER, și vor fi utile în tratarea cancerelor cum ar fi cancerul la sân, cancerul ovarian, cancerul endometrial, cancerul la prostată, cancerul uterin, cancerul gastric, și cancerul pulmonar precum și mutațiile din cauza rezistenței în curs de dezvoltare. Aceste SERD-uri pot fi utilizate fie ca agenți singuri sau fie în combinație cu alte clase de medicamente incluzând modulatori selectivi de receptori estrogeni (SERM-uri), inhibitori de aromatază, inhibitori CDK4, inhibitori CDK6, inhibitori ai PI3K, și inhibitori mTOR pentru a trata cancerule pozitive la receptorul hormonal cum ar fi cancerul la sân, cancerul gastric, și/sau cancerul pulmonar.

Noii compuși descriși aici sunt reprezentați prin Formula I:

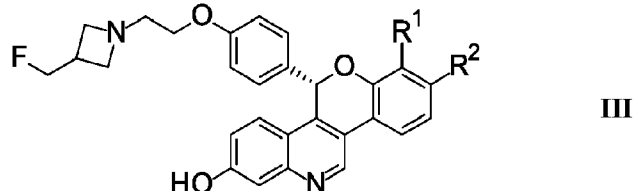
**I**

40 și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, în care fie R<sup>1</sup> sau fie R<sup>2</sup> este selectat în mod independent dintre Cl, F, -CF<sub>3</sub>, sau -CH<sub>3</sub>, și celălalt este hidrogen. O persoană calificată în domeniu va aprecia că compușii cum au fost descriși prin Formula I, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, conțin un centru chiral, a cărui poziție este indicată printr-un \* mai sus. O persoană calificată în domeniu va aprecia de asemenea că denumirile Cahn-Ingold-Prelog (R) sau (S) pentru centrii chirali vor varia depinzând de tiparele de substituție din jurul unui centru chiral. Centrul chiral în compusul cu Formula I furnizează o

45 formă R-enantiomerică prezentată prin Formula II:

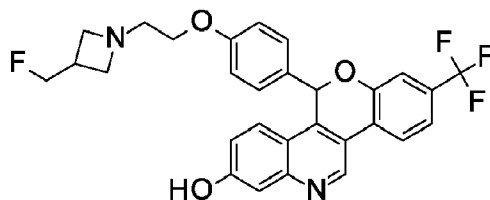


Și o formă S-enantiomerică prezentată prin Formula III:

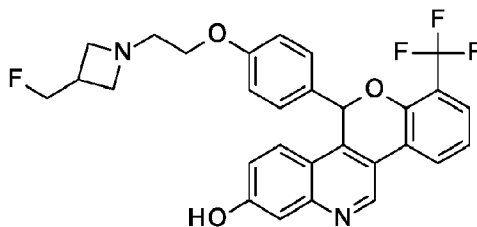


5 Toți stereoizomerii, enantiomerii, și diastereomerii individuali, precum și amestecurile de enantiomeri și diastereomeri ai compușilor în conformitate cu Formula I, Formula II, și Formula III incluzând racemații sunt incluși în domeniul compușilor descriși aici. Compușii pentru utilizare farmaceutică care conțin centri chirali sunt adesea izolați ca enantiomeri sau diastereomeri singuri și astfel de compuși izolați cu Formula I, Formula II, și Formula III sunt incluși în domeniul compușilor divulgați aici. O persoană calificată în domeniu va aprecia de asemenea că compușii cu Formula I, 10 Formula II, și Formula III descriși aici, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, poate fi deuterati (unde un hidrogen poate fi înlocuit cu un deuteriu) și astfel de molecule sunt considerate a fi incluse în domeniul compușilor divulgați aici.

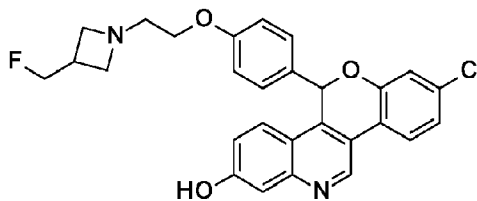
Sunt prezentate aici exemple specifice ale compușilor cu Formula I (incluzând numele din nomenclatorul IUPAC):



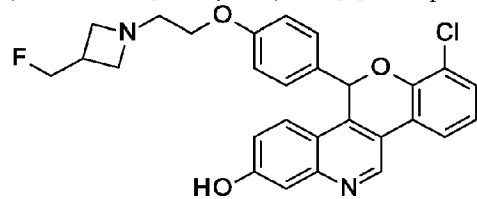
15 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3 -c]chinolin-2-ol;



20 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3 -c]chinolin-2-ol;



8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol;

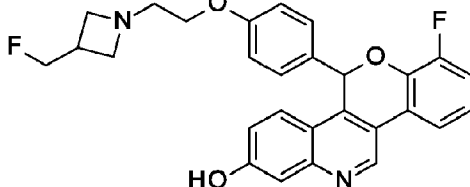


7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol;

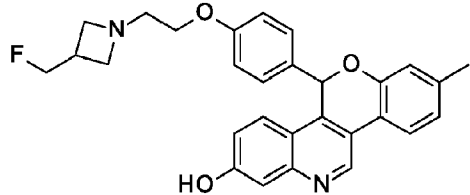
5



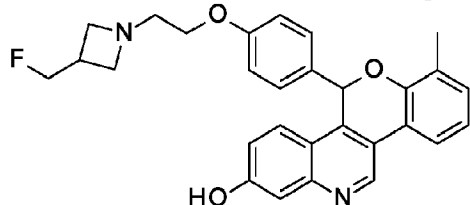
8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol;



7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol;



5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol; și



5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol.

10

Din cauza centrului chiral observat mai sus, fiecare din aceste exemple specifice ale compușilor cu Formula I prezentate mai sus au forme enantiomerice R și S (adică, compuși R-enantiomerici cu Formula II și compuși S-enantiomerici cu Formula III) așa cum se arată în Tabelul 1.

**Tabelul 1: Forme enantiomerice compușilor cu Formula I**

Denumire chimică	R-enantiomer (Formula II)	S-enantiomer (Formula III)
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]		

Denumire chimică	R-enantiomer (Formula II)	S-enantiomer (Formula III)
benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1] benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1] benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-metil-5H-[1] benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1] benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol		

Sunt de asemenea descrise aici compoziții farmaceutice incluzând compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, în combinație cu un excipient acceptabil farmaceutic, purtător, sau diluant. Compozițiile farmaceutice descrise aici pot fi preparate utilizând aditivi acceptabili farmaceutic. Termenul „aditiv acceptabil farmaceutic” așa cum s-a utilizat în acest document, se referă la unul sau mai mulți purtători, diluanți, și excipienți care sunt compatibili cu alți aditivi ai compozițiilor sau formulări și nu sunt dăunători pacientului. Compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, descriși aici pot fi formulați ca compoziții farmaceutice administrate pe o varietate de căi, cum ar fi oral sau IV. Biodisponibilitatea este adesea un factor în tratamentul cancerului și abilitatea de a alege metodele de administrare și compozițiile farmaceutice pentru a controla sau optimiza biodisponibilitatea unui ingredient activ este utilă. De exemplu, ar fi în special utilă o compoziție SERD cu biodisponibilitate orală. Se crede că compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, cum s-a descris aici, au biodisponibilitate orală. Exemple de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea lor pot fi găsite în „Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, L. V. Allen Jr, Editor, ed. a 22-a, Mack Publishing Co., 2012. Exemple nelimitative de purtători acceptabili farmaceutic, diluanți, și excipienți includ următoarele: soluție salină, apă, amidon, zaharuri, manitol, și derivați de siliciu; agenți de legare cum ar fi carboximetil celuloza și alți derivați de celuloză, algiinați, gelatină, și polivinilpirolidonă; caolin și bentonită; și polietil glicoli.

De asemenea sunt descriși aici compuși cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, pentru utilizare în terapie. De asemenea sunt furnizați aici compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pentru utilizare în tratamentul cancerului la sân, cancerului ovarian, cancerului endometrial, cancerului la prostată, cancerului uterin, cancerului gastric, sau cancerului pulmonar. În particular cancerul la sân poate fi cancer la sân pozitiv ER, cancer gastric pozitiv ER, sau cancer

pulmonar pozitiv ER. De exemplu, compusul cu Formula I, Formula II, și Formula III, sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi administrat oral.

Compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot avea utilitate clinică ca un singur agent sau în combinație cu unul sau mai mulți alți agenți terapeutici (de exemplu, agenți anti-cancer), pentru tratamentul cancerelor cum ar fi cancerul la sân, cancerul ovarian, cancerul endometrial, cancerul la prostată, cancerul uterin, cancerul gastric, sau cancerul pulmonar. Când s-au utilizat în combinație cu alți agenți terapeutici (cum ar fi agenți anti-cancer), compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi utilizați simultan, secvențial, sau separat cu alți agenți terapeutici. Exemple de clase de medicamente cu care compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi combinate, includ SERM-uri, inhibitori de aromatază, inhibitori CDK4, inhibitori CDK6, inhibitori ai PI3K, și inhibitori mTOR pentru a trata cancerul la sân pozitiv la receptorul hormonal. Exemple mai specifice de medicamente cu care compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi combinați includ, abemaciclib (inhibitor CDK4/6), everolimus (inhibitor mTOR), alpelisib (inhibitor PIK3CA), și 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]chinolin-2-onă (inhibitor PI3K/mTOR).

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „cantitate eficientă” se referă la cantitatea sau doza dintr-un compus cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, care, după o singură sau multiple doze administrate pacientului, furnizează efectul dorit la pacientul sub diagnostic sau tratament. Preferabil, un efect dorit este inhibarea proliferării celulelor tumorale, moartea celulei tumorale, sau ambele. Compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, sunt în general eficienți pe un interval larg de dozare. De exemplu, dozajele pe zi, se încadrează în mod normal în intervalul zilnic de la aproximativ 100 mg până la aproximativ 2000 mg.

Așa cum s-a utilizat în acest document, „tratează”, „tratare” sau „tratament” se referă la restrângerea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom sau tulburări existente.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „pacient” se referă la un om care este afectat de o anumită boală, tulburare, sau afecțiune.

Compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi preparați printr-o varietate de proceduri cunoscute în domeniu, dintre care unele sunt ilustrate în Preparările și Exemplele de mai jos. Etapele de sinteză specifice pentru fiecare din căile descrise pot fi combinate în diferite moduri, sau în conjuncție cu etape din diferite proceduri, pentru a prepara compuși cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora. Produsele pot fi recuperate prin metode convenționale bine cunoscute în domeniu, incluzând extragere, evaporare, precipitare, cromatografie, filtrare, triturare, și cristalizare. Reactivii și materiile prime sunt cu ușurință disponibile cuiva având calificare obișnuită în domeniu.

Intermediarii și procedeele utile pentru sinteza compușilor cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, intenționează să fie incluse în această descriere. Suplimentar, anumiți intermediari descriși aici pot conține una sau mai multe grupări de protecție. Gruparea de protecție variabilă poate fi identică sau diferită la fiecare apariție depinzând de condițiile de reacție particulare și transformările particulare ce urmează a fi efectuate. Condițiile de protejare și deprotejare sunt bine cunoscute specialistului calificat și sunt descrise în literatură (vezi de exemplu „Greene's Protective Groups in Organic Synthesis”, ediția a patra, de Peter G.M. Wuts și Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc. 2007).

Izomerii, enantiomerii, și diastereomerii individuali pot fi separați sau redizolvați de către cineva având calificare obișnuită în domeniu în orice punct convenabil din sinteza compușilor cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici, prin metode cum ar fi tehnici de cristalizare selective sau cromatografie chirală (vezi de exemplu, J. Jacques, și colab., „Enantiomers, Racemats, and Resolutions”, John Wiley & Sons, Inc., 1981, și E.L. Eliel și S.H. Wilen, „Stereochemistry of Organic Compounds”, Wiley-Interscience, 1994). În timp ce izomerii, enantiomerii, și diastereomerii individuali pot fi separați sau redizolvați cum s-a notat, denumirile lor Cahn-Ingold-Prelog (R) sau (S) pentru centri chirali poate nu au fost încă determinate. Unde denumirile Cahn-Ingold-Prelog (R) sau (S) nu sunt disponibile, sunt utilizați identificatorii „izomer 1” și „izomer 2” și sunt combinați cu denumirea IUPAC fără denumirea stereochemică Cahn-Ingold-Prelog. Compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III care sunt identificați ca „izomer 1” sau „izomer 2” aici, sunt izolați cum s-a definit în descrierile experimentale specifice de mai jos. Dacă un izomer este un „1” sau un „2”, se referă la ordinea în care compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III eluează dintr-o coloană de cromatografie chirală, în condițiile

listate, adică, un „izomer 1” este primul care eluează din coloană sub condițiile listate. Dacă cromatografia chirală este inițiată devreme în sinteză, aceeași denumire este aplicată intermediarilor și compușilor ulteriori cu Formula I, Formula II, și Formula III.

În afară de cazul când se menționează specific, abrevierile utilizate aici sunt definite în conformitate cu Aldrichimica Acta, Vol. 17, nr. 1, 1984. Alte abrevieri sunt definite după cum urmează:

5 „ACN” se referă la acetonitril; „BSA” se referă la albumină din ser bovin; „cataCXium® A Pd G3” se referă la metansulfonat de [(di(1-adamantil)-butilfosfină)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladiu(II); „DCM” se referă la diclorometan sau clorură de metilen; „DMA” se referă la dimetilacetamidă; „DMEA” se referă la dimetiletilamină; „DMEM” se referă la mediu Eagle modificat, de la Dulbecco; „DMF” se referă la N,N-dimetilformamidă; „DMSO” se referă la dimetil sulfoxid; „ADN” se referă la acid deoxiribonucleic; „ADNc” se referă la ADN complementar; „DNază” se referă la deoxiribonuclează; „DTT” se referă la ditiotreitol; „EC<sub>50</sub>” se referă la concentrația dintr-un agent care produce un răspuns de 50% al activității țintei în comparație cu un compus predefinit de control pozitiv (EC<sub>50</sub> absolut); „EDTA” se referă la acid etilendiaminotetraacetic; „ee” se referă la exces enantiomeric; „ER $\alpha$ ” se referă la receptor estrogen alfa; „ER $\beta$ ” se referă la receptor estrogen beta; „EtOAc” se referă la acetat de etil; „EtOH” se referă la etanol sau alcool etilic; „FBS” se referă la ser fetal bovin; „HBSS” se referă la soluție salină echilibrată Hank; „HEC” se referă la hidroxietil celuloză; „HEPES” se referă la acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfonic; „HPLC” se referă la cromatografie de lichide de înaltă performanță; „IC<sub>50</sub>” se referă la concentrația dintr-un agent care produce 50% din răspunsul inhibitor maxim posibil pentru acel agent, (IC<sub>50</sub> relativă), sau concentrația dintr-un agent care produce o inhibare de 50% a activității enzimei țintă în comparație cu controlul cu placebo (IC<sub>50</sub> absolută); „IPA” se referă la izopropilamină; „iPrOH” se referă la izopropanol sau alcool izopropilic; „IV” se referă la administrare intravenoasă; „K<sub>i</sub>” se referă la constanta de inhibare; „MEK” se referă la metil etil cetonă; „MeOH” se referă la metil alcool sau metanol; „MTBE” se referă la metil *t*-butil eter; „PBS” se referă la soluție salină tamponată cu fosfat; „PO” se referă la administrare orală; „PR $\alpha$ ” se referă la receptor progesteron alfa; „QD” se referă la o dozare o dată pe zi; „ARN” se referă la acid ribonucleic; „RNază” se referă la ribonuclează; „RT-PCR” se referă la reacție în lanț a polimerazei cu transcripție inversă; „RT-qPCR” se referă la reacție cantitativă în lanț a polimerazei cu transcripție inversă; „SFC” se referă la cromatografie în fluid supercritic; „TED<sub>50</sub>” se referă la doza eficientă pentru a obține o inhibare de 50% a țintei în tumori; „THF” se referă la tetrahidrofuran; „t<sub>(R)</sub>” se referă la timp de retenție; „XantPhos Pd G2” se referă la cloro[(4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanten)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)] paladiu(II); și „XPhos Pd G2” se referă la cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triizopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladiu(II).

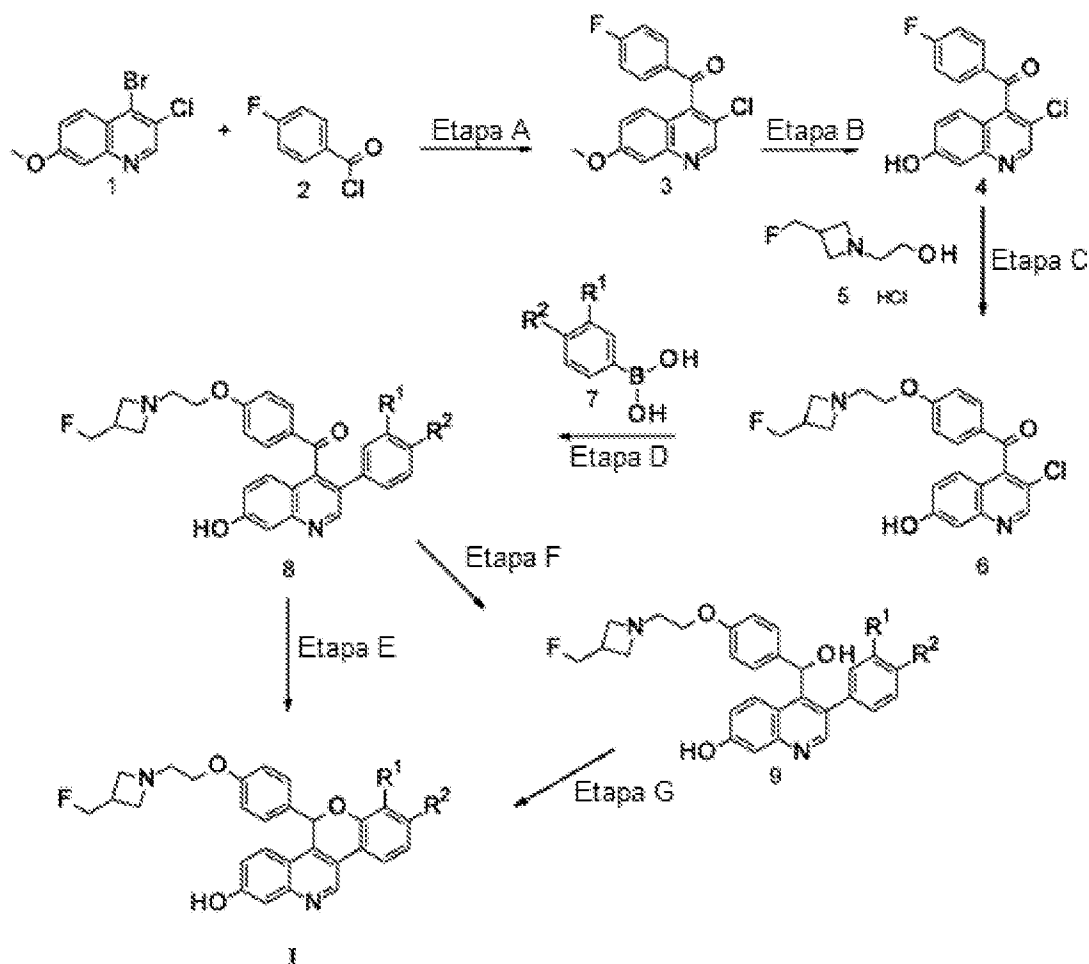
10  
15  
20  
25  
30

Următoarele preparări și exemple ilustrează suplimentar invenția.

#### Preparări și Exemple

35

Schema 1



Schemă 1 ilustrează sinteza compuşilor cu Formula I.

În Etapa A, este realizată o reacție Grignard. O reacție Grignard este bine cunoscută în domeniu ca reacție pentru formarea legăturilor carbon-carbon. Reacția implică o reacție organometalică în care o halogenură de aril magneziu, reactivul Grignard se adaugă la o grupare carbonil cum ar fi clorura acidă a compusului 2 pentru a da compusul din Etapa A. De exemplu, o chinolonă 4-cloro-substituită, compusul 1, este tratată cu un reactiv Grignard cum ar fi izopropilclorura de magneziu pentru a forma un intermediar Grignard urmată de adăugarea unei cloruri acide, clorură de 4-fluorobenzoil, compusul 2, într-un solvent cum ar fi THF. La terminare, reacția poate fi stinsă cu apă pentru a da compusul 3.

În Etapa B, aril metil eterul compusului 3 poate fi demetilată sub o varietate de condiții recunoscute de către specialistul calificat cum ar fi tratamentul cu tribromură de bor. De exemplu, compusul 3 este tratat încet cu tribromură de bor la o temperatură de aproximativ 0°C într-un solvent cum ar fi DCM. Amestecul este agitat la temperatura camerei și stins cu fosfat de potasiu dibazic pentru a da compusul 4.

În Etapa C, eterul de azetidină 6 poate fi format prin tratamentul p-fluorofenil cetonei corespunzătoare 4 și sării de alcool de azetidină 5, sau bazei libere corespunzătoare cu o bază adecvată, de exemplu hidrură de sodiu, *t*-butoxid de sodiu sau *t*-butoxid de potasiu, în solventul aprotic polar adecvat cum ar fi DMF sau THF pentru a da compusul eter 6.

Compusul 6 este apoi alchilat cu acid aril boronic substituit adecvat, compusul 7, într-o reacție de cuplare încrucișată Suzuki pentru a da compusul 8 în Etapa D. Specialistul calificat va recunoaște că există o varietate de condiții care pot fi utile pentru a facilita astfel de reacții de cuplare încrucișate. Reactivii de paladiu adecvați pot include XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, clorură de bis(trifenilfosfin)paladiu(II), tris(dibenzilidenacetone)dipaladiu (0) cu triciclohexilfosfină, clorură de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferocen)paladiu(II), tetrakis(trifenilfosfină) de paladiu, sau acetat de paladiu(II). Bazele adecvate pot include fluorură de potasiu, carbonat de cesiu, carbonat de sodiu, carbonat de potasiu, *t*-butoxid de litiu, sau monohidrat tribazic de fosfat de potasiu. Compusul 6, de exemplu, poate fi reacționat cu acidul boronic adecvat, compusul 7, cum ar fi acidul 2-fluoro-4-(trifluorometil)fenilboronic într-un

solvent cum ar fi 2-metil-2-butanol cu o bază cum ar fi carbonatul de potasiu și un catalizator cum ar fi XPhos Pd G2 și încălzit la aproximativ 80°C în condiții de microunde pentru a da compusul 8.

O persoană calificată în domeniu va recunoaște că Etapa D, reacția de cuplare încrucișată Suzuki, ar putea fi completată înainte de formarea eterului de azetidină în Etapa C.

5 În Etapa E, o persoană calificată în domeniu va recunoaște că compusul 8 poate fi ciclizat prin reducerea inițială a cetonei. Aceasta poate fi realizată utilizând un agent reducător, cum ar fi trietil borohidruură de litiu în solvenți cum ar fi 1,4-dioxan și THF și la o temperatură de aproximativ 0°C la temperatura camerei pentru a da alcoolul secundar corespunzător. Acest alcool intermediar poate fi transportat pe brut și poate fi deprotonat cu o bază adecvată cum ar fi carbonat de cesiu, hidruură de sodiu, *t*-butoxid de sodiu sau *t*-butoxid de potasiu într-un solvent cum ar fi THF, DMSO, sau DMF. Alcoolul rezultat poate cicliza în fluorură de aril la temperatura camerei, cu încălzire la reflux, sau la o temperatură de aproximativ 60°C. Eterul ciclic substituit format după deplasarea fluorurii poate fi apoi obținut pentru a da compuși cu Formula I.

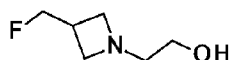
15 Alternativ, cetona 8, poate fi redusă la alcool și purificată chiral în Etapa F pentru a da alcoolul chiral 9, și apoi ciclizat în Etapa G cum s-a descris mai sus pentru Etapa E pentru a da compuși cu Formula I.

20 Într-o altă reacție alternativă, cetona poate fi redusă utilizând un reactiv chiral cum ar fi (R)-(+)- $\alpha$ - $\alpha$ -difenil-2-pirolidinemetanol împreună cu trimetil borat și boran-dimetilsulfură pentru a da direct alcoolul chiral dorit, compusul 9, care poate fi apoi ciclizat în Etapa G cum s-a descris mai sus pentru Etapa E pentru a da compuși cu Formula I.

25 Într-o etapă opțională, o sare acceptabilă farmaceutic dintr-un compus cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici poate fi formată prin reacția unei baze libere adecvate dintr-un compus cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici cu un acid adecvat acceptabil farmaceutic într-un solvent adecvat sub condiții standard. Suplimentar, formarea de astfel de săruri poate avea loc simultan după deprotejarea unei grupări de protecție azot. Posibila formare de săruri acceptabile farmaceutic este bine cunoscută. *Vezi, de exemplu*, Gould, P.L., „Salt selection for basic drugs”, International Journal of FPhrmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., și colab. „Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities”, Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); și Berge, S.M., și colab., „Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977). Cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că un compus cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici este cu ușurință convertit la, și poate fi izolat ca, sare acceptabilă farmaceutic. Exemple de săruri utile includ, dar nu sunt limitate la, săruri de acid benzensulfonic și săruri de acid 4-metilbenzensulfonic. Sărurile de acid 4-metilbenzensulfonic sunt cunoscute de asemenea ca săruri tosilat.

### 35 Preparare 1

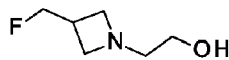
#### 2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etan-1-ol



40 Se adaugă triacetoxiborohidruură de sodiu (405 g, 1,91 mol) în porții într-o perioadă de 15 minute la o soluție agitată la 0°C de clorhidrat de 3-(fluorometil)azetidină (160 g, 1,28 mol) în DCM (2,4 L) sub N<sub>2</sub> și se agită la 0°C timp de 10 minute. Se adaugă 1,4-dioxan-2,5-diol (99 g, 0,83 mol) la 0°C în 6 porții într-o perioadă de 1 oră apoi se agită la 0-5°C timp de 15 minute. Se lasă reacția să se încălzească la temperatura camerei și se agită timp de 2 ore sub N<sub>2</sub>. Se răcește reacția până la 10-15°C într-o perioadă de 20 minute, apoi se încălzește la 25-30°C și se menține la această temperatură timp de 2 ore. Se adaugă apă (800 mL) într-o perioadă de 25-30 minute la 10-15°C, se lasă să se încălzească la temperatura camerei timp de 5-10 minute și apoi se separă straturile. Se spală stratul apos cu DCM (800 mL), se separă straturile apoi se răcesc straturile apoase combinate până la 10-15°C și se ajustează pH-ul la 13-14 utilizând 50% soluție de hidroxid de sodiu (~540 mL). Se lasă stratul apos să se încălzească la temperatura camerei, se extrage cu DCM (4 X 800 mL), se usucă cu sulfat de sodiu (80 g), se filtrează, și se concentrează la sec pentru a obține compusul din titlu (139 g, 82%) ca ulei gros galben. ES/MS (m/z): 134,1(M+H).

### 50 Preparare 2

#### 2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etan-1-olidroclorhidrat



55

HCl

Se dizolvă 2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etan-1-ol (529 g, 4 mol) în MTBE (2,6 L) și se răcește la 0°C. Se adaugă soluție de HCl/EtOH (492 mL, 30g%) în picătură în 30 minute apoi se agită la 0°C timp de 30 minute. Se filtrează solidele și se spală turta de filtru cu MTBE (2 X 200 mL). Se usucă sub N<sub>2</sub> timp de 8 ore pentru a obține compusul din titlu (580 g, 86%) ca solid alb. ES/MS (m/z): 134,0 (M+H).

### Preparare 3

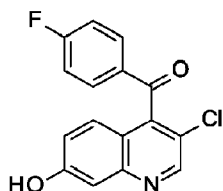
#### (3-Cloro-7-metoxichinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanonă



Se răcește un amestec de 4-bromo-3-cloro-7-metoxichinolină (70 g, 254 mmol) și THF (1 L) to -40 °C sub N<sub>2</sub> conducând la precipitarea materialului. Se adaugă izopropilclorură de magneziu (2 M în THF, 254 mL, 509 mmol) timp de 20 minute și se agită amestecul timp de 1 oră. Se adaugă o soluție de clorură de 4-fluorobenzoil (66 mL, 559 mmol) în THF (140 mL) în picătură apoi se lasă să se încălzească la temperatura camerei. Se stinge reacția cu soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl (300 mL) și apă (200 mL) și se separă straturile. Se spală stratul organic cu soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl (300 mL), se usucă pe MgSO<sub>4</sub>, se filtrează, și se concentrează pentru a furniza un reziduu oleos. Se filtrează uleiul maro brut prin gel de siliciu eluând cu un amestec de MTBE/hexani (1:1) pentru a obține produsul brut ca solid galben (84 g). Se tratează solidul cu 10% metilacetat/heptan (800 mL) și se agită la temperatura camerei peste noapte. Se filtrează pentru a colecta solidele și a le rezerva. Se concentrează filtratul și se purifică pe gel de siliciu eluând cu 10-40% EtOAc/hexani apoi se tratează produsul cu 10% metilacetat/heptan (200 mL) și se agită la temperatura camerei timp de 3 ore. Se filtrează solidele rezultate, se combină cu solidele din filtrarea anterioară și se usucă sub vid peste noapte pentru a obține compusul din titlu (31 g, 38%) ca solid galben. ES/MS (m/z): 316,0 (M+H).

### Preparare 4

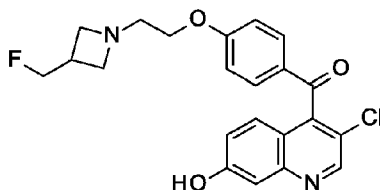
#### (3-Cloro-7-hidroxicinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanonă



Se adaugă tribromură de bor (1 M în DCM, 295 mL, 295 mmol) la un amestec de (3-cloro-7-metoxichinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanonă (31 g, 98 mmol) în DCM (217 mL) și se agită amestecul la temperatura camerei timp de 3 zile. Se toarnă încet amestecul într-o soluție de fosfat de potasiu dibazic (2 M în apă, 700 mL) și apă (200 mL). Se lasă amestecul să se încălzească la temperatura camerei și se agită timp de 1 oră. Se concentrează soluția în vid pentru a îndepărta solvenții organici, se filtrează, se colectează filtratul și se usucă filtratul sub vid la 45°C peste noapte. Se tratează solidele cu DCM/heptan (1:1, 450 mL) și se agită peste noapte. Se colectează solidele și se usucă sub vid peste noapte pentru a obține compusul din titlu (32 g, randament cantitativ) ca solid maro deschis. ES/MS (m/z): 302,0 (M+H).

### Preparare 5

#### (3-Cloro-7-hidroxicinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil) metanonă

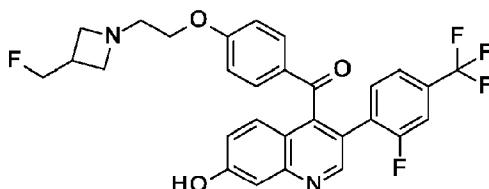


Se adaugă clorhidrat de 2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etan-1-ol (3,90 g, 23,0 mmol) la o soluție agitată de (3-cloro-7-hidroxicinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanonă (5,00 g, 15,3 mmol) în DMF (75 mL) urmat de hidrură de sodiu (60% în ulei mineral, 3,02 g, 76,8 mmol). Se agită sub N<sub>2</sub> și se încălzește la 40°C timp de 45 minute. Se stinge soluția cu apă și se concentrează. Se parționează reziduu între 20%

iPrOH/CHCl<sub>3</sub> și soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu și se separă, se extrage soluția apoasă cu 2 x 20% iPrOH/CHCl<sub>3</sub>, se combină extractele organice, se usucă straturile organice combinate pe sulfat de magneziu, se filtrează și se concentrează filtratul pentru a obține produsul brut ca ulei roșu închis. Se purifică materialul brut prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu eluând cu un gradient de 5-10% 7 N NH<sub>3</sub> în MeOH/DCM pentru a da compusul din titlu (5,31 g, 84%) ca solid galben. ES/MS (m/z): 415,0 (M+H).

#### Preparare 6

**(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxicinolin-4-il}metanonă**

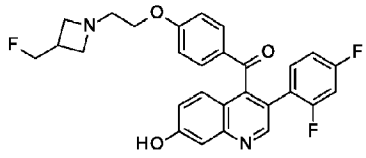
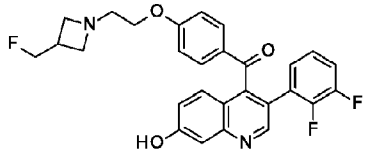
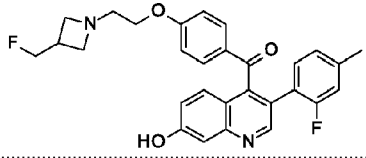
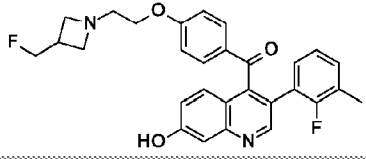


Se degazează cu N<sub>2</sub> (5x) un amestec de (3-cloro-7-hidroxicinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)metanonă (200 mg, 0,48 mmol), acid 2-fluoro-4-(trifluorometil)fenilboronic (158 mg, 0,72 mmol), carbonat de potasiu (202 mg, 1,45 mmol), 2-metil-2-butanol (3 ml), și apă (1 ml) într-un flacon pentru microunde. Se adaugă XPhos Pd G2 (12 mg, 0,015 mmol), se etanșează și se încălzește la microunde la 80°C timp de 2 ore. Se porționează rezidulul între MTBE și soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl. Se separă straturile și se extrage soluția apoasă cu MTBE. Se combină extractele organice, se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează filtratul pentru a obține un reziduu portocaliu. Se purifică materialul brut prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu eluând cu 5% MeOH/DCM pentru a da compusul din titlu (205 mg, 78%) ca solid galben. ES/MS (m/z): 543,2 (M+H).

Se prepară următorii compuși într-o manieră în mod esențial analogă cu metoda de la Prepararea 6, cu următoarele variații în procedură, timpi de încălzire între 1-2 ore, extragere cu MTBE sau EtOAc, și uscarea straturilor organice pe sulfat de magneziu sau sulfat de sodiu. Se purifică prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu utilizând până la 10% (MeOH sau 7 M MeOH amoniat) în DCM (Prep. 10: gradient 3-8% 7 M MeOH amoniat în DCM; Prep. 9 și 11: gradient 4 până la 10% 7 M MeOH amoniat în DCM) și/sau prin cromatografie cu fază inversă cu pH ridicat cum s-a menționat.

**Tabelul 2: Compuși preparați în conformitate cu Prepararea 6**

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
7	(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-3-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxicinolin-4-il}metanonă		543,0
8 <sup>a</sup>	[3-(4-Cloro-2-fluorofenil)-7-hidroxicinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)metanonă		509,0
9 <sup>b</sup>	[3-(3-Cloro-2-fluorofenil)-7-hidroxicinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)metanonă		509,0
10	[3-(2,4-Difluorofenil)-7-hidroxicinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)metanonă		493,0

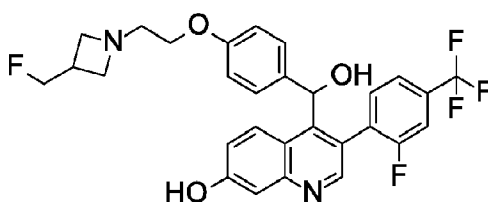
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
			
11	[3-(2,3-Difluorofenil)-7-hidroxicinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanonă		493,0
12	(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)[3-(2-fluoro-4-metilfenil)-7-hidroxicinolin-4-il]metanonă		489,2
13	(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)[3-(2-fluoro-3-metilfenil)-7-hidroxicinolin-4-il]metanonă		489,2

<sup>a</sup>Purificare prin cromatografie rapidă cu fază inversă cu pH ridicat (coloană C18 de înaltă performanță RediSep Rf GOLD<sup>®</sup>, eluând cu 35-45% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).

<sup>b</sup>După purificarea pe siliciu eluează cu 4-10% 7 M MeOH amoniat în DCM, se purifică suplimentar prin cromatografie rapidă cu fază inversă cu pH ridicat (coloană C18 de înaltă performanță RediSep Rf GOLD<sup>®</sup>, eluând cu 30-44% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).

**Preparare 14**

**4-{2-[3-(Fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil}(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]chinolin-7-ol racemic**



5

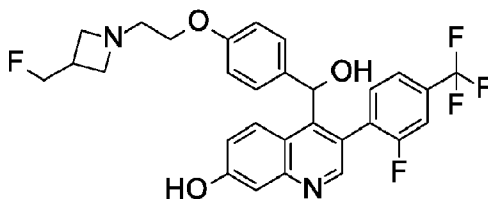
Se adaugă (4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxicinolin-4-il]metanonă (305 g, 562,2 mmol) și THF (1,5 L) împreună sub N<sub>2</sub> și se răcește soluția la 0-5°C. Se adaugă trietilborohidruură de litiu (1 M în THF, 1,5 L, 1,5 mol) în picătură. Se agită amestecul la 0-5°C timp de 1 oră. Se adaugă apă (300 mL) în picătură și NH<sub>4</sub>Cl saturată (1 L). Se încălzește amestecul la temperatura camerei. Se adaugă EtOAc (2 L) și se colectează stratul organic. Se spală stratul organic cu sare (500 mL), se usucă pe MgSO<sub>4</sub>, se filtrează, și se concentrează la sec. Se dizolvă reziduul în 95:5 amestec de acetonă și 2 M amoniac în MeOH și se filtrează prin gel de siliciu pentru a da compusul din titlu (264 g, 86,2%) ca un solid oranj. ES/MS (m/z): 545,2 (M+H).

10

**Preparare 15**

**4-{2-[3-(Fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil}(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]chinolin-7-ol, Izomer 1**

15



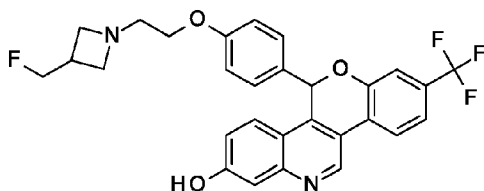
Se purifică 4-{2-[3-(fluorometil)azetidina-1-il]etoxifenil}(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]chinolin-7-ol racemic (354 g, 0,62 mol) utilizând cromatografia chirală în următoarele condiții: coloană Chiralpak AD-H, 150 x 50 mm, debit 300 g/minut, UV 350 nm, fază mobilă  
 5 35% iPrOH cu 0,5% DMEA/CO<sub>2</sub>, temperatura coloanei 40°C pentru a da compusul din titlu (171,4 g, 48%) al primului izomer care eluează. Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >98% ee, t<sub>(R)</sub>=0,79 minute, coloană: 4,6 x 150 mm Chiralpak AD-H, eluând cu o fază mobilă de 35% iPrOH cu 0,5% DMEA în CO<sub>2</sub>, debit de 0,6 mL/minut, detecție UV de 350 nm.

#### Preparare alternativă 15

Se adaugă trimetil borat (65 mg, 0,62 mmol) la o soluție de (R)-(+)- $\alpha,\alpha$ -difetil-2-pirolidinometanol (132 mg, 0,52 mmol) în THF (20 mL). Se agită amestecul sub N<sub>2</sub> la temperatura camerei timp de 1 oră. Se adaugă boran-dimetilsulfură (2,0 M în THF, 2,6 mL, 5,2 mmol) urmată de (4-{2-[3-(fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxichinolin-4-il}metanonă (1,0 g, 1,73 mmol). Se încălzește reacția peste noapte la 45°C. Se adaugă suplimentar boran-dimetilsulfură (2,0 M în THF, 2,6 mL, 5,2 mmol) și se agită timp de 5 ore la 45°C. Se adaugă încet soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl (25 mL) și se izolează faza organică. Se reextrage extractul apos cu 20% iPrOH/CHCl<sub>3</sub>. Se combină extractele organice, se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtrează, și se evaporă pentru a da un complex boran intermediar (1,2 g). Se dizolvă o treime din complexul boran intermediar (0,4 g, 0,6 mmol) în 1,4-dioxan (4 mL) și etanolamină (0,3 mL, 5 mmol) și se încălzește reacția până la 70°C timp de 3 ore. Se stinge reacția cu soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl (25 mL) și se izolează faza organică. Se reextrage extractul apos cu 20% iPrOH/CHCl<sub>3</sub> (4 x 25 mL). Se combină extractele organice, se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtrează, și se concentrează la sec pentru a da compusul din titlu ca un solid oranj (0,33 g, 0,57 mmol, randament 100%). LC/MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 545. Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, 96% ee, t<sub>(R)</sub>=0,79 minute, coloană: 4,6 x 150 mm Chiralpak AD-H, eluând cu o fază mobilă de 35% iPrOH cu 0,5% DMEA în CO<sub>2</sub>, debit de 0,6 mL/minut, detecție UV de 350 nm.

#### EXEMPLUL 1

**5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1] benzopirano[4,3 - c]chinolin-2-ol racemic**



Se răcește o soluție de (4-{2-[3-(fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxichinolin-4-il}metanonă (5,27 g, 9,71 mmol) în 1,4-dioxan (100 mL) până la 5°C. Se adaugă trietilborohidruură de litiu (1 M în THF, 30,0 mL, 30,0 mmol). Se îndepărtează baia de răcire și se agită timp de 1,5 ore la temperatura camerei. Se stinge amestecul cu apă. Se adaugă soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl și EtOAc. Se separă straturile și se extrage stratul apos cu EtOAc. Se combină extractele organice, se usucă pe MgSO<sub>4</sub> anhidru, se filtrează, și se concentrează filtratul. Se dizolvă reziduul brut în THF (100 mL). Se adaugă hidruură de sodiu (60% în ulei mineral, 1,94 g, 48,5 mmol). Se refluxează soluția timp de 1,5 ore. Se adaugă suplimentar hidruură de sodiu (60% în ulei mineral, 1,94 g, 48,5 mmol), apoi se refluxează timp de încă 30 minute suplimentare. Se răcește soluția la temperatura camerei și se stinge cu apă. Se adaugă EtOAc și soluție saturată de NH<sub>4</sub>Cl. Se separă straturile și se extrage stratul apos cu EtOAc. Se combină extractul organic, se usucă pe MgSO<sub>4</sub> anhidru, se filtrează, și se concentrează filtratul. Se purifică reziduul prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu eluând cu un gradient de 5-7% MeOH în DCM pentru a da compusul din titlu (3,70 g, 72%) ca spumă galben deschis. ES/MS (m/z): 525,2 (M+H).

Se prepară următorii compuși într-o manieră în mod esențial analoagă cu metoda din Exemplul 1, cu următoarele variații în procedură. Pentru reducere, se utilizează 3 până la 5 echivalenți de trietilborohidruură de litiu cu timpi de reacție de la 30 minute la o oră și se usucă straturile organice pe sulfat de magneziu sau sulfat de sodiu. Se utilizează reziduul brut direct sau se purifică prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu eluând cu un gradient de 0-5-7,5-10% MeOH în DCM înainte de ciclizare. Se

completează ciclizarea la reflux în THF timp de până la 16 ore, sau în DMF, de la 2 ore la temperatura camerei pentru Ex 2, până la 2 ore la 85°C pentru Ex 8. Se extrage cu DCM sau EtOAc și se usucă straturile organice pe sulfat de magneziu sau sulfat de sodiu. Se purifică prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu utilizând până la 10% (MeOH sau 7 M MeOH amoniat) în DCM (Ex 2: gradient 0-10% MeOH în DCM; Ex 5: gradient 4-10% 7 M MeOH amoniat în DCM; Ex 8: gradient 5-7,5% 7 M MeOH amoniat în DCM) sau prin HPLC cu fază inversă cu pH ridicat cum s-a menționat.

5

**Tabelul 3: Exemple de compuși preparați în conformitate cu Exemplul 1**

Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
2	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		525,2
3 <sup>a</sup>	8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		491,0
4 <sup>b</sup>	7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		491,0
5 <sup>c</sup>	8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		475,0
6 <sup>d</sup>	7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		475,0
7 <sup>e</sup>	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		471,2
8	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol racemic		471,2

<sup>a</sup>Purificarea prin HPLC cu fază inversă cu pH ridicat (coloană KINETEX<sup>®</sup> C18, 5 μm, 30 × 250 mm, eluând cu 35-50% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).

<sup>b</sup>Purificare prin HPLC cu fază inversă cu pH ridicat (coloană KINETEX<sup>®</sup> C18, 5 μm, 30 × 250 mm, eluând cu 35-43% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).

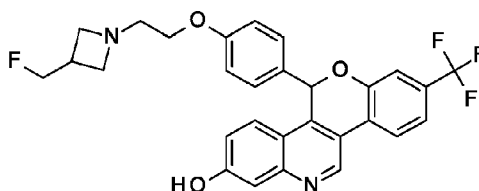
Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
	<sup>a</sup> După purificare pe siliciu eluând cu 4-10% 7M MeOH amoniat în DCM, se purifică suplimentar prin HPLC cu fază inversă cu pH ridicat (coloană KINETEX <sup>®</sup> C18, 5 μm, 30 × 250 mm, eluând cu 30-44% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).		
	<sup>b</sup> Purificare prin HPLC cu fază inversă cu pH ridicat (coloană XBRIDGE <sup>®</sup> C18 5 μm OBD, 30 × 75 mm, eluând cu 10-75% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).		
	<sup>c</sup> Purificare prin HPLC cu faza inversă cu pH ridicat (coloană XBRIDGE <sup>®</sup> C18 5 μm OBD, 30 × 75 mm, eluând cu 10-60% ACN în 10 mM soluție apoasă de bicarbonat de amoniu cu 5% MeOH).		

**EXEMPLUL 1A**

**5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 1 și**

**EXEMPLUL 1B**

**5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2**



Se separă cei doi enantiomeri de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: LUX<sup>®</sup> celuloză-1, 5 × 25 cm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (cu 0,5% DMEA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 300 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 270 nm pentru a da Exemplul 1A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Confirm îmbogățirii enantiomerice a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 1,30 minute; coloană: CHIRALCEL<sup>®</sup> OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 1B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, 98% ee,  $t_{(R)}$ : 2,03 minute; coloană: CHIRALCEL<sup>®</sup> OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**Preparare alternativă a EXEMPLULUI 1B**

**5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol cristalin, Izomer 2**

Se agită 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, acidul 4-metilbenzensulfonic, Izomerul 2 (23,8 g, 0,034 mol) în apă (250 mL) la 1000 rpm. Se adaugă NaOH (76 μL) și se agită soluția timp de 2 ore. Se adaugă DCM (600 mL). Se separă amestecul, se usucă extractul de DCM cu sulfat de magneziu, se filtrează materialul printr-un filtru de seringă (0,45 μm), și se concentrează la sec. Se lasă materialul să stea sub un flux de N<sub>2</sub> la sfârșit de săptămână. Se adaugă 1:1 EtOH/apă (80 mL) și se agită amestecul cu sonicare. Se colectează un solid arămiu prin filtrare pe o membrană de nailon pentru a da compusul din titlu (10,47 g, 0,02 mol, 59%).

**Difracție cu raze X pe pulbere (XRD)**

Tiparele XRPD ale solidelor cristaline sunt obținute pe un difractometru cu raze X pe pulbere Bruker D4 Endeavor, echipat cu o sursă CuKα și un detector Vantec, care operează la 35 kV și 50 mA. Mostra este scanată între 4 și 40 2θ°, cu o dimensiune a etapei de 0,008 2θ° și o rată de scanare de 0,5 secunde/etapă, și utilizând o divergență de 1,0 mm, anti-împrăștiere fixată de 6,6 mm, și fante detectoare de 11,3 mm. Pulberea uscată este ambalată pe un suport de cuarț pentru mostră și o suprafață netedă este obținută utilizând o lamelă din sticlă. Tiparele de difracție de formă cristalină sunt colectate la temperatura ambiantă și umiditate relativă. Pozițiile maximelor cristalelor sunt determinate în MDI-Jade după deplasarea întregului tipar pe baza unui standard NIST 675 intern cu maxime la 8,853 și 26,774 2θ°. Este bine cunoscut în domeniul cristalografiei că, pentru orice formă cristalină dată, intensitățile relative ale difracției maxime pot varia din cauza orientării preferate care rezultă din factori cum ar fi morfologia

cristalului și obișnuința. Unde efectele de orientare preferată sunt prezente, intensitățile maxime sunt alterate, dar pozițiile maximelor caracteristice ale polimorfei sunt nemodificate. Vezi, de exemplu Farmacopeia Statelor Unite #23, Formularul Național #18, paginile 1843-1844, 1995. Mai mult, este de asemenea bine cunoscut în domeniul cristalografiei că pentru orice formă cristalină dată pozițiilor maximelor unghiulare pot varia puțin. De exemplu, pozițiile maximelor se pot deplasa din cauza variației de temperatură la care o mostră este analizată, deplasării mostrei, sau prezenței sau absenței unui standard intern. În cazul prezent, o variabilitate a poziției maxime de  $\pm 0,2 2\theta^\circ$  este de presupus că ține seama de aceste potențiale variații fără a împiedica identificarea univocă a formei cristaline indicate. Confirmarea unei forme cristaline poate fi făcută pe baza oricărei combinații unice de maxime distinctive.

Se caracterizează o mostră preparată de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxilfenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol cristalin, Izomer 2 printr-un tipar XRD utilizând radiația CuK $\alpha$  ca având maxime de difracție (valori 2-teta) cum s-au descris în Tabelul 3 de mai jos, și în particular având maxime la 19,8 în combinație cu unul sau mai multe dintre maximele selectate din grupul constând din 6,8, 16,0, și 22,1; cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade.

**Tabelul 4: Maxime de difracție cu raze X pe pulbere ale cristalului din Exemplul 1B**

Maxim	Unghi ( $2\theta$ ) $\pm 0,2^\circ$	Intensitate relativă (% din maximul cel mai intens)
1	6,8	29,40
2	15,3	8,30
3	16,0	20,10
4	17,4	7,60
5	18,1	16,00
6	19,8	100,00
7	21,1	14,60
8	22,1	28,90
9	24,9	16,40
10	25,4	21,90

**Preparare alternativă a EXEMPLULUI 1B**

Se dizolvă 4-{2-[3-(fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]chinolin-7-ol, Izomer 1 (63,05 g, 104,7 mmol) în DMSO (1,3 L) sub N<sub>2</sub> la temperatura camerei. Se adaugă în porții carbonat de cesiu (108 g, 331 mmol) timp de 5 minute. Se încălzește amestecul până la 60°C timp de 15 ore. Se răcește amestecul la temperatura camerei și se diluează cu apă (2,1 L) și EtOAc (1,3 L). Se agită amestecul timp de 5 minute și se separă. Se reextrage materialul apos cu EtOAc (1,3 L) și se agită timp de 5 minute. Se separă și se combină extractele organice, se spală cu saramură, apă, și EtOAc. Se usucă extractele organice cu MgSO<sub>4</sub>, se concentrează, și se usucă sub vid înaintat peste noapte la temperatura camerei pentru a da compusul din titlu ca solid maro (52,69 g, 95,9%). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică din Exemplul 1B prin SFC analitică chirală, 98,1% ee,  $t_{(R)}$ : 2,03 minute; coloană: CIIIRALCEL® OD-H, 4,6  $\times$  150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub> temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 2A**

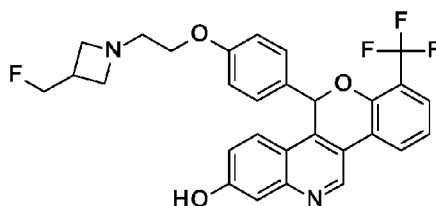
5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]c]chinolin-2-ol, Izomer 1 și

benzopirano[4,3-

**EXEMPLUL 2B**

5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetid-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]c]chinolin-2-ol, Izomer 2

benzopirano[4,3-



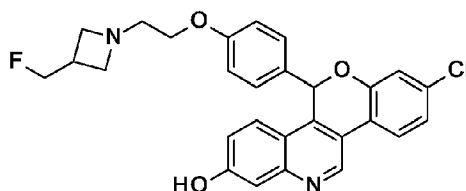
Se separă cei doi enantiomeri de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALPAK® IC, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 70 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm pentru a da Exemplul 2A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 525,1 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 1,56 minute; coloană: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 2B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, 98% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 2,33 minute; coloană: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 3A**

**8-Cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 1 și**

**EXEMPLUL 3B**

**8-Cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 2**



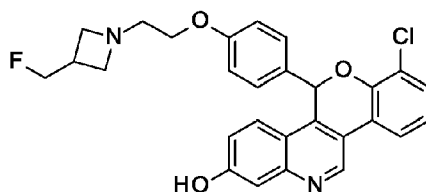
Se separă cei doi enantiomeri de 8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il] etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 80 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm pentru a da Exemplul 3A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 1,55 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 3B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 2,26 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 4A**

**7-Cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 1 și**

**EXEMPLUL 4B**

**7-Cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 2**



Se separă cei doi enantiomeri de 7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il] etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 80 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm pentru a da Exemplul 4A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 1,71 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>;

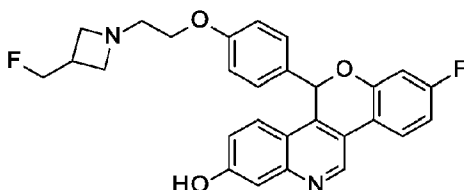
temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 4B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 2,38 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 5A**

**8-Fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 1 și**

**EXEMPLUL 5B**

**8-Fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 2**



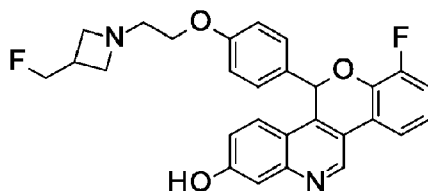
Se separă cei doi enantiomeri de 8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il] etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 80 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm pentru a da Exemplul 5A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 1,56 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 5B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 2,29 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 6A**

**7-Fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 1 și**

**EXEMPLUL 6B**

**7-Fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 2**



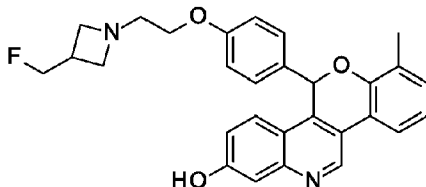
Se separă cei doi enantiomeri de 7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il] etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 80 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm pentru a da Exemplul 6A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 1,32 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 6B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, >99% ee,  $t_{(R)}$ : 1,95 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 35% MeOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 8A**

5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c] chinolin-2-ol, Izomer 1 și

**EXEMPLUL 8B**

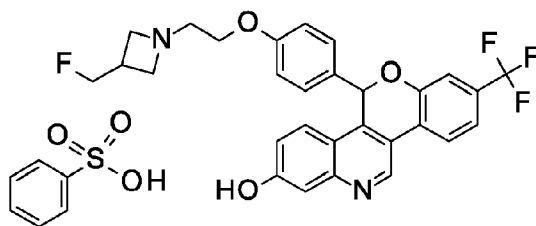
5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c] Izomer 2



Se separă cei doi enantiomeri de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol prin SFC chirală cu următoarele condiții: coloană: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (cu 0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 80 g/minut; lungime de undă de detecție UV: 265 nm pentru a da Exemplul 8A ca primul enantiomer care eluează (Izomer 1). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 1 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 1,47 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm. Se izolează compusul din titlu din Exemplul 8B pentru a da al doilea enantiomer care eluează (Izomer 2). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Se confirmă îmbogățirea enantiomerică a Izomerului 2 prin SFC analitică chirală, >99% ee, *t*<sub>(R)</sub>: 2,05 minute; coloană: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; eluând cu o fază mobilă de 30% iPrOH (0,2% IPA) în CO<sub>2</sub>; temperatura coloanei: 40°C; debit: 5 mL/minut; lungime de undă de detecție UV: 225 nm.

**EXEMPLUL 9**

5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2, acid benzensulfonic



Se încălzește o suspensie de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2 (Exemplul 1B) (100 mg, 0,19 mmol) în ACN (3 mL) la 50°C. Se adaugă o soluție de acid benzensulfonic monohidrat (40 mg, 0,23 mmol) în ACN (1 mL). Se încălzește soluția galbenă clară timp de 10 minute la 50°C. Se întrerupe încălzirea, și se lasă amestecul de reacție să se răcească la temperatura camerei, și se agită amestecul peste noapte. Se adaugă toluen (2 mL) și se agită amestecul de reacție 2 ore. Se filtrează soluția, se colectează solidul rezultat și se spală solidul cu ACN (1 mL). Se usucă solidul sub vid pentru a da compusul din titlu (74 mg, 55%).

**Preparare alternativă a EXEMPLULUI 9**

Se încălzește o suspensie de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2 (Exemplul 1B) (124,1 mg, 0,24 mmol) în MEK (4 mL) la 50°C. Se adaugă o soluție de acid benzensulfonic monohidrat (50 mg, 0,28 mmol) dizolvat în MEK (1 mL). Se întrerupe încălzirea, se lasă amestecul de reacție să se răcească la temperatura camerei, și se agită amestecul la sfârșit de săptămână. Se concentrează sub un flux de N<sub>2</sub>. Se adaugă MEK (1 mL) și se suspendă pentru a da un solid cristalin galben. Se colectează solidul, se spală cu MEK, și se usucă la temperatura camerei în vid pentru a da compusul din titlu (78,8 mg, 48%).

**XRD, Exemplul 9**

Se completează XRD cum s-a descris pentru Exemplul 1B. Se caracterizează o mostră preparată de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidină-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2, acid benzensulfonic printr-un tipar XRD utilizând radiația CuKα ca având maxime de difracție (valori 2-teta) cum s-au descris în Tabelul 4 de mai jos, și în particular având maxime la 20,5 în combinație cu unul sau mai multe dintre maximele selectate din grupul constând din 12,3, 22,2, și 23,1; cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade.

**Tabelul 5: Maximele de difracție cu raze X pe pulbere ale cristalului din Exemplul 9**

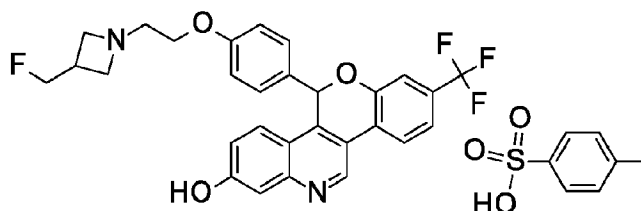
Maxim	Unghi ( $^{\circ}$ 2-Teta) +/- 0,2 $^{\circ}$	Intensitate relativă (% din maximum cel mai intens)
1	7,6	27,10
2	10,6	34,50
3	12,3	42,10
4	12,6	32,30
5	17,7	32,80
6	19,2	26,70
7	20,5	100,00
8	22,2	45,50
9	23,1	36,30
10	24,2	29,80

**EXEMPLUL 10**

**5-(4-{2-[3-(Fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]chinolin-2-ol cristalin, acid 4-metilbenzensulfonic, Izomer 2**

**benzopirano[4,3-c]**

5



Se adaugă împreună 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, Izomer 2 (Exemplul 1B) (204,2 g, 389 mmol) și EtOAc (5 L) și se agită la 60 $^{\circ}$ C urmate de adăugarea de MeOH (200 mL) la 60 $^{\circ}$ C pentru a da o soluție maro clară. Se adaugă produsul din titlu (11,48 g) pentru a însămânța soluția, urmat de adăugarea unei soluții preamestecate de acid 4-metilbenzensulfonic; hidrat (81,4 g, 428 mmol) în EtOAc (800 mL) pentru a da o suspensie galbenă. Se agită suspensia timp de 30 minute la 50 $^{\circ}$ C. Se concentrează suspensia la 1/2 volum. Se răcește soluția la temperatura camerei timp de 1 oră, se filtrează, se colectează solidul, și se spală solidul cu EtOAc. Se usucă solidul sub vid la 30 $^{\circ}$ C la sfârșit de săptămână pentru a da compusul din titlu (239 g, 343 mmol). Pentru a purifica suplimentar materialul, se adaugă compusul din titlu (229 g, 328,7 mmol) și 2-propanol (4,6 L) împreună și se încălzește la 60 $^{\circ}$ C timp de 2 ore. Se răcește la temperatura camerei timp de 30 minute. Se filtrează solidul și se spală cu iPrOH (100 mL). Se usucă solidul sub un flux de N<sub>2</sub> peste noapte pentru a da compusul din titlu (174,4 g, 76,2%). Se combină diferite loturi ale compusului din titlu preparate în mod esențial în aceeași manieră și se adaugă heptan (2 L). Se agită suspensia timp de 30 minute, se filtrează solidul, și se spală cu heptan (300 mL). Se usucă solidul colectat sub un flux de N<sub>2</sub> peste noapte pentru a da compusul din titlu (199,7 g, 99,5%).

10

15

20

**XRD, Exemplul 10**

25

Se completează XRD cum s-a descris în Exemplul 1B. O mostră preparată de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidina-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]chinolin-2-ol, acid 4-metilbenzensulfonic, Izomer 2 (Exemplul 10) este caracterizată printr-un tipar XRD utilizând radiația CuK $\alpha$  ca având maxime de difracție (valori 2-teta) cum s-au descris în Tabelul 5 de mai jos, și în particular având maxime la 20,1 în combinație cu unul sau mai multe dintre maximele selectate din grupul constând din 12,8, 19,5, și 22,8; cu o toleranță pentru unghiulurile de difracție de 0,2 grade.

**Tabelul 6: Maximele de difracție cu raze X pe pulbere ale cristalului din Ex. 10**

Maxim	Unghi ( $^{\circ}$ 2-Teta) +/- 0,2 $^{\circ}$	Intensitate relativă (% din maximum cel mai intens)
1	7,6	25,70
2	12,4	27,90
3	12,8	36,80
4	18,9	26,50

Maxim	Unghi ( $^{\circ}$ 2-Teta) +/- 0,2 $^{\circ}$	Intensitate relativă (% din maximum cel mai intens)
5	19,5	56,90
6	20,1	100,00
7	20,9	41,50
8	21,8	40,90
9	22,8	39,40
10	25,4	29,70

**Teste biologice**

Dovada pentru o relație între expresia ER și anumite cancere este bine cunoscută în domeniu.

Rezultatele următoarelor teste demonstrează că compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III din exemplele sunt SERD-uri active și sunt concepuți pentru a fi utili în tratarea cancerului.

5 **ER $\alpha$  (de tip sălbatic), ER $\alpha$  (mutant Y537S) și test de legare competitivă EP $\beta$** 

Scopul următoarelor teste de legare competitivă ER este de a determina afinitatea unui compus de testat împotriva ER $\alpha$  (de tip sălbatic), ER $\alpha$  (mutant Y537S), și EP $\beta$ .

Se rulează testul de legare competitivă într-un tampon care conține 50 mM HEPES, pH 7,5, 1,5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mg/mL ovalbumină, și 5 mM DTT, utilizând 0,025  $\mu$ Ci pe godeu  $^3$ H-estradiol (118 Ci/mmol, 1 mCi/mL), 7,2 ng/godeu ER $\alpha$  (de tip sălbatic), sau 7,2 ng/godeu ER $\alpha$  (mutant Y537S) sau 7,7 ng/godeu receptor EP $\beta$ . Se adaugă compusul de testat la 10 concentrații diferite care variază de la 10.000 nM până la 0,5 nM, și se determină legarea nespecifică în prezența a 1  $\mu$ M de 17- $\beta$  estradiol. Se incubează reacția de legare (140  $\mu$ L) timp de 4 ore la temperatura camerei, și apoi se adaugă tampon rece de dextran-cărbune (70  $\mu$ L) (conținând pe 50 mL de tampon de testare, 0,75 g cărbune și 0,25 g dextran) la fiecare reacție. Se amestecă plăcile timp de 8 minute pe un agitator orbital la 4 $^{\circ}$ C și apoi se centrifughează la 3000 rpm la 4 $^{\circ}$ C timp de 10 minute. Se transferă o alicotă (120  $\mu$ L) a amestecului la o altă placă albă cu fund plat cu 96 de godeuri (Costar), și se adaugă fluid de scintilație Perkin Elmer Optiphase Supermix (175  $\mu$ L) la fiecare godeu. Se etanșează plăcile și se agită viguros pe un agitator orbital. După o incubare de 2,5 ore, se citesc plăcile într-un contor Wallac Microbeta. Se calculează IC<sub>50</sub> utilizând o curbă logistică ajustată cu 4 parametri și se calculează inhibarea % la 10  $\mu$ M. Se convertesc valorile IC<sub>50</sub> pentru compus la K<sub>i</sub> utilizând ecuația Cheng-Prusoff. Rezultatele acestui test demonstrează că Exemplele 1, 1A, și 1B (și altele) se leagă la ER $\alpha$  recombinant de tip sălbatic și la ER $\alpha$  mutant (Y537S) așa cum se arată în Tabelul 7 de mai jos și Exemplul 1B a fost de asemenea determinat ca a se lega la EP $\beta$  cu o competiție Ek $\beta$  K<sub>i</sub> (nM) de 0,11  $\pm$  0,07, n=3.

25 **Tabelul 7: ER $\alpha$  (de tip sălbatic), ER $\alpha$  (mutant Y537S) și rezultatele legării competiționale EP $\beta$** 

# Exemplu	K <sub>i</sub> (nM) ER $\alpha$ (de tip sălbatic)	K <sub>i</sub> (nM) ER $\alpha$ (mutant Y537S)
1	0,87	5,80
1A	12,45 $\pm$ 9,32, n=3	57,18 $\pm$ 39,13, n=3
1B	0,31 $\pm$ 0,38, n=5	2,79 $\pm$ 3,00, n=5
2	2,17	6,78
2A	0,65	7,92
2B	60,4	293,6
3	2,36	6,69
3A	8,11	27,23
3B	0,59	2,79
4	0,64	12,11
4A	16,78	54,97
4B	0,34	2,34
5	2,82	19,47
5A	12,54	81,15
5B	1,30	6,56

# Exemplu	K <sub>i</sub> (nM) ER $\alpha$ (de tip sălbatic)	K <sub>i</sub> (nM) ER $\alpha$ (mutant Y537S)
6	4,14	15,77
6A	8,53	45,99
6B	1,13	5,71
7	1,55	8,55
8	3,20	11,4
8A	9,33	66,94
8B	0,94	5,44

Dintre compușii exemplificați testați, K<sub>i</sub> pentru ER $\alpha$  de tip sălbatic a variat de la aproximativ 0,300 nM până la aproximativ 65 nM. K<sub>i</sub> pentru ER $\alpha$  mutant Y537S a variat de la aproximativ 2 nM până la 300 nM. Rezultatele acestui test demonstrează afinitatea de legare și potența compușilor exemplificați împotriva ER $\alpha$  de tip sălbatic, mutantului (ESR1 Y537S) și proteinelor EP $\beta$ .

#### 5 Test de degradare ER $\alpha$ în celulele MCF7

Scopul următorului test de degradare ER $\alpha$  este de a măsura degradarea ER $\alpha$  de către un compus de testat într-o linie celulară de cancer la sân pozitiv ER $\alpha$  cum ar fi MCF7.

Celulele MCF7 (cumpărate de la ATCC HTB-22) de cultură în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS, 0,01 mg/mL insulină umană 1 și 1% antibiotice penicilină/streptomicină sunt placate în plăci cu fund plat cu 384 de godeuri la o densitate de 4.000 celule pe godeu în mediu DMEM fără fenol roșu (20  $\mu$ L) conținând 10% FBS stripat cu cărbune. Se incubează celulele peste noapte într-un incubator de cultură celulară (5% CO<sub>2</sub>, 95% umiditate relativă și 37°C) și se lasă celulele să se atașeze la placă. În ziua următoare se dozează celulele cu compusul de testat. Se utilizează un distribuitor acustic Echo 555 pentru a prepara diluții seriale ale compusului de testat (1:3) într-un interval de la 6  $\mu$ M până la 0,0003  $\mu$ M. Se dozează celulele cu adăugarea a 5  $\mu$ L dintr-o placă de diluție serială la placa celulei care produce o concentrație DMSO finală de 0,2% cu o doză a concentrației finale a compusului de testat variind între 2 și 0,0001  $\mu$ M. Pentru punctul maxim, se utilizează mediul care conține 0,2% DMSO și pentru punctul minim, se utilizează fulvestrant diluat la concentrații finale de 2  $\mu$ M în mediu de creștere conținând 0,2% DMSO. După dozarea cu compusul de testat, se incubează plăcile cu celule la 37°C și 5% CO<sub>2</sub> timp de 24 ore. Se fixează celulele prin adăugarea a 14% para-formaldehidă (10  $\mu$ L) timp de 30 minute la temperatura camerei. Se spală celulele o dată cu PBS (20  $\mu$ L) și se incubează cu PBS (20  $\mu$ L) conținând 0,5% (v/v) TWEEN<sup>®</sup> 20 timp de 1 oră. Se spală celulele cu PBS conținând 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20 (2 $\times$ ) și se blochează cu 3% BSA în PBS conținând 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20 și 0,1% TRITON<sup>™</sup> X-100 (20  $\mu$ L/godeu) timp de 1 oră la temperatura camerei. Se adaugă diluție 1:500 anticorp primar (20  $\mu$ L) (ER $\alpha$  (clonă SP1) de anticorp monoclonal de iepure #RM-9101-S, Thermo Scientific) în 1% BSA în PBS conținând 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20 pe godeu, se etanșează plăcile și se incubează peste noapte la 4°C. În ziua următoare se spală celulele cu PBS conținând 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20 (2 $\times$ ) și se incubează cu anticorp secundar (20  $\mu$ L/godeu) (diluție 1:1000, ALEXA FLUOR<sup>™</sup> 488 IgM anti- iepure de capră) în PBS 1% BSA timp de 105 minute la temperatura camerei. După spălarea plăcilor cu PBS (2 $\times$ 20  $\mu$ L), se adaugă RNază (Sigma) (20  $\mu$ L de 50  $\mu$ g/mL) și 1:1000 soluție de iodură de propidiu în PBS pe godeu (20  $\mu$ L). Se etanșează plăcile și se incubează 1 oră la temperatura camerei pe bancă (ferite de lumină). Se scanează plăcile cu ACUMEN EXPLORER<sup>™</sup> [citometru cu microplacă fluorescentă cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD] pentru a măsura ER $\alpha$ . Analiza imagistică este pe baza semnalelor fluorescente celulare pentru identificarea celulelor pozitive. Se identifică celulele pozitive ER prin intensitatea medie. Se utilizează intensitatea totală la 575-640 nm din iodura de propidiu/ADN pentru a identifica celulele individuale. Ieșirea testului este % celule pozitive ER. Se determină IC<sub>50</sub> prin ajustarea pe o curbă logistică cu patru parametri, pentru fiecare ieșire utilizând GENE DATE<sup>™</sup>. Rezultatele acestui test demonstrează degradarea potență a ER $\alpha$  indusă de compușii cu Formula I, Formula II, și Formula III cum s-a descris aici în celulele MCF7 de cancer la sân. Valorile IC<sub>50</sub> relative pentru Exemplele 1, 1A, și 1B sunt prezentate în Tabelul 8.

**Tabelul 8: Test de degradare ER $\alpha$  în celulele MCF7**

# Exemplu	IC <sub>50</sub> relativă ( $\mu$ M)
1	0,003405 $\pm$ 0,001086, n=3
1A	0,3940 $\pm$ 0,1941, n=4
1B	0,003088 $\pm$ 0,001523, n=19

# Exemplu	IC <sub>50</sub> relativă (μM)
2	0,05220 ± 0,006508, n=2
2A	0,05125 ± 0,01626, n=2
2B	>2
3	0,03347 ± 0,007830, n=3
3A	0,3905
3B	0,008664
4	0,02241 ± 0,0003553, n=3
4A	0,4998
4B	0,006892
5	0,03653 ± 0,03738, n=2
5A	0,5221
5B	0,009493 ± 0,001103, n=2
6	0,05086 ± 0,006889, n=3
6A	0,1753
6B	0,009132
7	0,07879 ± 0,007379, n=2
8	0,01738 ± 0,008752, n=2
8A	0,2341
8B	0,009617 ± 0,005198, n=2
10	0,004216 ± 0,001619, n=5

Specific, rezultatele din Tabelul 7 prezintă o degradare potentă a ERA de către compusul din Exemplul 1 în celulele MCF7 de cancer la sân. Dintre compușii exemplificați testați, IC<sub>50</sub> relativă a variat de la 0,003 la >2 μM ceea ce arată că toate, cu excepția Exemplului 2B, au prezentat activitate la concentrația testată. Rezultatele acestui test demonstrează că compusul cu Formula (I) este un SERD cu activitate potentă de degradare ERA în celule.

#### Test de inducere PRα în celulele MCF7

Scopul următorului test de inducere PRα este de a determina dacă un compus de testat are activitate agonistică împotriva receptorului ERA (un agonist ar fi de așteptat să activeze receptorul).

Se cultivă MCF7 (cumpărate de la ATCC HTB-22) în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS, 0,01 mg/mL insulină umană 1 și 1% antibiotice penicilină/streptomicină și se plachează celulele (înainte de a deveni 70% confluențe) în plăci cu fund plat cu 384 de godeuri la o densitate de 4.000 celule pe godeu în 20 μL volum în mediu DMEM fără fenol roșu conținând 10% FBS (cărbune stripat). Se incubează celulele peste noapte într-un incubator de cultură celulară (5% CO<sub>2</sub>, 95% umiditate relativă la 37°C) și se lasă celulele să se atașeze la placă. În ziua următoare, se dozează celulele cu compus de testat. Se utilizează un distribuitor acustic Echo 555 pentru a prepara diluții seriale compuse (1:3) într-un interval de la 6 μM până la 0,0003 μM. Se dozează celulele cu adăugarea de compus de testat (5 μL) din placa cu diluție serială la placa cu celule care produce o concentrație DMSO finală de 0,2% cu o doză a concentrației finale a compusului de testat variind între 2 și 0,0001 μM. Pentru punctul maxim se utilizează mediul conținând 0,2% DMSO și pentru punctul minim, se utilizează fulvestrant diluat la concentrații finale de 2 μM în mediu de creștere conținând 0,2% DMSO. După dozarea cu compusul de testat, se incubează placa cu celule la 37°C și 5% CO<sub>2</sub> timp de 24 ore. Se fixează celulele prin adăugare de 14% para-formaldehidă (10 μL) timp de 30 minute la temperatura camerei. Se spală celulele o dată cu PBS (20 μL) și se incubează cu PBS (20 μL) conținând 0,5% (v/v) TWEEN® 20 timp de 1 oră. Se spală celulele de două ori cu PBS (20 μL) conținând 0,05% TWEEN® 20 și se blochează cu 3% BSA în PBS conținând 0,05% TWEEN® 20 și 0,1% TRITON™ X-100 (20 (μL/godeu) timp de 1 oră la temperatura camerei. Se adaugă diluție 1:500 anticorp primar (20 μL) (anticorp monoclonal PR anti-uman de șoarece, clonă PgR 636 Dako, M3569) în 1% BSA/PBS cu 0,05 TWEEN® 20 pe godeu, se etanșează plăcile și se incubează peste noapte la 4°C.

În următoarea zi, se spală celulele cu PBS 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20 (2×20 µL) și se incubează cu anticorp secundar (20 µL/godeu) (diluție 1:1000, ALEXA FLUOR<sup>™</sup> 488 IgM anti-iepure de capră) în PBS 1% BSA timp de 105 minute la temperatura camerei. După spălarea cu PBS (2×20 µL), se adaugă RNază (20 µL de 50 µg/mL) (Sigma) și diluție 1:1000 iodură de propidiu în PBS pe godeu. Se etanșează plăcile și se incubează 1 oră la temperatura camerei pe bancă (ferite de lumină). Se scanează plăcile cu ACUMEN EXPLORER<sup>™</sup> [citometru cu microplacă fluorescentă cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD] pentru a măsura PR $\alpha$ . Analiza imagistică este pe baza semnalelor fluorescente celulare pentru identificarea celulelor pozitive. Se identifică celulele pozitive PR prin intensitatea medie. Se utilizează intensitatea totală la 575-640 nm din iodura de propidiu/ADN pentru a identifica celulele individuale. Ieșirea testului este % celule pozitive PR. Se determină IC<sub>50</sub> prin ajustarea pe o curbă logitică cu patru parametri, pentru fiecare ieșire utilizând GENE DATE<sup>™</sup>. Rezultatele acestui test nu demonstrează nici o activitate agonistică semnificativă a Exemplelor 1, 1A, și 1B în celulele MCF7 de cancer la sân. Pentru compușii testați, IC<sub>50</sub> relative în acest test sunt > 2 µM. Rezultatele acestui test nu demonstrează nici o activitate agonistică semnificativă a compușilor exemplificați testați în celulele MCF7 de cancer la sân. Aceste rezultate demonstrează de asemenea că compușii exemplificați testați sunt antagoniști ai ERA în celulele MCF7 de cancer la sân (adică, ei au activitate SERD).

#### **Test celular de inhibare PR $\alpha$ (antagonism funcțional ER $\alpha$ ) în celulele MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR**

Scopul următorului test celular de inhibare PR $\alpha$  (antagonism funcțional ER $\alpha$ ) este de a determina activitatea antagonistică a unui compus de testat împotriva receptorului ERA mutant Y537N. Un antagonist în acest test este de așteptat să blocheze funcționarea receptorului ERA. PR $\alpha$  este o țintă transcripțională în aval a ERA și prin urmare un antagonist al ERA este de așteptat să inhibe expresia PR $\alpha$ .

Se cultivă MCF7-ESR1 Y537N-682 (generat prin editarea genei CRISPR/Cas9 a genei ESR1 în celule MCF7, clona#682) în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS și 1% antibiotice penicilină/streptomycină și se plachează celulele (înainte de a deveni 70% confluențe) în plăci cu fund plat cu cu 384 de godeuri la o densitate de 4.000 celule pe godeu în mediu DMEM fără fenol roșu 10% FBS (20 µL volum) (cărbune stripat). Se incubează celulele peste noapte într-un incubator de cultură celulară (5% CO<sub>2</sub>, 95% umiditate relativă și 37°C) și se lasă celulele să se atașeze la placă. În următoarea zi se dozează celulele cu compusul de testat. Se utilizează un distribuitor acustic Echo 555 pentru a prepara diluții seriale ale compusului (1:3) într-un interval de la 6 µM până la 0,0003 µM. Se dozează celulele cu adăugarea a 5 µL din placa cu diluție serială la placa cu celule producând o concentrație DMSO finală de 0,2% cu o doză a concentrației finale a compusului de testat variind între 2 și 0,0001 µM. Pentru punctul maxim se utilizează mediul conținând 0,2% DMSO și pentru punctul minim, se utilizează fulvestrant diluat la concentrații finale de 2 µM în mediu de creștere conținând 0,2% DMSO. După dozarea cu compusul de testat, se incubează plăcile cu celule la 37°C și 5% CO<sub>2</sub> timp de 72 ore. Se fixează celulele prin adăugarea a 14% para-formaldehidă (10 µL) timp de 30 minute la temperatura camerei. Se spală celulele cu PBS (1 ×200 µL) și se incubează cu PBS (20 µL) conținând 0,5% (v/v) TWEEN<sup>®</sup> 20 timp de 1 oră. Se spală celulele cu PBS (2×20 µL), 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20, și se blochează cu 3% BSA/PBS 0,05% TWEEN<sup>®</sup> 20, 0,1% TRITON<sup>™</sup> X-100 (20 µL/godeu) timp de 1 oră la temperatura camerei. Se adaugă diluție 1:500 anticorp primar (20 µL) (anticorp PR monoclonal anti-uman de șoarece, clonă PgR 636 Dako, M3569) în 1% BSA/PBS 0,05 TWEEN<sup>®</sup> 20 pe godeu, se etanșează plăcile și se incubează peste noapte la 4°C.

În următoarea zi, se spală celulele cu PBS 0,05%<sup>®</sup> (2×20 µL) și se incubează cu anticorp secundar (20 µL/godeu) (diluție 1:1000, ALEXA FLUOR<sup>™</sup> 488 IgM anti-iepure de capră) în PBS 1% BSA timp de 105 minute la temperatura camerei. După spălarea cu PBS (2×20 µL), se adaugă RNază (20 µL de 50 µg/mL) (Sigma) și diluție 1:1000 iodură de propidiu în PBS pe godeu. Se etanșează plăcile și se incubează 1 oră la temperatura camerei pe bancă (ferite de lumină). Se scanează plăcile cu ACUMEN EXPLORER<sup>™</sup> [citometru cu placă fluorescentă cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD] pentru a măsura PR $\alpha$ . Analiza imagistică este pe baza semnalelor fluorescente celulare pentru identificarea celulelor pozitive. Se identifică celulele pozitive PR prin intensitatea medie. Se utilizează intensitatea totală la 575-640 nm din iodura de propidiu/ADN pentru a identifica celulele individuale. Ieșirea testului este % de celule pozitive PR. Se determină IC<sub>50</sub> prin ajustarea pe o curbă logistică cu patru parametri, pentru fiecare ieșire utilizând GENE DATE<sup>™</sup>.

Rezultatele acestui test demonstrează inhibarea potentă a PR $\alpha$  și antagonismul funcțional prin Exemplele 1, 1A, și 1B în celulele MCF7 (ESR1 Y537N, mutant heterozigot) de cancer la sân. Sunt prezentate IC<sub>50</sub> relative din Exemplele 1, 1A, și 1B (și altele) din acest test în Tabelul 9 de mai jos. IC<sub>50</sub> relative ale compușilor exemplificați testați, variază de la aproximativ 0,0118 la > 1,6 µM ceea ce indică faptul că compușii exemplificați sunt antagoniști potenți ai mutantului ERA (Y537N) și inhibitori puternici ai transcripției mediate de ERA, cu excepția Exemplului 2B 1,6 µM. PR $\alpha$  (PGR) este de

asemenea o țintă transcripțională a ERα și rezultatele din acest test demonstrează inhibarea potentă a transcripției Pra mediate de ERα.

**Tabelul 9: Test celular de inhibare a PRα (antagonism funcțional ERα) în celulele MCF7 Y537N 682 CRISPR**

# Exemplu	IC <sub>50</sub> relativă (μM)
1	0,01679 ± 0,00003, n=2
1A	1,20 ± 0,29, n=2
1B	0,0130 ± 0,0059, n=14
2	0,01451 ± 0,002619, n=2
2A	0,02494 ± 0,007386, n=3
2B	1,639 ± 0,2228, n=3
3	0,07717 ± 0,01154, n =2
3A	0,6117
3B	0,016
4	0,03854 ± 0,003865, n=2
4A	0,5052
4B	0,01181
5	0,06614 ± 0,01551, n=2
5A	0,3945
5B	0,01822 ± 0,009815, n=2
6	0,06319 ± 0,01609, n=2
6A	0,2364
6B	0,0136
7	0,1271
8	0,04124 ± 0,006572, n=2
8A	0,4335 ± 0,1946, n=3
8B	0,008926 ± 0,003828, n=3
10	0,007936 ± 0,003163, n=3

5 **Test celular de inhibare PRα (antagonism funcțional ERα) în celulele MCF7**

Scopul următorului test celular de inhibare a PRα (antagonism funcțional ERα) este de a determina activitatea antagonistică a unui compus testat împotriva receptorului ERα. Un antagonist în acest test este de așteptat să blocheze funcționarea receptorului ERα. PRα este o țintă transcripțională în aval a ERα și prin urmare un antagonist al ERα este de așteptat să inhibe expresia PRα.

10 Se efectuează condițiile de test cum s-a detaliat în testul Acumen pe bază celulară de degradare a ERα de mai sus, utilizând linia celulară MCF7 cu excepția faptului că, înainte de a testa distribuția compusului, se îndepărtează mediul din placa cu celule și se pretratează toate godeurile cu excepția godeurilor de control negativ (coloana 24 a plăcii) cu mediu de test conținând 0,47 nM estradiol timp de 30 minute. În acest test, se efectuează imunocolorarea pentru detecția de PRα și se scanează plăcile cu  
 15 ACUMEN EXPLORER™ [citrometru cu microplacă fluorescentă cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD] pentru a măsura PRα. Analiza imagistică este pe baza semnalelor fluorescente celulare pentru identificarea celulelor pozitive. Se identifică celulele pozitive Pra prin intensitatea medie. Se utilizează intensitatea totală la 575-640 din iodura de propidiu/ADN pentru a identifica celulele individuale. Ieșirea testului este % de celule pozitive PRα. Se determină IC<sub>50</sub> prin ajustarea pe o curbă  
 20 logistică cu patru parametri, pentru fiecare ieșire utilizând GENE DATE™. Rezultatele acestui test demonstrează inhibarea potentă a PRα și antagonismul funcțional prin Exemplele 1, 1A, și 1B în celulele MCF7 de cancer la sân. IC<sub>50</sub> relative din Exemplele 1, 1A, și 1B din acest test sunt prezentate în Tabelul 10 de mai jos. IC<sub>50</sub> relative ale compușilor exemplificați variază de la aproximativ 0,029 la >2 μM care arată că toți compușii exemplificați testați cu excepția 1A și 2B, sunt antagoniști potenți ai proteinei ERα

de tip sălbatic și inhibitori puternici ai transcripției mediate de ERα. PRα (PGR) este de asemenea o țintă transcripțională a ERα și rezultatele din acest test demonstrează inhibarea potentă a transcripției PRα mediate de ER la concentrația testată.

**Tabelul 10: Test celular de inhibare PRα (antagonism funcțional ERα) în celulele MCF7**

# Exemplu	IC <sub>50</sub> relativă (μM)
1	0,1283 ± 0,0226, n=3
1A	>2,000
1B	0,04129 ± 0,03370, n=16
2	0,1634
2A	0,1215 ± 0,05368, n=2
2B	>2,000
3	0,07666 ± 0,02101, n=3
3A	0,9274
3B	0,03435
4	0,07626 ± 0,1676, n=3
4A	0,8465
4B	0,02866
5	0,1180 ± 0,01230, n=2
5A	0,6002
5B	0,03203 ± 0,005306, n=2
6	0,08258 ± 0,005682, n=3
6A	0,2528
6B	0,02835
7	0,1134 ± 0,02087, n=2
8	0,06835 ± 0,02273, n=2
8A	0,2058
8B	0,04848 ± 0,02944, n=2
10	0,02633 ± 0,004459, n=3

5

#### Test de proliferare celulară în MCF7 și MCF7-ESR1 Y537N-682

Scopul următoarelor teste de proliferare celulară este în general de a detecta dacă un compus de testat are efecte asupra proliferării celulare.

Se însămânțează celule MCF7 (cumpărate de la ATCC HTB-22) la o densitate de 2.000 celule pe godeu în mediu DMEM fără fenol roșu 10% FBS (20 μL volum) (cărbune stripat) în plăci de cultură celulară cu fund clar cu 384 de godeuri. Placa MCF7-ESRY537N-682 (generată de gena CRISPR/Cas9 care editează gena ESR1 în celulele MCF7, clona#682) este în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS, și 1% antibiotice penicilină/streptomycină la o densitate de 1000 celule pe godeu. Se incubează plăcile la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. În următoarea zi se dozează celulele cu compusul de testat. Se utilizează un distribuitor acustic Echo 555 pentru a prepara diluții deriale ale compusului de testat (1:3) într-un interval de la 60 μM până la 0,003 μM. Se dozează celulele cu adăugarea a 5 μL din placa cu diluție serială la placa cu celule, producând o concentrație DMSO finală de 0,2% cu o doză a concentrației finale a compusului de testat variind între 20 și 0,001 μM. Pentru punctul maxim se utilizează mediu conținând 0,2% DMSO și pentru punctul minim se utilizează fulvestrant diluat la concentrații finale de 2 μM în mediu de creștere conținând 0,2% DMSO. După dozarea cu compusul de testat, se incubează plăcile cu celule la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. La șapte zile după adăugarea compusului de testat, se îndepărtează plăcile din incubator și se adaugă EtOH rece 96% (65 μL) la fiecare godeu. După 30 minute, se îndepărtează mediul și se adaugă RNază (20 μL de 50 μg/mL) (Sigma) și diluție 1:1000 iodură de propidiu în PBS pe godeu. Se etanșează plăcile și se incubează 1 oră la temperatura camerei pe bancă (ferite de lumină). Se scanează plăcile cu

10

15

20

ACUMEN EXPLORER™ [citometru cu microplacă fluorescent cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD]. Linia celulară MCF-7 crește formarea agregatelor, numărul de celule ca număr de obiecte putând să nu fie capabil pentru a fi utilizat ca citire; astfel, numărul de celule poate fi evaluat prin numărul de celule estimat (calculat prin parametrul ariei (raportul dintre aria totală a populației totale de celule (un interval desemnat de intensitate maximă a FL-1 (PI) și aria medie a populației de celule singure (definită de perimetru)). Se determină IC<sub>50</sub> prin ajustarea pe o curbă logistică cu patru parametri, pentru fiecare ieșire utilizând GENE DATE™. IC<sub>50</sub> relative din Exemplele 1, 1A, și 1B (și altele) în MCF7 ESR1 de tip sălbatic și celulele mutante MCF7-ESR1 Y537N sunt prezentate în Tabelul 10 de mai jos. Rezultatele acestui test demonstrează activitate anti-proliferativă puternică și creșterea inhibării celulare prin Exemplele 1, 1A, și 1B (și altele) în celulele MCF7 (ESR1 de tip sălbatic) și MCF7 (mutant ESR1 Y537N) de cancer la sân. IC<sub>50</sub> relative ale compușilor exemplificați variază de la aproximativ 0,0035 până la 1,176 μM în MCF7 ESR1 de tip sălbatic și de la 0,014 până la 1,86 μM în celulele MCF7 (mutant ESR1 Y537N) de cancer la sân care arată că toți compușii exemplificați testați demonstrează activitate anti-proliferativă puternică și creșterea inhibării celulare în celulele MCF7 (ESR1 de tip sălbatic) și MCF7 (mutant ESR1 Y537N) de cancer la sân.

**Tabelul 11: Test de proliferare celulară în MCF7 și MCF7-ESR1Y537N-682**

# Exemplu	IC <sub>50</sub> relative (μM) MCF7 ESR1 de tip sălbatic	IC <sub>50</sub> relative (μM) celule mutante MCF7 ESR1 Y537N
1	0,00768 ± 0,01263, n=3	0,0321 ± 0,0068, n=2
1A	1,18 + 0,68, n=4	1,86 + 1,03, n=4
1B	0,00349 ± 0,00225, n=11	0,0167 ± 0,0091, n=12
2	0,00425	0,05113
2A	0,00612	0,04284 ± 0,002666, n=2
2B	0,4053	0,7777
3	0,3287	0,02394
3A	0,303	0,6169 ± 0,1735, n=3
3B	0,008785	0,02144 ± 0,008938, n=3
4	0,02861	0,02664
4A	0,2862	0,5442 ± 0,2181, n=3
4B	0,003496	0,01433 ± 0,004925, n=3
5	0,08009	0,07252 + 0,02632, n=2
5A	0,4095	0,5167 + 0,09497, n=3
5B	0,007666	0,02131 + 0,01300, n=3
6	0,05128	0,02362
6A	0,0759	0,3234 ± 0,1758, n=3
6B		0,01539
7	0,01902	0,04479 ± 0,01188, n=2
8	0,04157	0,03290 ± 0,003002, n=2
8A	0,1743	0,6621 ± 0,1173, n=2
8B	0,005083	0,01419 ± 0,01108, n=2
10	0,004379	0,01059

**Test de inhibarea țintei (IVTI) *in vivo* (test PGR RT-qPCR) în tumorile MCF7**

Scopul acestui test IVTI este de a măsura abilitatea unui compus de testat (SERD) de a inhiba expresia genei (transcripție) Pra în aval de ERα în tumorile xenogrefă implantate la șoareci.

Șoarecilor NOD SCID femele (22-25 g) de la Envigo RMS, Inc., Madison, Wisconsin li se implantează 5 × 10<sup>6</sup> celule de cancer la sân pozitive ER MCF7 (ATCC, # HTB-22) subcutanat în flancul regiunii drepte în 1:1 soluție HBSS + MATRIGEL™ (200 μL). Li se implantează un pelet de 17- β

estradiol (0,18 mg/pelet, cu eliberare în 90 de zile, de la Innovative Research) subcutanat cu 1 zi înainte de implantarea celulei tumorale. Se măsoară creșterea tumorii și greutatea corporală de două ori pe săptămână începând cu cea de a șaptea zi după implantare. Când dimensiunile tumorii ating 250-350 mm<sup>3</sup>, se randomizează animalele și se grupează în grupuri de cinci animale. Se dozează animalele fie cu compusul de testat la multiple doze într-un vehicul specific al compusului de testat (1% hidroxietilceluloză/0,25% TWEEN<sup>®</sup> 80/0,05% antispumant în apă purificată) sau fie cu vehicul singur oral timp de 3 zile și se colectează tumorile și sângele la intervalele de timp dorite după ultima doză. Se sacrifică animalele utilizând anestezia cu izofluran plus dislocarea cervicală. Tumorile sunt congelate rapid și depozitate la -80°C până la procesarea pentru izolarea ARN și testul RT-qPCR. Se colectează sângele în tuburi EDTA, se rotesc pentru plasma, și se congelează la -80°C într-o placă cu 96 de godeuri. Se determină expunerea compusului de testat utilizând spectrometria de masă.

Se pulverizează tumorile în azot lichid și se lizează într-un tampon de lizare 1 × ARN (din trusele de izolare ARN) utilizând perle Matrix D (MP Biomedical, #6913-500) într-o mașină perturbatoare de celule FASTPREP-24<sup>™</sup> (MP Biomedical). Se transferă lizatele tumorale în tuburi proaspete după rotația la 14000 rpm timp de 20 minute la 4°C. Se izolează ARN-ul din lizatele tumorale utilizând mini trusa PURELINK<sup>®</sup> ARN (Invitrogen #12183018A) sau mini trusa RNeasy (Qiagen #74104 și #74106). Se îndepărtează contaminanții ADN utilizând setul Dnază PURELINK<sup>®</sup> (Invitrogen #12185010) sau setul Dnază fără RNază (Qiagen #79254). Se măsoară concentrația de ARN izolat prin diluarea mostrelor în apă fără RNază și se măsoară absorbanta la 260 nm pe un cititor de placă (SpectraMax190). Se scad măsurătorile medii de absorbanta la 260 nm ale martorului (numai apă fără RNază) din măsurătorile tuturor celorlalte mostre ARN la 260 nm. Se diluează mostrele ARN în concentrații egale în apă fără RNază. Se sintetizează ADNc din ARN diluat utilizând sistemul de sinteză al primei catene pentru RT-PCR (Invitrogen, #18080-051). Pentru a efectua RT-qPCR, se diluează mai întâi ADNc în apă fără RNază. Se combină un amestec 2× Absolute Blue qPCR ROX (Thermo, #AB-4139/A), inițiator PGR (Thermo, Hs01556702\_m1), și ADNc diluat pentru fiecare reacție într-o placă PCR (Applied Biosystems, #4309849). Se amplifică ADNc prin incubarea mostrelor timp de 2 minute la 50°C urmată de 15 minute la 95°C în termociclor (sistem de detecție al secvenței ABI Prism 7900HT). Se continuă incubarea la 95°C timp de 15 secunde urmată de 50°C timp de 60 secunde pentru un total de 40 cicluri. Ciclurile sunt normalizate la gena menajeră și sunt utilizate pentru a calcula % de inhibare PGR în comparație cu vehiculul singur. Se analizează fiecare mostră în duplicat și se utilizează numerele medii pentru calcule. Se calculează inhibarea procentuală țintă (PGR) utilizând Excel și XL Fit.

Rezultatele acestui test demonstrează că Exemplul IB inhibă expresia PRA (PGR) în modelul de xenogrefă tumorală. Exemplul IB inhibă expresia PRA (PGR) cu ~78% în modelul de xenogrefă tumorală timp de 24 ore cu o doză de 30 mg/kg când se administrează oral. Aceste rezultate demonstrează inhibarea semnificativă și susținută a activității antagoniste a ERA și a activității transcripționale mediate de ERA *in vivo* într-un model de xenogrefă tumorală.

#### **Studiu de inhibare a creșterii tumorale *in vivo* în modelele tumorale de xenogrefă de cancer la sân pozitiv ER (ESR1 de tip sălbatic) implantate în șoareci**

Scopul următorului test de inhibare tumorală a xenogrefei este de a măsura reducerea volumului tumoral ca răspuns la administrarea compusului de testat.

Se extind celulele de cancer la sân umane MCF7 (ATCC # HTB-22) și HCC1428 (ATCC # CRL-2327) în cultură, 5 × 10<sup>6</sup> celule sunt recoltate și injectate în soluție 1:1 HBSS+MATRIGEL<sup>™</sup> (200 μL) subcutanat pe flancul drept din spate al șoarecilor NOD SCID femele (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Cu douăzeci și patru de ore înainte de implantarea celulelor, se implantează subcutanat peleți estrogeni (0,18 mg/pelet, 17β estradiol, cu eliberare în 90 de zile, Innovative Research). Se extind celulele de cancer la sân uman T47D (ATCC # HTB-22) în cultură, se recoltează și se injectează subcutanat 5 × 10<sup>6</sup> celule în soluție 1:1 HBSS+MATRIGEL<sup>™</sup> (200 μL) pe flancul drept din spate al șoarecilor femele NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Cu douăzeci și patru de ore înainte de implantarea celulelor, se implantează subcutanat peleți estrogeni (0,38 mg/pelet, 17β estradiol, cu eliberare în 90 de zile, Innovative Research). Se extind celule de cancer la sân uman ZR-75-1 (ATCC # CRL-1500) în cultură, se recoltează și se injectează subcutanat 5 × 10<sup>6</sup> celule în soluție 1:1 HBSS+MATRIGEL<sup>™</sup> (200 μL) pe flancul drept din spate al șoarecilor femele NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Cu douăzeci și patru de ore înainte de implantarea celulelor, animalelor le este administrată o injecție intramusculară de 50 μl de valerat de estradiol (Delestrogen<sup>®</sup>) (10 mg/mL) și apoi o dată la fiecare 14 zile pe durata studiului. Se măsoară creșterea tumorii și greutatea corporală de două ori pe săptămână începând cu cea de a șaptea zi după implantare. Când dimensiunile tumorii ating 250-350 mm<sup>3</sup>, se randomizează animalele și se grupează în grupuri de 5 animale. Se prepară compusul de testat, Exemplul IB într-un vehicul adecvat (1% hidroxietilceluloză/0,25% TWEEN<sup>®</sup> 80/0,05% antispumant în apă purificată) și se administrează prin gavaj oral timp de 28 zile, QD. Se determină răspunsul tumorii prin măsurarea volumului tumoral

efectuată de două ori pe săptămână în decursul tratamentului. Se ia greutatea corporală ca măsură generală de toxicitate ori de câte ori este măsurat volumul tumoral.

Compusul din Exemplul 1B este găsit ca având valori % T/C delta cum s-au prevăzut în Tabelul 12 de mai jos. Aceste rezultate indică că compusul din Exemplul 1B demonstrează o bună biodisponibilitate orală la șoareci și activitate antitumorală semnificativă sau regresia tumorii în modelele de xenogrefă de cancer la sân uman (ESR1 de tip sălbatic) pozitiv ER.

**Tabelul 12: Studiu de inhibare a creșterii tumorale *in vivo* în modelele tumorale de xenogrefă de cancer la sân pozitiv ER implantate în șoareci**

Model tumoral	Doză (mg/kg)	T/C% delta sau % regresie	Valoare p
MCF7 (xenogrefă de cancer la sân)	3	-26	0,001 *
	10	-46	<0,001 *
	30	-36	<0,001 *
T47D (xenogrefă de cancer la sân)	3	30	0,008*
	10	-11	<0,001 *
	30	-28	<0,001 *
ZR-75-1 (xenogrefă de cancer la sân)	3	4	<0,001 *
	10	0	<0,001 *
	30	19	<0,001 *
HCC1428 (xenogrefă de cancer la sân)	10	-45	<0,001 *
	30	-22	<0,001 *

Analiza pentru volumul tumoral este pe baza Log 10 și structurii covariante de putere spațială.

\* : semnificativ ( $p < 0,05$ ) în comparație cu controlul cu vehicul.

% T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control.  $T_0$  și  $C_0$  sunt volumele tumorale medii ale liniei de bază în acele grupuri.

% regresie este calculată când volumul obiectivului final este sub linia de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / T_0$ , unde  $T_0$  este volumul tumoral mediu al liniei de bază pentru grupul tratat.

Media mare a tuturor grupurilor față de linia de bază (randomizare) în ziua 32 este utilizată pentru a calcula % modificare din T/C.

**Studiu de inhibare a creșterii tumorale *in vivo* la modelul tumoral PDX de cancer la sân (ST941/HI) al mutantului ESR1 (Y537S) implantat la șoareci**

Scopul următorului test de inhibare a tumorii xenogrefei este de a măsura reducerea volumului tumoral ca răspuns la administrarea compusului de testat într-un model de xenogrefă derivat de la pacientul cu cancer la sân (PDX) independent hormonal și mutant ESR1 (HI).

Modelul ST941/HI PDX a fost derivat la, și rulat la South Texas Accelerated Research Therapeutics (San Antonio, TX). Fragmentele tumorale au fost recoltate de la animalele gazdă și implantate în șoarecii imuno-deficienți (The Jackson Laboratory) și studiul a fost inițiat la un volum tumoral mediu de aproximativ 125-250 mm<sup>3</sup>. Se prepară compusul de testat, Exemplul 1B într-un vehicul adecvat (1% hidroxietilceluloză/0,25% TWEEN® 80/0,05% antispumant în apă purificată) și se administrează prin gavaj oral timp de 28 zile. Se determină răspunsul tumorii prin măsurarea volumului tumoral efectuată de două ori pe săptămână în decursul tratamentului. Se ia greutatea corporală ca măsură generală de toxicitate ori de câte ori este măsurat volumul tumoral.

Compusul din Exemplul 1B este găsit ca având valori % T/C delta cum s-au prevăzut în Tabelul 13 de mai jos. Aceste rezultate au indicat că compusul din Exemplul 1B demonstrează o bună biodisponibilitate orală la șoareci și activitate antitumorală semnificativă sau regresia tumorii într-un model PDX de cancer la sân uman mutant ESR1 (Y537S).

**Tabelul 13: Studiu de inhibare a creșterii tumorale *in vivo* în modelul tumoral PDX de cancer la sân mutant ESR1 implantate la șoareci**

Model tumoral	Doză (mg/kg)	Program	% T/C delta sau % regresie	Valoare p
ST941C/HI	3	QD	66	0,213
(model PDX de cancer de sân)	10	QD	15	<0,001 *

Model tumoral	Doză (mg/kg)	Program	% T/C delta sau % regresie	Valoare p
mutant ESR1)	30	QD	6	<0,001 *

Analiza pentru volumul tumoral este pe baza Log 10 și structurii covariante SpatialPower.  
 \* : semnificativ (p<0,05) în comparație cu controlul cu vehicul.  
 % T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control. T<sub>0</sub> și C<sub>0</sub> sunt volumele tumorale medii ale liniei de bază în acele grupuri.  
 % regresie este calculată când volumul obiectivului final este sub linia de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / T_0$ , unde T<sub>0</sub> este volumul tumoral mediu al liniei de bază pentru grupul tratat.

Media mare a tuturor grupurilor față de linia de bază (randomizare) în ziua 32 este utilizată pentru a calcula % modificare din T/C.

#### Studii de combinație

- 5 Din cauza eterogenității tumorii și rezistenței dobândite la terapiile endocrine, terapia de combinație a devenit esențială în tratamentul cancerului la sân avansat/metastatic pentru terapia eficientă sau pentru a depăși rezistența dobândită. Noi am testat efectul combinației din Exemplul 1B cu inhibitorul CDK4/6 abemaciclib, inhibitorul mTOR everolimus, inhibitorul PI3CA alpelisib și inhibitorul PI3K/mTOR 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]chinolin-2-onă („Compus A”) în cinci linii celulare de cancer la sân pozitiv ER *in vitro*.

#### Test de viabilitate celulară pentru studii de combinație

Se însămânțează celulele la densitatea prezentată în Tabelul 14 de mai jos în 20 μL volum de mediu descris în tabel într-o placă de cultură celulară cu fund clar cu 384 de godeuri.

**Tabelul 14: Informații despre linia celulară de analiză a viabilității celulare**

Linie celulară	Densitate de însămânțare	Referință comercială	Mediu de cultură	Timp de fixare (ore)
T-47D	1000	ATCC HTB-133	RMPI 10% FBS 1% P/S, 0,008 mg/mL insulină bovină	72
MCF-7	1000	ATCC HTB-22	DMEM 10% FBS 1% P/S 0,01 mg/mL insulină umană	96
EFM-19	3000	ACC 231	RMPI 10% FBS 1% P/S	144
ZR-75-1	1000	ATCC CRL-1500	RMPI 10% FBS 1% P/S	144
BT-474	1000	ATCC HTB-20	HYBRI-CARE (1 L H <sub>2</sub> O, 1,5 g/L bicarbonat de sodiu, 10% FBS, 1% P/S)	144
ZR-75-30	1000	ATCC CRL-1504	RMPI 10% FBS 1% P/S	240

- 15 Se incubează plăcile la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. În următoarea zi se dozează celulele cu compusul de testat, Exemplul 1B.

- Se prepară compușii ca 10 mM soluții stoc de DMSO și se utilizează pentru un studiu de răspuns la doză cu concentrația maximă începând la 10 sau 1 μM, doi compuși testați împreună la un raport fixat, și apoi se prepară diluție serială de diluții seriale 1:3 precum și compuși singuri pentru determinarea IC<sub>50</sub> cu o concentrație de început de 20 μM. Se dozează celulele cu adăugarea a 5 μL din placa de diluție serială la placa cu celule, producând o concentrație DMSO finală de 0,2% cu o doză a concentrației finale a compusului de testat variind între 20 și 0,001 μM pentru tratamentul singur sau un interval mai scăzut pentru combinații. Pentru punctul maxim se utilizează mediu conținând 0,2% DMSO și pentru punctul minim se utilizează staurosporină diluată la concentrații finale de 2 μM în mediu de creștere conținând 0,2% DMSO. După dozarea cu compusul de testat, se incubează plăcile cu celule la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. După două intervale duble de incubare cu compușii, se îndepărtează plăcile din incubator și se adaugă EtOH rece 96% (65 μL) la fiecare godeu. După 30 minute, se îndepărtează mediul și se adaugă RNază (20 μL de 50 μg/mL) (Sigma) și diluție 1:1000 iodură de propidiu în PBS pe godeu. Se etanșează plăcile și se incubează 1 oră la temperatura camerei (ferite de lumină). Se scanează plăcile cu ACUMEN EXPLORER™ [citometru cu microplacă fluorescență cu scanare cu laser fabricat de TTP LABTECH LTD]. Deoarece unele linii celulare cresc formarea agregatelor, numărul de celule ca număr de obiecte poate să nu fie capabil să fie utilizat ca citire; astfel, populația ariei totale (un interval desemnat de

intensitate maximă a FL-1 (PI)) sau intensitatea totală a PI sunt utilizate pentru a evalua numărul de celule.

Datele de combinație *in vitro* sugerează sinergie (cum s-a definit mai jos) cu combinația din Exemplul 1B cu abemaciclib, sau cu everolimus în 5 din 5 linii celulare de cancer la sân pozitiv ER așa cum se arată în Tabelul 15. Combinația din Exemplul 1B cu Compusul A este sinergică în 4 din 4 linii celulare testate de cancer la sân pozitiv ER. Efectul combinației din Exemplul 1B cu alpelisib este aditiv în 2 din 4 linii celulare de cancer la sân pozitiv ER și sinergic în 2 din 4 linii celulare de cancer la sân pozitiv ER.

**Tabelul 15: Combinația *in vitro* din Exemplul 1B cu alți agenți țintiți în liniile celulare de cancer la sân pozitiv ER**

Linie celulară de cancer la sân	Tratament 1	Tratament 2	Indice de combinație (CI <sub>50</sub> )	Interpretare statistică	Interpretare biologică
MCF7	Exemplul 1B	Abemaciclib	0,2675	Sinergic	Aditiv
		Everolimus	0,0389	Sinergic	Sinergic
T47D	Exemplul 1B	Abemaciclib	0,2693	Sinergic	Sinergic
		Everolimus	0,0609	Sinergic	Sinergic
		Alpelisib	0,0818	Sinergic	Sinergic
		Compus A	0,2401	Sinergic	Sinergic
ZR-75-1	Exemplul 1B	Abemaciclib	0,2067	Sinergic	Sinergic
		Everolimus	0,1853	Sinergic	Sinergic
		alpelisib	1,3717	Aditiv	Aditiv
		Compus A	0,3768	Sinergic	Sinergic
ZR-75-30	Exemplul 1B	Abemaciclib	0,3960	Sinergic	Sinergic
		Everolimus	0,1248	Sinergic	Sinergic
		Alpelisib	0,4149	Aditiv	Aditiv
		Compus A	0,7098	Sinergic	Sinergic
EFM-19	Exemplul 1B	Abemaciclib	0,3455	Sinergic	Sinergic
		Everolimus	0,5033	Sinergic	Aditiv
		Alpelisib	0,2963	Sinergic	Sinergic
		Compus A	0,4326	Sinergic	Sinergic

#### Analiza datelor și interpretarea efectului de combinație

Se utilizează metode care sunt publicate în literatură pentru a calcula efectul de combinație *in vitro* (L. Zhao, și colab, Front Biosci, 2010, 2:241-249 și L. Zhao, și colab, Clin Cancer Res, 2004, 10(23):7994-8004). Pentru a identifica interacțiunile sinergice sau antagonice între două medicamente, a fost efectuată o analiză de deplasare a curbei utilizând un șablon XL customizat cu adăugarea de XLFit 5. Curbele cu un singur agent sunt ajustate utilizând o regresie logistică cu 4 parametri. Criteriile și restricțiile utilizate pentru ajustare sunt (i) părțile de jos < (-20) sunt fixate până la 0 și (ii) partea de sus >120 fixată până la 100. Dacă toate observațiile sunt mai scăzute decât un prag setat de utilizator, atunci este efectuată o constantă de ajustare cu panta = 0 și IC<sub>50</sub> este considerată mai ridicată decât concentrația maximă inclusă. Odată ce a fost obținută IC<sub>50</sub> absolută a fiecărui agent singur, concentrația echivalentă la 50% din activitate este calculată pentru agentul singur și combinație. Utilizând aceste concentrații echivalente împreună cu activitățile măsurate am recalculat o IC<sub>50</sub> absolută, curba pentru agenții singuri va atinge 50% din activitate la valori de concentrații echivalente egale cu 1, în timp ce combinațiile sinergice vor atinge 50% la valori mai scăzute conducând la o deplasare spre stânga, și combinațiile antagonice va prezenta o deplasare spre dreapta. Concentrațiile echivalente sunt de asemenea utilizate pentru a calcula CI<sub>50</sub> (indice de combinație la 50% din activitate), unde CI<sub>50</sub> este egal cu IC<sub>50</sub> absolut a curbei de combinație. Împreună cu CI<sub>50</sub> se pot calcula alți CI (indici de combinație) la diferite procentaje de activitate (CI<sub>10</sub>, CI<sub>20</sub>, CI<sub>30</sub>, CI<sub>40</sub>, CI<sub>60</sub>, CI<sub>70</sub>, CI<sub>80</sub>, CI<sub>90</sub>). Pentru a calcula CI<sub>nn</sub>, este calculată concentrația echivalentă la diferite procentaje de activitate. Pentru fiecare procentaj de activitate am calculat marginea

de eroare care este intervalul de încredere la 95% și utilizând acest interval de încredere am calculat limita superioară ca adăugarea marginii de eroare la CI și limita inferioară ca scăderea marginii de eroare din CI. Limita superioară = CI+Interval de încredere 95% și Limita inferioară = CI-Interval de încredere 95%. Aceste limite sunt apoi utilizate pentru a interpreta rezultatele.

5 Interpretarea statistică la fiecare procentaj de activitate este după cum urmează:

Limita inferioară <1 și limita superioară > 1	Aditiv
Limita superioară <1	Sinergic
Limita inferioară >1	Antagonist

Interpretarea biologică la fiecare procentaj de activitate este după cum urmează:

$CI_{nn} < 0,5$	Sinergic
$CI_{nn} > 0,5$ și $CI_{nn} < 2$	Aditiv
$CI_{nn} > 2$	Antagonist

### Studii de combinație *in vivo*

10 Din cauza eterogenității tumorii și rezistenței dobândite la terapiile endocrine, terapia de  
 combinație a devenit esențială în tratamentul cancerului la sân avansat/metastatic pozitiv ER pentru  
 terapia eficientă sau pentru a depăși rezistența dobândită. Se presupune că o combinație de terapii țintite  
 are potențialul de a fi mai eficientă în încetinirea sau chiar oprirea cancerului la sân pozitiv ER.  
 15 Combinația de inhibitori CDK4/6 și fulvestrant a fost aprobată pentru tratamentul cancerului la sân  
 metastatic pozitiv ER dar un procentaj mare al pacienților dezvoltă rezistență din cauza mutațiilor  
 dobândite în ESR1 sau PIK3CA. Ca degradant potent și antagonist al ERα, SERD oral cum ar fi Exemplul  
 1B are potențialul de a fi mai eficient în încetinirea sau oprirea mutantului ESR1 sau cancerului la sân  
 mutant PIK3CA ca agent singur sau în combinație cu un inhibitor CDK4/6 cum ar fi abemaciclib sau cu  
 un inhibitor PI3K/mTOR cum ar fi Compusul A. În acel context, compusul din Exemplul 1B este testat  
 20 pentru inhibarea creșterii tumorale în combinație cu abemaciclib (brevet de referință) sau cu Compusul A  
 (brevet de referință). Mai specific, compusul din Exemplul 1B este testat în combinație cu abemaciclib  
 sau Compusul A în ESR1 de tip sălbatic și modelul de xenogrefă de cancer la sân MCF7 mutant PIK3Ca.

Se extind celulele de cancer la sân uman MCF7 (ATCC # HTB-22) în cultură, se recoltează și se  
 injectează subcutanat  $5 \times 10^6$  celule în 1:1 soluție HBSS+MATRIGEL™ (200 μL) pe flancul drept din  
 25 spate al șoarecilor femele NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Cu douăzeci și patru de ore înainte de  
 implantarea celulelor, se implantează subcutanat peleți estrogeni (0,18 mg/pelet, 17β estradiol, cu  
 eliberare la 90 de zile, Innovative Research). Se măsoară creșterea tumorii și greutatea corporală de două  
 ori pe săptămână începând cu cea de a șaptea zi după implantare. Când dimensiunile tumorii ating 250-  
 350 mm<sup>3</sup>, se randomizează animalele și se grupează în grupuri de 5 animale. Se prepară compusul de  
 30 testat din Exemplul 1B într-un vehicul adecvat (1% hidroxietilceluloză/0,25% TWEEN® 80/0,05%  
 antispumant în apă purificată) și se administrează prin gavaj oral timp de 42 zile. Inhibitorul CDK4/6  
 (abemaciclib) este formulat în 1% HEC în 25 mM tampon de fosfat de sodiu, pH 2,0. Inhibitorul  
 PI3K/mTOR (Compusul A) a fost formulat în 1% hidroxietilceluloză/0,25% TWEEN® 80/0,05%  
 antispumant în apă purificată. Se determină răspunsul tumorii din măsurarea volumului tumoral efectuată  
 35 de două ori pe săptămână în decursul tratamentului. Se ia greutatea corporală ca măsură generală a  
 toxicității ori de câte ori este măsurat volumul tumoral. Volumul tumoral este estimat prin utilizarea  
 formulei  $v = l \times w^2 \times 0,535$  unde  $l$  = cel mai mare diametru măsurat și  $w$  = cel mai mic diametru  
 perpendicular.

### Analiza statistică

40 Datele de analiză statistică ale volumului tumoral încep cu o transformare a datelor la o scală  
 logaritmice pentru a egaliza varianța de-a lungul timpului și grupurilor de tratament. Datele de volum  
 logaritmice sunt analizate cu o analiză a varianței cu măsurători repetate bidirecționale în timp și  
 tratamentul utilizând proceduri MIXED în software-ul SAS (versiunea 9.3). Modelul de corelație pentru  
 măsurătorile repetate este Spatial Power. Grupurile tratate sunt în comparate cu grupul de control la  
 45 fiecare moment de timp. Procedura MIXED este de asemenea utilizată separat pentru fiecare grup de  
 tratament pentru a calcula mediile ajustate și erorile standard la fiecare moment de timp. Ambele analize  
 iau în considerare pentru autocorelația în cadrul fiecărui animal și pierderea de date care apare când  
 animalele cu tumori mari sunt îndepărtate devreme din studiu. Mediile ajustate și erorile standard (s.e.)  
 sunt reprezentate grafic pentru fiecare grup de tratament versus timp. Analiza volumului tumoral este pe

baza  $\log_{10}$  și structurii covariante de putere spațială. Valoarea p este pe baza comparației între două grupări specifice.

**Metodă de analiză combinată (bună independentă pentru studiile IVEF)**

Mai întâi, modelul de măsurători repetate uzuale este ajustat la volumul logaritmic versus grup și timp. Apoi declarațiile contrastante sunt utilizate pentru a testa efectul interacțiunii la fiecare moment de timp utilizând 2 tratamente specifice care sunt combinate. Acest lucru este echivalent cu metoda bune independente și presupune că volumele tumorale pot, în teorie, atinge zero, adică, regresia completă. Răspunsul aditiv așteptat (EAR) pentru combinație este calculat pe scara volumului tumoral ca: răspuns (EAR) volum  $EAR = V1 * V2/V0$ , unde  $V0$ ,  $V1$ , și  $V2$  sunt volumele tumorale medii estimate pentru controlul cu vehicul, tratamentul 1 singur, și tratamentul 2 singur, respectiv. Dacă testul de interacțiune este semnificativ, efectul combinației este declarat statistic mai mult decât aditiv sau mai puțin decât aditiv depinzând de volumul mediu al combinației observate ca fiind mai mic ca, sau mai mare ca volumul EAR, respectiv. Altfel, concluzia statistică este aditivă. În plus, un interval relevant biologic de aditivitate poate fi definit ca X% peste și sub volumul EAR. De obicei, X ar fi de 25 până la 40%. Apoi poate fi făcută o concluzie biologică pentru combinație ca mai mult decât aditivă, aditivă, sau mai puțin decât aditivă, dacă volumul mediu al combinației observate este sub, în, sau peste intervalul de aditivitate.

Pot exista situații în care staza este cel mai bun răspuns așteptat. În acele situații, buna metodă poate fi aplicată direct valorilor % T/C delta pentru a obține un răspuns procentual EAR: % T/C delta  $EAR = Y1 * Y2/100$ , unde  $Y1$  și  $Y2$  sunt valorile procentuale T/C delta pentru tratamentele cu un singur agent. În prezent, nu există nici un test statistic pentru a compara % T/C delta observat în grupul de combinație versus EAR, dar se pot aplica criteriile biologice descrise mai sus.

Așa cum se arată în Tabelele 15 și 16, tratamentul cu Exemplul 1B sau abemaciclib singur ca agent singur a condus la 32% (%dT/C = -32) și 52% (%dT/C = -52) regresii tumorale respectiv și ambele sunt statistic semnificative ( $p < 0,001$ ) în comparație cu controlul cu vehicul. Eficacitatea de combinație din Exemplul 1B cu abemaciclib a fost „mai puțin decât aditiv” dar eficacitatea de combinație din Exemplul 1B plus abemaciclib a fost semnificativ mai bună decât Exemplul 1B singur ( $p < 0,001$ ). Totuși, eficacitatea agentului singur abemaciclib nu a fost semnificativă statistic din combinația ( $P=0,055$ ). Combinația este tolerată la animale fără pierderea semnificativă a greutateii corporale.

**Tabelul 15: Eficacitatea combinației din Exemplul 1B cu abemaciclib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO	0,628	0,0658	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Abemaciclib, 50 mpk, QD × 42, PO	0,479	0,0658	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD × 42, PO	0,756	0,0658	<0,001 *
Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD × 42, PO	0,128	0,0658	0,055
Abemaciclib, 50 mpk, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD × 42, PO	0,278	0,0658	<0,001 *

<sup>b</sup>Diferență=Tratament 1 - Tratament 2; \* Valoare p: semnificativă ( $p < 0,05$ )  
SE – Eroare standard

**Tabelul 16: Eficacitatea combinației din Exemplul 1B cu abemaciclib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Vehicul	NA	NA		
Exemplul 1B	-32	<0,001 *		
Abemaciclib	-52	<0,001 *		
Exemplul 1B / Abemaciclib (Combinație)	-64	<0,001 *	Mai puțin decât aditiv	Nici o modificare semnificativă
Analiza pentru volumul tumoral este pe baza $\log_{10}$ și structurii covariante a puterii spațiale.				

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
* Valoare p: semnificativă (p < 0,05); NA: neaplicabilă % T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază; și % regresie este calculată pentru volumul tumoral de sub linia de bază. Formula este $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control. T <sub>0</sub> și C <sub>0</sub> sunt volumele tumorale medii la linia de bază în acele grupuri.				

5 Așa cum se arată în Tabelele 17 și 18, tratamentul cu Exemplul 1B sau Compusul A singur ca agent singur a condus la 32% (%dT/C = -32) și 36% (%dT/C = -36) regresii tumorale respectiv și ambele sunt semnificative statistic (p < 0,001) în comparație cu controlul cu vehicul. Eficacitatea combinației din Exemplul 1B cu Compusul A a fost „mai puțin decât aditivă” dar eficacitatea combinației din Exemplul 1B plus Compusul A a fost semnificativ mai bună decât cea din Exemplul 1B singur (p < 0,001) sau cu Compusul A singur (p=0,002\*). Combinația este tolerată la animale fără pierderea semnificativă a greutății corporale.

10 **Tabelul 17: Eficacitatea combinației din Exemplul 1B cu Compusul A în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO	0,479	0,0759	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Compus A, 7,5 mpk, BID × 42, PO	0,504	0,0759	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Compus A, 7,5 mpk, BID × 42, PO	0,761	0,0791	<0,001 *
Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Compus A, 7,5mpk, BID × 42, PO	0,282	0,0791	<0,001 *
Compus A, 7,5 mpk, BID × 42, PO	Exemplul 1B, 10 mpk, QD × 42, PO / Compus A, 7,5 mpk, BID × 42, PO PO	0,257	0,0791	0,002 *
<sup>b</sup> Diferență=Tratament 1 - Tratament 2; * Valoare p: semnificativă (p < 0,05) SE – Eroare standard				

**Tabelul 18: Eficacitatea combinației din Exemplul 1B cu abemaciclib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Vehicul	NA	NA		
Exemplul 1B	-32	<0,001 *		
Compus A	-36	<0,001 *		
Exemplul 1B /Compus A (Combinație)	-65	<0,001 *	Mai puțin decât aditiv	Nici o modificare semnificativă
Analiza pentru volumul tumoral este pe baza Log <sub>10</sub> și structurii covariante a puterii spațiale. * Valoare p: semnificativă (p < 0,05); NA: neaplicabil % T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază; și % regresie este calculată pentru volumul tumoral de sub linia de bază. Formula este $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control. T <sub>0</sub> și C <sub>0</sub> sunt volumele tumorale medii la linia de bază în acele grupuri.				

15 Așa cum se arată în Tabelele 19 și 20, tratamentul cu Exemplul 10 sau abemaciclib singur ca agent singur a condus la 51% (%dT/C = -51) și 70% (%dT/C = -70) regresii tumorale respectiv și ambele sunt semnificative statistic (p < 0,001) în comparație cu controlul cu vehicul. Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu abemaciclib a fost „mai puțin decât aditivă” dar eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus abemaciclib a fost semnificativ mai bună decât cea din Exemplul 10 singur (p = 0,039). Totuși, eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus abemaciclib nu a fost semnificativ diferită de cea a

abemaciclib singur ( $p=0,905$ ). Combinația este tolerată la animale fără pierderea semnificativă a greutateii corporale.

**Tabelul 19: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu abemaciclib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
Vehicul, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,659	0,113	<0,001 *
Vehicul, QD x 42, PO	Abemaciclib 50 mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1054	<0,001 *
Vehicul, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,672	0,1054	<0,001 *
Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,013	0,1103	0,905
Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,227	0,1054	0,039*

<sup>b</sup> Diferență=Tratament 1 - Tratament 2; \* Valoare p: semnificativă ( $p < 0,05$ )  
SE – Eroare standard

5 **Tabelul 20: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu abemaciclib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Vehicul	NA	NA		
Exemplul 10	-51	<0,001 *		
Abemaciclib	-70	<0,001 *		
Exemplul 10 / Abemaciclib (Combinație)	-71	<0,001 *	Mai puțin decât aditiv	Nici o modificare semnificativă

Analiza pentru volumul tumoral este pe baza  $\text{Log}_{10}$  și structurii covariante a puterii spațiale.  
\* Valoare p: semnificativă ( $p < 0,05$ ); NA: neaplicabil  
% T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază; și % regresie este calculată pentru volumul tumoral de sub linia de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control.  $T_0$  și  $C_0$  sunt volumele tumorale medii ale liniei de bază în acele grupuri.

Așa cum se arată în Tabelele 21 și 22, tratamentul cu Exemplul 10 sau alpelisib singur ca agent singur a condus la 51% ( $\%dT/C = -51$ ) și 21% ( $\%dT/C = -21$ ) regresii tumorale respectiv și ambele sunt semnificative statistic ( $p < 0,001$  și  $p = 0,013$ ) în comparație cu controlul cu vehicul. Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu alpelisib a fost „aditivă” și eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus alpelisib a fost semnificativ mai bună decât cea din Exemplul 10 singur ( $p = 0,009$ ). Eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus alpelisib a fost de asemenea semnificativ mai bună decât cea a alpelisib singur ( $p = <0,001$ ). Combinația este tolerată la animale fără pierderea semnificativă a greutateii corporale.

15 **Tabelul 21: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu alpelisib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
Vehicul, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,241	0,1121	<0,039*
Vehicul, QD x 42, PO	Alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1121	<0,001 *
Vehicul, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,755	0,1121	<0,001 *
Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk	0,514	0,1121	<0,001

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
	(d8-42), mpk, QD × 42, PO			
Alpelisib 15 mpk (d1-d7), 10 mpk (d8-42), mpk, QD × 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7), 10 mpk (d8-42), mpk, QD × 42, PO	0,310	0,1121	0,009*

<sup>b</sup> Diferență=Tratament 1 - Tratament 2; \* Valoare p: semnificativă (p < 0,05)  
SE – Eroare standard

**Tabelul 22: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu alpelisib în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Vehicul	NA	NA		
Exemplul 10	-51	<0,001 *		
alpelisib	-21	<0,013*		
Exemplul 10 /alpelisib (Combinație)	-76	<0,001 *	Aditiv	Nici o modificare semnificativă

Analiza pentru volumul tumoral este pe baza Log<sub>10</sub> și structurii covariante a puterii spațiale.

\* Valoare p: semnificativă (p < 0,05); NA: neaplicabil

% T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau peste volumul tumoral al liniei de bază; și % regresie este calculată pentru volumul tumoral de sub linia de bază. Formula este  $100^* (T-T_0)/(C-C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control. T<sub>0</sub> și C<sub>0</sub> sunt volumele tumorale medii ale liniei de bază în acele grupuri.

5 Așa cum se arată în Tabelele 23 și 24, tratamentul cu Exemplul 10 sau everolimus singur ca agent singur a condus la 51% (%dT/C = -51) și 50% (%dT/C = -50) regresii tumorale respectiv și ambele sunt semnificative statistic (p < 0,001 și p < 0,001) în comparație cu controlul cu vehicul. Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu everolimus a fost „aditivă” și eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus everolimus a fost semnificativ mai bună decât cea din Exemplul 10 singur (p = 0,004). Eficacitatea combinației din Exemplul 10 plus alpelisib a fost de asemenea semnificativ mai bună decât cea a everolimus singur (p=0,04). Combinația este tolerată la animale fără pierderea semnificativă a greutății corporale.

**Tabelul 23: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu everolimus în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament 1	Tratament 2	Diferență <sup>b</sup>	SE	Valoare p
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO	0,445	0,0999	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Everolimus, 5 mpk, QD × 42, PO	0,433	0,1038	<0,001 *
Vehicul, QD × 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD × 42, PO	0,748	0,0999	<0,001 *
Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD × 42, PO	0,303	0,0999	0,004*
Everolimus, 5 mpk, QD × 42, PO	Exemplul 10, 15 mpk, QD × 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD × 42, PO	0,315	0,138	0,004*

<sup>b</sup> Diferență=Tratament 1 - Tratament 2; \* Valoare p: semnificativă (p < 0,05)  
SE – Eroare standard

**Tabelul 24: Eficacitatea combinației din Exemplul 10 cu everolimus în modelul de cancer la sân pozitiv ER MCF7**

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Vehicul	NA	NA		
Exemplul 10	-51	<0,001 *		

Tratament	% T/C delta sau % regresie	Valoare p	Efect combinație	Greutate corporală
Everolimus	-50	<0,001 *		
Exemplul /Everolimus (Combinație)	10 -76	<0,001 *	Aditiv	Nici o modificare semnificativă

Analiza pentru volumul tumoral este pe baza Log<sub>10</sub> și structurii covariante de putere spațială.  
 \* Valoare p: semnificativă (p < 0,05); NA: neaplicabil  
 % T/C delta este calculat când volumul tumoral al obiectivului final într-un grup tratat este la, sau volumul tumoral al liniei de bază; și % regresie este calculată pentru volumul tumoral de sub linia de bază. Formula este  $100 * (T - T_0) / (C - C_0)$ , unde T și C sunt volumele tumorale medii ale obiectivului final în grupul tratat sau respectiv de control. T<sub>0</sub> și C<sub>0</sub> sunt volumele tumorale medii ale liniei de bază în acele grupuri.

#### Test de biodisponibilitate orală pe șobolani

Scopul următorului test este de a demonstra dacă un compus de testat este biodisponibil oral.

5 Se administrează compusul de testat la șobolani Sprague-Dawley IV la 1 mg/kg (utilizând vehicul de: 20% CAPTISOL® în 25 mM tampon de fosfat de sodiu, pH2 *quantum satis*; sau de 25% DMA, 15% EtOH, 10% propilen glicol, 25% 2-pirolidonă, și 25% apă purificată) și PO la 10 mg/kg (utilizând un vehicul de 1% hidroxietil celuloză, 0,25% polisorbitat 80, 0,05% antispumant 1510-US, și apă purificată *quantum satis*). Se colectează probe de sânge seriale la 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, și 12 ore post doză pentru bolus IV și la 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, și 12 ore post doză după administrarea orală. După tratamentul cu un coagulant EDTA, se obține plasma prin centrifugare și se depozitează la -70°C până la  
 10 analiza prin LC-MS/MS. Se determină concentrația compusului de testat în plasmă și se încarcă în sistemul Watson LIMS™ unde este utilizată analiza noncompartimentală pentru a calcula aria de sub curbă (AUC) pentru ambele brațe IV și PO. Se calculează biodisponibilitatea orală (%F) prin următoarea ecuație,

$$\%F = (AUC_{PO} \times Dose_{IV}) / (AUC_{IV} \times Dose_{PO}) \times 100.$$

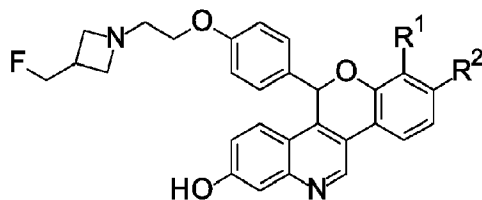
15 Compușii din Exemplul 1B afișează o valoare %F de ~50% în testul menționat mai sus. Acest test demonstrează că Exemplul 1B are o bună biodisponibilitate orală.

#### (56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- US-A1- 2011 281 847
- US-A9- 2017 197 915

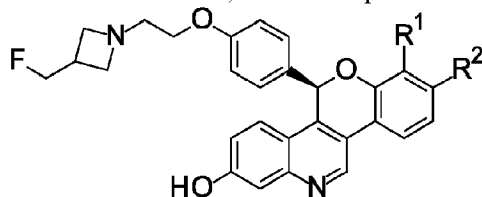
**(57) Revendicări:**

1. Un compus cu formula:



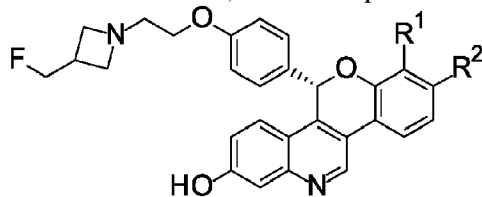
în care fie R<sup>1</sup> sau fie R<sup>2</sup> este selectat în mod independent dintre Cl, F, -CF<sub>3</sub>, sau -CH<sub>3</sub>, și celălalt este hidrogen,  
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2. Compusul în conformitate cu revendicarea 1, în care compusul este



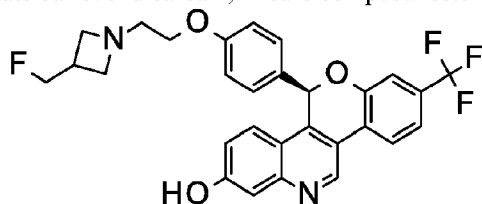
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

3. Compusul în conformitate cu revendicarea 1, în care compusul este



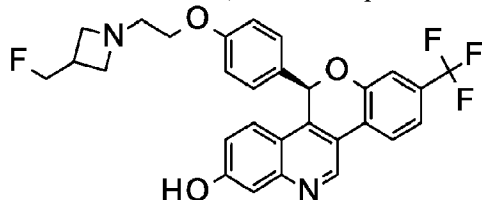
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

4. Compusul în conformitate cu revendicarea 2, în care compusul este

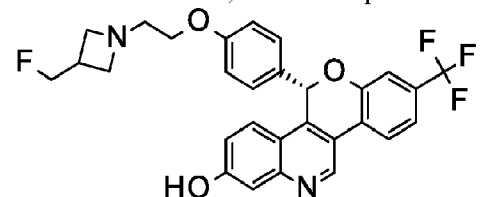


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

5. Compusul în conformitate cu revendicarea 4, în care compusul este



6. Compusul în conformitate cu revendicarea 3, în care compusul este

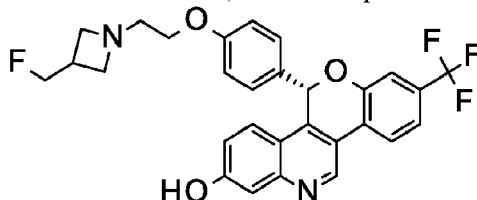


sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

7. Compusul în conformitate cu revendicarea 4 sau 6, în care sarea acceptabilă farmaceutic este o sare a acidului benzensulfonic.

8. Compusul în conformitate cu revendicarea 4 sau 6, în care sarea acceptabilă farmaceutic este o sare a acidului 4-metilbensulfonic.

9. Compusul în conformitate cu revendicarea 6, în care compusul este



10. O compoziție farmaceutică cuprinzând compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 9 în combinație cu un excipient acceptabil farmaceutic, purtător, sau diluant.

11. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 10, cuprinzând unul sau mai mulți alți agenți terapeutici.

12. Un compus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia sau o compoziție farmaceutică în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 11 pentru utilizare în terapie.

13. Un compus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 9 pentru utilizare în tratamentul cancerului la sân, cancerului ovarian, cancerului endometrial, cancerului la prostată, cancerului uterin, cancerului gastric, sau cancerului pulmonar.

14. Compusul sau sarea acestuia pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 13 în tratamentul cancerului la sân pozitiv ER.

15. Compusul sau sarea acestuia pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 13 în tratamentul cancerului gastric pozitiv ER.

16. Compusul sau sarea acestuia pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 13 în tratamentul cancerului pulmonar pozitiv ER.