



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 45/06 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2017140674, 29.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.04.2016Дата регистрации:
01.12.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

29.04.2015 US 62/154,699;
30.04.2015 US 62/155,451;
07.05.2015 US 62/158,469;
15.07.2015 US 62/192,940;
15.07.2015 US 62/192,944;
06.11.2015 US 62/252,085;
09.11.2015 US 62/252,916;
10.12.2015 US 62/265,696;
10.12.2015 US 62/265,658;
10.12.2015 US 62/265,774;

(см. прод.)

(43) Дата публикации заявки: 29.05.2019 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 01.12.2020 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 29.11.2017(86) Заявка РСТ:
US 2016/030317 (29.04.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/176665 (03.11.2016)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко
Оксана Юрьевна

(72) Автор(ы):

ГАРНЕР Фиона (US),
ХЭТТЕРСЛИ Гэри (US)

(73) Патентообладатель(и):

РАДИУС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014203129, 24.12.2014. US
20110124617, 25.05.2011. ALLURI P.G. et al.
Estrogen receptor mutations and their role in
breast cancer progression//Breast Cancer Res.
2014 Dec 12;16(6):494. doi: 10.1186/s13058-014-
0494-7, реферат.

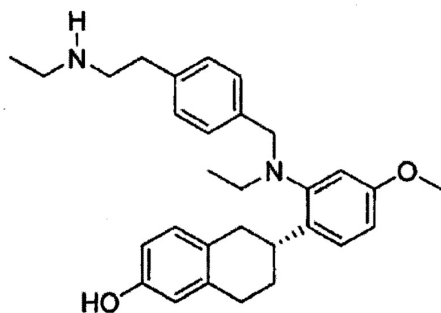
(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к онкологии, и может быть использовано для

лечения рака молочной железы, положительного
по мутантному рецептору эстрогенов альфа.

Способ включает введение терапевтически эффективного количества а RAD1901 следующей структуры (I):



(I)

Использование изобретения позволяет повысить ингибирование роста опухоли и обеспечить ее регрессию. 15 з.п. ф-лы, 16 табл., 42 ил., 5 пр.

(30) (продолжение):

10.12.2015 US 62/265,663;

15.04.2016 US 62/323,572;

15.04.2016 US 62/323,576

RU 2737496 C2

RU 2737496 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 45/06 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)(21)(22) Application: **2017140674, 29.04.2016**(24) Effective date for property rights:
29.04.2016Registration date:
01.12.2020

Priority:

(30) Convention priority:

29.04.2015 US 62/154,699;
30.04.2015 US 62/155,451;
07.05.2015 US 62/158,469;
15.07.2015 US 62/192,940;
15.07.2015 US 62/192,944;
06.11.2015 US 62/252,085;
09.11.2015 US 62/252,916;
10.12.2015 US 62/265,696;
10.12.2015 US 62/265,658;
10.12.2015 US 62/265,774;

(to be continued)

(43) Application published: **29.05.2019 Bull. № 16**(45) Date of publication: **01.12.2020 Bull. № 34**(85) Commencement of national phase: **29.11.2017**(86) PCT application:
US 2016/030317 (29.04.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/176665 (03.11.2016)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Karpenko
Oksana Yurevna

(72) Inventor(s):

GARNER, Fiona (US),
HATTERSLEY, Gary (US)

(73) Proprietor(s):

RADIUS PHARMACEUTICALS, INC. (US)(54) **METHODS OF TREATING CANCER**

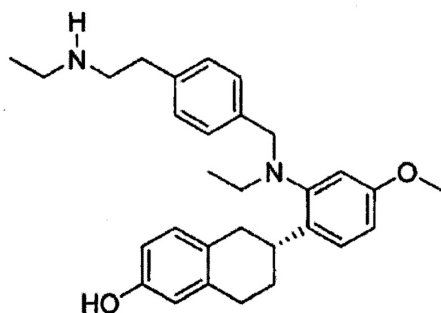
(57) Abstract:

FIELD: medicine; oncology.

SUBSTANCE: invention can be used for treating
breast cancer, positive by mutant estrogen receptor

alpha. Method involves administering a therapeutically
effective amount of a RAD1901 of the following
structure (I):

EFFECT: use of the invention enables higher inhibition of tumor growth and provides its regression.
16 cl, 16 tbl, 42 dwg, 5 ex



(I)

(30) Convention priority:
10.12.2015 US 62/265,663;
15.04.2016 US 62/323,572;
15.04.2016 US 62/323,576

R U 2 7 3 7 4 9 6 C 2

2 7 3 7 4 9 6 C 2 R U

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/154,699, поданной 29 апреля 2015 года, предварительной заявки США №62/155,451, поданной 30 апреля 2015 года, предварительной заявки США №62/252,085, поданной 6 ноября 2015, предварительной заявки США №62/265,696, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/158,469, поданной 7 мая 2015, предварительной заявки США №62/252,916, поданной 9 ноября 2015 года, предварительной заявки США №62/265,774, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/192,940, поданной 15 июля 2015 года, предварительной заявки США №62/265,658, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/323,572, поданной 15 апреля 2016 года, предварительной заявки США №62/192,944, поданной 15 июля 2015 года, предварительной заявки США №62/265,663, поданной 10 декабря 2015 года, и предварительной заявки США №62/323,576, поданной 15 апреля 2016 года, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Рак молочной железы подразделяют на три подтипа на основании экспрессии трех рецепторов: рецептора эстрогенов (estrogen receptor, ER), рецептора прогестеронов (progesterone receptor, PR) и рецептора эпидермального фактора роста-2 человека (human epidermal growth factor receptor-2, Her2). Сверхэкспрессия ER обнаружена у многих пациентов, страдающих от рака молочной железы. На ER-положительные (ER+) варианты рака молочной железы приходится две трети всех вариантов рака молочной железы. Помимо рака молочной железы эстроген и ER связаны, например, с раком яичников, раком толстой кишки, раком предстательной железы и раком эндометрия.

[0003] ER могут активироваться эстрогеном и транслоцироваться в ядро для связывания с ДНК, посредством чего регулируется активность различных генов. См., например, публикации Marino et al., "Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription," Curr. Genomics 7(8): 497-508 (2006), и Heldring et al., "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets," Physiol. Rev. 87(3): 905-931 (2007).

[0004] Средства, которые ингибируют выработку эстрогена, такие как ингибиторы ароматазы (ИА, например, летрозол, анастрозол и аромазин), или которые блокируют непосредственно активность ER, такие как селективные модуляторы рецептора эстрогенов (СМРЭ, например, тамоксифен, торемифен, дролоксифен, идоксифен, ралоксифен, лазофоксифен, арзоксифен, мипроксифен, левормелоксифен и ЕМ-652 (SCH 57068)) и селективные супрессоры рецептора эстрогенов (ССРЭ, например, фулвестрант, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ранее применялись для лечения ER-положительных вариантов рака молочной железы либо разрабатываются для данных целей.

[0005] СМРЭ и ИА часто применяют в качестве системной адъювантной терапии первой линии для ER-положительного рака молочной железы. На сегодняшний день тамоксифен применяют в случае как раннего, так и запущенного ER-положительного рака молочной железы у женщин в пре- и постменопаузальном периоде. Однако у тамоксифена могут быть серьезные побочные эффекты, такие как свертывание крови и инсульт. Тамоксифен может вызывать истончение костей у женщин в пременопаузальном периоде, несмотря на то, что данное средство может предотвратить атрофию костной ткани у женщин в постменопаузальном периоде. Поскольку тамоксифен действует как частичный агонист в отношении эндометрия, данное средство

также увеличивает риск рака эндометрия.

[0006] ИА подавляют выработку эстрогена в периферических тканях посредством блокирования активности ароматазы, которая в организме превращает андроген в эстроген. Однако ИА не могут остановить выработку эстрогена яичниками. Таким образом, ИА применяют, главным образом, для лечения женщин в постменопаузальном периоде. Более того, поскольку ИА являются гораздо более эффективными, чем тамоксифен, и характеризуются меньшим количеством серьезных побочных эффектов, ИА можно также применять для лечения женщин в пременопаузальном периоде с подавленной функцией яичников. См., например, публикацию Francis et al., "Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer," the N. Engl. J. Med, 372:436-446 (2015).

[0007] В то время как начальное лечение данными средствами может быть успешным, у многих пациентов в конечном итоге случается рецидив устойчивых к лекарственным препаратам вариантов рака молочной железы. Мутации, поражающие ER, были признаны одним из потенциальных механизмов развития такой устойчивости. См., например, публикацию Robinson et al., "Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer," Nat Genet. 45:1446-51 (2013). Мутации в лиганд-связывающем домене (ЛСД) ER обнаружены в 21% образцов метастазирующей ER-положительной опухоли молочной железы от пациентов, проходивших по меньшей мере один курс эндокринного лечения. Jeselsohn, et al., "ESR1 mutations - a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer," Nat. Rev. Clin. Oncol, 12:573-83 (2015).

[0008] На сегодняшний день фулвестрант является единственным ССРЭ, одобренным для лечения ER-положительных метастазирующих вариантов рака молочной железы с прогрессированием заболевания после антиэстрогеновой терапии. Несмотря на клиническую эффективность данного средства, практическая ценность фулвестранта ограничена количеством лекарственного препарата, которое можно ввести за одну инъекцию, а также сниженной биодоступностью. Визуализирующие методы исследования с применением позитронно-эмиссионной томографии на основе 18F-фторэстрадиола (ФЭС-ПЭТ) свидетельствуют о том, что даже при дозировке 500 мг у некоторых пациентов не достигается полное ингибирование ER, и недостаточное введение доз может стать причиной неудачной терапии.

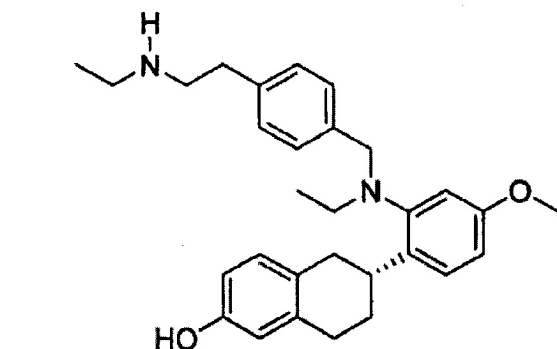
[0009] Другой проблемой, связанной с направленными на эстроген вариантами терапии, является то, что такие варианты терапии могут оказывать нежелательное воздействие на матку, кости и другие ткани. ER направляет транскрипцию эстроген-чувствительных генов в широком спектре типов тканей и клеток. Данные эффекты могут быть в особенности выраженными в виде эндогенных уровней эстрогена и других гормонов яичников, которые снижаются в течение менопаузы. Например, тамоксифен может вызывать истончение костей у женщин в пременопаузальном периоде и увеличивать риск рака эндометрия, поскольку данное средство выступает в качестве частичного агониста в отношении эндометрия. У женщин в постменопаузальном периоде лечение с помощью ИА может вызывать более серьезную атрофию костной ткани и большее количество переломов костей, чем в случае применения тамоксифена. Пациенты, которые получали лечение фулвестрантом, также подвержены риску развития остеопороза в связи с механизмом действия данного средства.

[0010] Таким образом, сохраняется потребность в более долговременных и эффективных вариантах терапии, нацеленных на ER, для преодоления некоторых из проблем, связанных с применяемыми на сегодняшний день вариантами эндокринной терапии, а также для борьбы с развитием устойчивости.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухоли или обеспечения регрессии опухоли у субъекта, страдающего от устойчивого к лекарственным препаратам рака, положительного по рецепторам эстрогенов альфа. Способ предусматривает введение субъекту

5



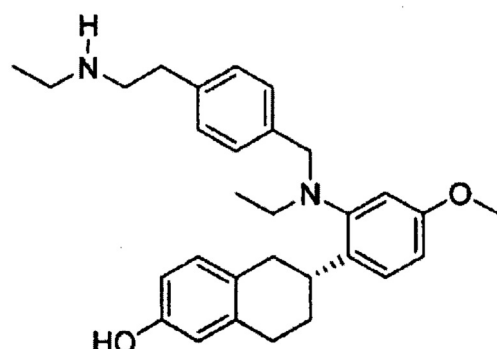
10

15

или его соли или сольвата.

[0012] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухоли или обеспечения регрессии опухоли у субъекта, страдающего от рака, положительного по мутантному рецептору эстрогенов альфа. Способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества RAD1901 следующей структуры:

20



25

30

или его соли или сольвата.

[0013] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичников и рака гипофиза. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой метастазирующий рак. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный рак является положительным по мутантному рецептору эстрогенов альфа, который включает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и комбинаций указанных мутаций, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G; и X₂ представляет собой R или Q. Например, мутация представляет собой Y537S.

35

40

[0014] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная опухоль является устойчивой к лекарственному препарату, который выбран из группы, состоящей из антиэстрогенов, ингибиторов ароматазы и комбинаций указанных лекарственных препаратов. Например, антиэстроген представляет собой тамоксифен или фулвестрант, и ингибитор ароматазы представляет собой аромазин.

45

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ И ТАБЛИЦ

[0015] Фигура 1: RAD1901 ингибировал рост опухоли на различных полученных от пациента ксенотрансплантатных (patient-derived xenograft, PDx) моделях вне зависимости от статуса ESR1 и предшествующей эндокринной терапии. Показан процент

ингибирования роста опухоли (ИРО) на PDx моделях, получавших лечение RAD1901.

[0016] Фигуры 2А-Е: RAD1901 продемонстрировал дозозависимое ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах с ER α дикого типа (ДТ) (PR+, Her2-). (фигура 2А): Диаграммы типа «ящик с усами» демонстрируют объем опухоли в день 40 по группам на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (0,3, 1, 3, 10, 30 и 60 мг/кг р.о. (п.о., перорально), q.d. (о.р.д., один раз в день)), тамоксифеном (ТАМ) (1 мг/дозу, s.c. (п.к., подкожно), q.o.d. (о.р.д.д., один раз каждые два дня)) и фулвестрантом (ФУЛ) (0,5 мг/дозу, п.к., о.р.д.); (фигура 2В): Медианные объемы опухоли в зависимости от времени на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60, 90 и 120 мг/кг, п.о. о.р.д.), тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., о.р.д.д.) и фулвестрантом (0,5 мг/дозу, п.к., о.р.д.) (фигура 2С): Объемы опухолей отдельных животных в день 42 на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60, 90 и 120 мг/кг, п.о., о.р.д.), тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., о.р.д.д.) и фулвестрантом (0,5 мг/дозу, п.к., о.р.д.); (фигура 2Д): Медианные объемы опухоли в зависимости от времени на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (RAD) (0,3, 1, 3, 10, 30 и 60 мг/кг п.о., о.р.д.), тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., о.р.д.д.) и фулвестрантом (0,5 мг/дозу, п.к., о.р.д.); (фигура 2Е): Процент изменений средней массы тела на группу по сравнению с днем 1 на

ксенотрансплантатных моделях MCF-7 на мышах, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (RAD) (0,3, 1, 3, 10, 30 и 60 мг/кг п.о., о.р.д.), тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., о.р.д.д.) и фулвестрантом (0,5 мг/дозу, п.к., о.р.д.).

[0017] Фигуры 3А-В: RAD 1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 с ER α ДТ (PR+, Her2-). (фигура 3А): Рост опухоли ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30 и 60 мг/кг, п.о., ежедн.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н. (один раз в неделю)); (фигура 3В): Изменение объема индивидуальных опухолей по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30 и 60 мг/кг, п.о., ежедн.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.).

[0018] Фигуры 4А-В: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на PDx-4 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2-, не получавшие лечения). (Фигура 4А): Рост опухоли PDx-4 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30, 60 и 120 мг/кг, п.о., ежедн.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (фигура 4В): Изменение объема индивидуальных опухолей по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования на PDx-4 моделях, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30, 60, 120 мг/кг, п.о., ежедн.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.).

[0019] Фигура 5: Эффективность RAD1901 сохраняется по меньшей мере в течение двух месяцев после окончания лечения RAD1901, в то время как лечение эстрадиолом продолжали, на PDx-4 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2-, не получавшие лечения). Рост опухоли PDx-4 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.).

[0020] Фигура 6: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли на моделях PDx-2 с ER α ДТ (PR+, Her2+, не получавшие лечения). Рост опухоли PDx-2 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.), фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и комбинацией (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.). n=8-10/группу.

[0021] Фигуры 7А-В: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на PDx-11 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2+, ранее получавшие лечение ингибитором ароматазы, фулвестрантом и химиотерапией). (Фигура 7А): Рост опухоли на PDx-11 моделях, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (фигура 7В): Изменение объема индивидуальной опухоли по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования на моделях PDx-11, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.). n=8-10/группу.

[0022] Фигура 8: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли при различных дозах на PDx-12 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2+, не получавшие лечения). Рост опухоли PDx-11 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30 и 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.).

[0023] Фигуры 9А-С: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли на PDx-5 моделях с мутантным (Y537S) ER α (PR+, Her2+, предшествующее лечение ингибитором ароматазы). (Фигура 9А): Рост опухоли PDx-11 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60, 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (фигура 9В): Изменение объема индивидуальной опухоли по сравнению с исходным уровнем до дня 17 на PDx-5 моделях, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (60, 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (фигура 9С): Изменение объема индивидуальной опухоли по сравнению с исходным уровнем до дня 56 на PDx-5 моделях, получавших лечение RAD1901 (60, 120 мг/кг, п.о., о.р.д.).

[0024] Фигуры 10А-В: RAD1901 продемонстрировал ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на PDx-6 моделях с мутантным (Y537S) ER α (PR+, Her2:1+, ранее получавшие лечение тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом). (Фигура 10А): Рост опухоли PDx-6 моделей, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30, 60 и 120 мг/кг п.о., о.р.д.), тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., о.р.д.) и фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (фигура 10В): Изменение объема индивидуальных опухолей по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования на PDx-6 моделях, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 (30, 60 и 120 мг/кг п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.).

[0025] Фигура 11: Фармакокинетический анализ фулвестранта у бестимусных мышей. Показана концентрация в плазме фулвестранта в концентрации 1 мг/дозу (закрашенный ромб), 3 мг/дозу (закрашенный круг) и 5 мг/дозу (закрашенный треугольник). Бестимусным мышам вводили подкожно фулвестрант в день 1 и вторую дозу в день 8. Концентрацию фулвестранта в плазме контролировали в указанные временные точки в течение до 168 часов после введения второй дозы.

[0026] Фигура 12: Эффект RAD1901 и фулвестранта (Фаслодекса) в отношении выживаемости мыши на внутричерепной модели MCF-7 на мышах.

[0027] Фигура 13: Исследование лечения RAD1901 1 фазы в отношении запущенного ER+ рака молочной железы.

[0028] Фигуры 14А-В: История предшествующего лечения и лечение RAD1901

субъектов, включенных в исследование лечения RAD1901 1 фазы в отношении запущенного ER+ рака молочной железы. (Фигура 14A): Предшествующее противораковое лечение; (фигура 14B): лечение RAD1901.

5 [0029] Фигуры 15A-C: Иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки субъекта, получавшего лечение 200 и 500 мг RAD1901 п.о., о.р.д., и изменение занятости ER после лечения RAD1901. (Фигура 15A): Поперечный вид скана КТ матки до (а) и после (с) лечения 200 мг RAD1901, и поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (b) и после (d) лечения RAD1901; (фигура 15B): Сагиттальный вид скана КТ матки до (верхний чертеж (а)) и после (нижний чертеж (а)) лечения 500 мг RAD1901, сагиттальный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (верхний чертеж (b)) и после (нижний чертеж (b)) лечения RAD1901, поперечный вид скана КТ матки до (верхний чертеж (с)) и после (нижний чертеж (с)) лечения RAD1901, поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (верхний чертеж (d)) и после (нижний чертеж (d)) лечения RAD1901; (фигура 15C): % изменения занятости ER после лечения RAD1901 субъектов 1-3 (200 мг) и субъектов 4-7 (500 мг) по сравнению с исходным уровнем (перед лечением RAD1901).

[0030] Фигуры 16A-B: Иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки (фигура 16A) и гипофиза (фигура 16B) перед (На исходном уровне) и после (После лечения) лечения RAD1901 (500 мг). (а) Боковое поперечное сечение; (b) продольное поперечное сечение; и (с) продольное поперечное сечение.

20 [0031] Фигуры 17A-B: лечение RAD1901 привело к полной деградации ER и ингибировало передачу сигналов посредством ER на линиях клеток MCF-7 (фигура 17A) и линиях клеток T47D (фигура 17B) in vitro. Экспрессия ER была показана на обеих линиях клеток, получавших лечение RAD1901 и фулвестрантом, при различных концентрациях 0,001 мкМ, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ, соответственно. Передача
25 сигналов посредством ER была показана тремя генами-мишенями ER, исследование которых проводили: PGR, GREB1 и TFF1.

[0032] Фигуры 18A-C: лечение RAD1901 привело к деградации ER и отмене передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (Фигура 18A): Вестернблоттинг, демонстрирующий экспрессию PR и ER на ксенотрансплантатных
30 моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и фулвестрантом 3 мг/дозу, через 2 часа или через 8 часов после введения последней дозы; (фигура 18B): экспрессия белка ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и фулвестрантом 3 мг/дозу, через 2 часа после введения последней дозы; (фигура 18C):
35 экспрессия белка PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем, RAD1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и фулвестрантом 3 мг/дозу, через 8 часов после введения последней дозы.

[0033] Фигуры 19A-C: лечение RAD1901 привело к быстрому уменьшению уровня PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (Фигура 19A): Вестернблоттинг,
40 демонстрирующий экспрессию PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем и RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг, через 8 часов или через 12 часов после введения однократной дозы; (фигура 19B): Вестернблоттинг, демонстрирующий экспрессию PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем и RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг, через 4 часа или через 24 часа после введения 7-ой дозы; (фигура 19C): Дозозависимое уменьшение экспрессии PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших
45 лечение RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг.

[0034] Фигуры 20A-B: лечение RAD1901 привело к быстрому уменьшению

пролиферации на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (Фигура 20A): Иллюстративная фотография рассеченной опухоли, взятой у ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем и RAD1901 в дозе 90 мг/кг, через 8 часов после введения однократной дозы и через 24 часа после введения 4-ой дозы, и

5 окрашенной в отношении маркера пролиферации Ki-67; (фигура 20B): Гистограмма, демонстрирующая уменьшение уровня маркера пролиферации Ki-67 на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем-наполнителем и RAD1901 в дозе 90 мг/кг, через 8 часов после введения однократной дозы и через 24 часа после введения 4-ой дозы.

10 [0035] Фигура 21: лечение RAD1901 в дозе 30, 60 и 120 мг/кг уменьшало уровень Ki67 более значительно, чем фулвестрант (1 мг/животное), в конце исследования опухолей PDx-4 моделей через четыре часа в последний день исследования эффективности длительностью 56 дней.

[0036] Фигура 22: лечение RAD1901 в дозе 60 и 120 мг/кг привело к уменьшению

15 передачи сигналов посредством ER in vivo на PDx-5 моделях с уменьшенной экспрессией PR.

[0037] Фигуры 23A-D: Эффект RAD1901 в отношении ткани матки на недавно отлученных от матери самках крыс Спрег-Дуули. (Фигура 23A): Чистая масса матки крыс, которым проводили эвтаназию через 24 часа после введения последней дозы;

20 (фигура 23B): высота эпителия на срезах тканей матки; (фигура 23C): Иллюстративные срезы ткани матки, окрашенные толуидиновым синим О, при 400х увеличении, стрелками показан эпителий матки; (фигура 23D): Суммарная РНК, выделенная из ткани матки и проанализированная методом количественной ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) для определения уровня экспрессии комплемента С3

25 относительно гена домашнего хозяйства 18S рибосомальной РНК.

[0038] Фигура 24: Результаты определения фармакокинетики RAD1901 в плазме в дозе 200, 500, 750 и 1000 мг/кг после введения в день 7.

[0039] Фигура 25: 3ERT (I).

[0040] Фигура 26: 3ERT (II).

30 [0041] Фигура 27: Наложения комплексов ЛСД ER α - антагонист, обобщенных в таблице 13.

[0042] Фигуры 28A-B: Моделирование (фигура 28A) RAD1901-1R5K; и (фигура 28B) GW5-1R5K.

[0043] Фигуры 29A-B: Моделирование (фигура 29A) RAD1901-1SJ0; и (фигура 29B)

35 E4D-1SJ0.

[0044] Фигуры 30A-B: Моделирование (фигура 30A) RAD1901-2JFA; и (фигура 30B) RAL-2JFA.

[0045] Фигуры 31A-B: Моделирование (фигура 31A) RAD 1901-2BJ4; и (фигура 31B) ОНТ-2BJ4.

40 [0046] Фигуры 32A-B: Моделирование (фигура 32A) RAD1901-2IOK; и (фигура 32 B) IOK-2IOK.

[0047] Фигура 33: Наложения конформаций RAD1901, полученных в результате анализа ДИС (докинг индуцированного соответствия) 1R5K и 2OUZ.

[0048] Фигура 34: Наложения конформаций RAD1901, полученных в результате

45 анализа ДИС 2BJ4 и 2JFA.

[0049] Фигура 35A-B: Наложения конформаций RAD 1901, полученных в результате анализа ДИС 2BJ4, 2JFA и 1SJ0.

[0050] Фигуры 36A-C: ДИС RAD1901 с 2BJ4.

[0051] Фигуры 37А-С: Взаимодействия поверхностей белков RAD1901, состыкованных в 2BJ4 посредством ДИС.

[0052] Фигуры 38А-С: ДИС фулвестранта с 2BJ4.

[0053] Фигуры 39А-В: ДИС фулвестранта и RAD 1901 с 2 BJ4.

5 [0054] Фигуры 40А-В: Наложения ДИС фулвестранта и RAD1901 с 2BJ4.

[0055] Фигура 41: анализ связывания RAD1901 in vitro с конструкциями ER α ДТ и мутантным ЛСД.

[0056] Фигура 42: Рецептор эстрогенов.

10 [0057] Таблица 1. Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования 1 фазы RAD1901 для лечения запущенного ER+ рака молочной железы.

[0058] Таблица 2. Связанные с лечением НЯ (нежелательные явления) в исследовании 1 фазы RAD1901 для лечения запущенного ER+ рака молочной железы.

15 [0059] Таблица 3. Уровни RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге мышей, которым имплантировали клетки MCF7, после лечения в течение 40 дней. *НПКО: ниже предела количественного определения.

[0060] Таблица 4. СУН (стандартизированные уровни накопления) для матки, мышц и костей для субъекта-человека, получавшего лечение дозой 200 мг п.о. один раз/день в течение шести дней.

20 [0061] Таблица 5. СУН для матки, мышц и костей для субъектов-людей (n=4), получавших лечение дозой 500 мг п.о. один раз/день в течение шести дней.

[0062] Таблица 6. Эффект RAD1901 в отношении МПК (минеральной плотности костей) на крысах после овариоэктомии. Взрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство - овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу 25 лечения). МПК измеряли посредством двухэмиссионной рентгеновской абсорбциометрии на исходном уровне и после 4 недель лечения. Данные выражены в виде среднего значения $\pm$ СО (стандартное отклонение). *P<0,05 по сравнению с соответствующим случаем OVX (овариоэктомия) + Контроль наполн. МПК, минеральная плотность костей; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; Наполн, наполнитель.

30 [0063] Таблица 7. Эффект RAD1901 в отношении микроархитектуры бедренной кости на крысах после овариоэктомии. Взрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство - овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу лечения). Через 4 недели микроархитектуру кости оценивали с применением компьютерной 35 микрофотографии. Данные выражены в виде среднего значения $\pm$ СО. *P<0,05 по сравнению с соответствующим случаем OVX + Контроль наполн. КПК, кажущаяся плотность костей; ОК/ОО, плотность костной ткани; ПлотнСоед, плотность соединительной ткани; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; ЧТ, число трабекул; ТТ, толщина трабекул; РМТ, расстояние между трабекулами; Наполн, 40 наполнитель.

[0064] Таблица 8. Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования 1 фазы с увеличением дозы RAD1901.

45 [0065] Таблица 9. Наиболее частые (>10%) связанные с лечением НЯ (нежелательные явления) в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901. НЯ классифицировали согласно СТСАЕ v4.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, общей терминологии критериев нежелательных явлений). Любого пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. *>10% пациентов в суммарной активной

группе, у которых наблюдались любые связанные с лечением НЯПНЛ (нежелательные явления, возникшие после начала лечения), n = количество субъектов с по меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории.

[0066] Таблица 10. Фармакокинетические параметры в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901 (день 7).

[0067] Таблица 11. Частота мутаций ЛСД.

[0068] Таблица 12. Различия комплексов ЛСД ER- α - антагонист в положениях остатков по сравнению с 3ERT.

[0069] Таблица 13. Оценка наложения структур комплексов ЛСД ER- α - антагонист посредством расчетов СКО (среднего квадратичного отклонения).

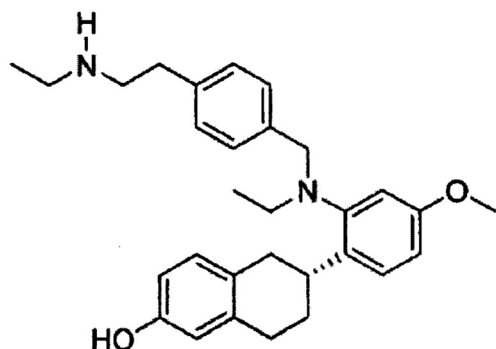
[0070] Таблица 14. Анализ связывания лиганда в комплексах ЛСД ER- α - антагонист.

[0071] Таблица 15. Оценка модели для докинга RAD1901.

[0072] Таблица 16. Показатель докинга индуцированного соответствия RAD1901 с 1R5K, 2IFA, 2BJ4 и 2OUZ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0073] Как изложено в разделе примеров ниже, было обнаружено, что RAD1901 (структура ниже) ингибирует рост опухоли и/или запускает регрессию опухоли на ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы вне зависимости от ESR1 статуса и предшествующей эндокринной терапии (пример I(A)). Ксенотрансплантатные модели, лечение которых проводили, содержали опухоли, экспрессирующие ER α ДТ (дикого типа) или мутантный (например, Y537S) ER α с высоким или низким уровнем экспрессии Her2, с предшествующей эндокринной терапией или без таковой (например, тамоксифеном (там), ИА, химиотерапией (химио), ингибиторами Her2 (Her2 и, например, трастузумабом, лапатинибом), бевацизумабом и/или ритуксимабом) (фиг. 1). И во всех случаях RAD1901 ингибировал рост опухоли. PDx модели с ER ДТ и PDx модели с мутантным ER могут характеризоваться различным уровнем восприимчивости к лечению фулвестрантом. Однако было обнаружено, что RAD1901 ингибирует рост опухоли вне зависимости от того, отвечали ли PDx модели на лечение фулвестрантом. Таким образом, RAD1901 можно использовать в качестве замены фулвестранта для лечения рака молочной железы, восприимчивого к фулвестранту, с улучшенным ингибированием роста опухоли, а также для лечения рака молочной железы, который менее эффективно поддается лечению фулвестрантом. Например, RAD1901 вызывал регрессию опухоли на PDx моделях с ER+ ДТ с варьирующей восприимчивостью к лечению фулвестрантом (например, ксенотрансплантатные модели на основе линии клеток MCF-7, PDx-4, PDx-2 и PDx-11 модели, восприимчивые к лечению фулвестрантом, и PDx-12 модели, слабо восприимчивые к лечению фулвестрантом), и на PDx моделях с мутантным ER+ (например, Y537S) с варьирующим уровнем восприимчивости к лечению фулвестрантом (например, PDx-6 модели, восприимчивые к лечению фулвестрантом, и PDx-5 модели, слабо восприимчивые к лечению фулвестрантом). RAD1901 продемонстрировал сохранение эффективности по ингибированию роста опухоли после окончания лечения, в то время как лечение эстрадно лом продолжали (например, PDx-4 модель). Результаты, представленные в настоящем изобретении, также продемонстрировали, что RAD1901 может быть доставлен в головной мозг (пример II), и указанная доставка улучшала выживаемость мыши на внутричерепной модели на мышах, экспрессирующих ER α дикого типа (ксенотрансплантатная модель MCF-7, пример I(B)). RAD1901 представляет собой мощную терапию против ER+ рака молочной железы.



RAD1901.

[0074] RAD1901 также, вероятно, вызывает меньшее количество побочных эффектов по сравнению с другими вариантами эндокринной терапии (например, другими СМЭР, такими как тамоксифен, и ССЭР, такими как фулвестрант). Например, тамоксифен может увеличивать риск рака эндометрия. Тамоксифен может также вызывать истончение костей у женщин в перименопаузальном периоде. Фулвестрант может также увеличивать риск атрофии костной ткани у пациентов, получавших лечение.

Маловероятно, что RAD1901 будет оказывать аналогичный побочный эффект. Было обнаружено, что RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухолях, причем уровень RAD1901 в опухоли по сравнению с уровнем RAD1901 в плазме (соотношение О/П) составляет до примерно 35 (пример II). Стандартизированные уровни накопления (СУН) для матки, мышц и костей рассчитывали для субъектов-людей, получавших лечение RAD1901 в дозе от примерно 200 мг до примерно 500 мг о.р.д. (пример III(A)).

После введения доз сигналы для матки были близки к уровням из «тканей, отличных от тканей-мишеней» (тканей, которые не экспрессируют рецептор эстрогенов), что свидетельствует о полном затухании накопления ФЭС-ПЭТ после лечения RAD1901. Практически не наблюдалось изменений на сканах ПЭТ перед лечением по сравнению со сканами после лечения на тканях, которые по существу не экспрессировали рецептор эстрогенов (например, мышцы, кости) (пример III(A)). Варианты лечения RAD1901 выступали в качестве антагонистов стимуляции эстрадиолом тканей матки у крыс после овариэктомии (OVX) (пример IV(A)), и в значительной степени сохраняли качество костей субъектов, получавших лечение. Таким образом, лечение RAD1901, вероятно, не нарушает структуру кости пациентов аналогично тому, как могут действовать другие варианты эндокринной терапии. Например, у крыс OVX, получавших лечение RAD1901, наблюдалось сохранение МПК и микроархитектуры бедренной кости (пример IV(A)). Таким образом, лечение RAD1901 может быть в особенности пригодным для пациентов, страдающих от остеопороза, или подверженных высокому риску остеопороза.

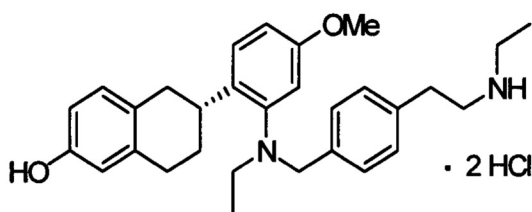
[0075] Более того, было обнаружено, что RAD1901 вызывает деградацию ER α дикого типа и отменяет передачу сигналов посредством ER in vivo на ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7, и демонстрирует дозозависимое уменьшение PR на данных ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7 (пример III(B)). RAD1901 уменьшает пролиферацию на ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7 и на PDx-4 моделях, что подтверждается уменьшением уровня маркера пролиферации Ki67 в опухолях, взятых у субъектов, получавших лечение. RAD1901 также уменьшает передачу сигналов посредством ER in vivo на PDx модели с мутантным ER, которая была слабо восприимчива к лечению фулвестрантом (пример III(B)).

[0076] Неожиданная эффективность RAD1901 в отношении опухолей, слабо восприимчивых к лечению фулвестрантом, и в отношении опухолей, экспрессирующих мутантный ER α , может быть обусловлена уникальными взаимодействиями между RAD1901 и ER α . Структурные модели ER α , присоединенного к RAD1901 и другим соединениям, связывающим ER α , анализировали для получения информации о специфичных взаимодействиях связывания (пример V). Компьютерное моделирование продемонстрировало, что взаимодействия RAD1901 - ER α , вероятно, не нарушаются мутантными ЛСД ER α , например, мутантом Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P, на который приходится примерно 81,7% мутаций ЛСД, обнаруженных в недавнем исследовании метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения (таблица 11, пример V). Это привело к обнаружению специфичных оснований в С-концевых лиганд-связывающих доменах ER α , которые являются критически важными для связывания; данную информацию можно использовать для разработки соединений, которые связываются не только с ER α дикого типа, но также с определенными мутациями и вариантами указанного рецептора, и выступают в качестве антагонистов указанных рецепторов.

[0077] На основании данных результатов в настоящем изобретении представлены способы ингибирования роста или обеспечения регрессии ER α -положительного рака или опухоли у субъекта, который нуждается в таком ингибировании или регрессии, посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества RAD1901 или сольвата (например, гидрата) или его соли. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения введение RAD1901 или соли или его сольвата (например, гидрата) обладает дополнительной терапевтической пользой дополнительно к ингибированию роста опухоли, включая, например, ингибирование пролиферации раковых клеток или ингибирование активности ER α (например, посредством ингибирования связывания эстрадиола или посредством деградации ER α). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения способ не оказывает отрицательных эффектов в отношении мышц, костей, молочной железы и матки.

[0078] В настоящем изобретении также представлены способы модулирования и деградации ER α и мутанта ER α , способы лечения состояний, связанных с активностью или экспрессией ER α и мутантного ER α , соединения для применения в данных способах и комплексы и кристаллы указанных соединений, присоединенные к ER α и мутантному ER α .

[0079] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении представлены способы ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, способы, которые обеспечивают ингибирование роста или обеспечивают регрессию ER α -положительной опухоли у субъекта, который нуждается в таком ингибировании или регрессии, посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества RAD1901 или его соли или сольвата (например, гидрата). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения соль указанного соединения представляет собой дигидрохлорид RAD1901, имеющий структуру:



дигидрохлорид RAD1901.

[0080] «Ингибирование роста» ER α -положительной опухоли в настоящем изобретении может означать замедление скорости роста опухоли или полное прекращение роста опухоли.

[0081] «Регрессия опухоли» или «регрессия» ER α -положительной опухоли в настоящем изобретении может означать уменьшение максимального размера опухоли. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения введение RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли может привести к уменьшению размера опухоли по сравнению с исходным уровнем (т.е. размером до начала лечения) или даже к устранению или частичному устранению опухоли. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способы регрессии опухоли, представленные в настоящем изобретении, можно в качестве альтернативы охарактеризовать как способы уменьшения размера опухоли по сравнению с исходным уровнем.

[0082] «Опухоль» в настоящем изобретении представляет собой злокачественную опухоль и используется взаимозаменяемо с «раком».

[0083] Ингибирование роста или регрессия опухоли могут локализоваться в одной опухоли или в ряде опухолей в пределах специфичной ткани или органа или могут являться системными (т.е. могут поражать опухоли во всех тканях или органах).

[0084] Поскольку RAD1901, как известно, предпочтительно, связывается с ER α по сравнению с рецептором эстрогенов бета (ER β), если не указано обратное, рецептор эстрогенов, рецептор эстрогенов альфа, ER α , ER, ER α дикого типа и ESR1 используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. «Рецептор эстрогенов альфа» или «ER α » в настоящем изобретении означает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность ER α дикого типа, которая кодируется геном ESR1, или состоящий или состоящий по существу из указанной аминокислотной последовательности. Опухоль, которая является «положительной в отношении рецептора эстрогенов альфа», «ER α -положительной», «ER+» или «ER α +» в настоящем изобретении означает опухоль, в которой одна или несколько клеток экспрессируют по меньшей мере одну изоформу ER α . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения данные клетки сверхэкспрессируют ER α . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения пациент имеет одну или несколько клеток в опухоли, экспрессирующих одну или несколько форм рецептора эстрогенов бета. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль и/или рак связаны с раком молочной железы, матки, яичников или гипофиза. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения пациент имеет опухоль, расположенную в ткани молочной железы, матки, яичников или гипофиза. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых пациент имеет опухоль, расположенную в молочной железе, опухоль может быть связанной с люминальным раком молочной железы, который может являться или может не являться положительным в отношении HER2, и в случае HER2+ опухолей, опухоли могут экспрессировать высокий или низкий уровень HER2 (например, фиг. 1). Согласно

другим вариантам реализации настоящего изобретения пациент имеет опухоль, расположенную в другой ткани или органе (например, костях, мышцах, головном мозге), но, тем не менее, связанную с раком молочной железы, матки, яичников или гипофиза (например, опухоли, образованные в результате миграции или метастаза рака молочной железы, матки, яичников или гипофиза). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, опухоль, которая является мишенью, представляет собой метастазирующую опухоль и/или опухоль, которая характеризуется сверхэкспрессией ER в других органах (например, костях и/или мышцах).

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения опухоль, которая является мишенью, представляет собой опухоль и/или рак головного мозга. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения опухоль, которая является мишенью, является более чувствительной к лечению RAD1901, чем к лечению другим ССРЭ (например, фулвестрантом, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ингибиторами Her2 (например, трастузумабом, лапатинибом, аботрастузумабом эмтанзином и/или пертузумабом), химиотерапией (например, абраксаном, адриамицином, карбоплатином, цитоксаном, даунорубицином, доксилом, элленсом, фторурацилом, гемзаром, хелавеном, икземпрой, метотрексатом, митомицином, микоксантроном, навельбином, таксолем, таксотером, тиотепой, винкристином и кселодой), ингибитором ароматазы (например, анастрозолом, эксеместаном и летрозолом), селективными модуляторами рецептора эстрогенов (например, тамоксифеном, ралоксифеном, лазофоксифеном и/или торемифеном), ингибитором ангиогенеза (например, бевацизумабом) и/или ритуксимабом.

[0085] Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, указанные способы также включают этап определения наличия у пациента опухоли, экспрессирующей ER α , перед введением RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли. Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, способы также включают этап определения наличия у пациента опухоли, экспрессирующей мутантный ER α , перед введением RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли. Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, указанные способы также включают этап определения наличия у пациента опухоли, экспрессирующей ER α , которая является восприимчивой или невосприимчивой к лечению фулвестрантом, перед введением RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли. Данные определения можно провести с применением любого способа обнаружения экспрессии, известного в данной области техники, и можно осуществить *in vitro* с применением образца опухоли или ткани, взятой у субъекта.

[0086] Помимо демонстрации способности RAD1901 ингибировать рост опухоли в опухолях, экспрессирующих ER α дикого типа, результаты, представленные в настоящем изобретении, продемонстрировали, что RAD1901 демонстрирует неожиданную способность ингибировать рост опухолей, экспрессирующих мутантную форму ER α , а именно Y537S ER α (пример I(A)). Оценки примеров мутаций ER α методом компьютерного моделирования продемонстрировали, что ни одна из данных мутаций, как предполагают, не влияет на лиганд-связывающий домен или специфично не препятствует связыванию RAD1901 (пример V(A)), например, ER α , содержащий один

или несколько мутантов, которые выбраны из группы, состоящей из ER α с мутантным Y537X, где X представляет собой S, N или C, ER α с мутантным D538G, и ER α с мутантным S463P. На основании данных результатов в настоящем изобретении представлены способы ингибирования роста или способы, приводящие к регрессии опухоли, которая является положительной в отношении ER α , содержащего один или несколько мутантов в лиганд-связывающем домене (ЛСД), которые выбраны из группы, состоящей из Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, в особенности, Y537S ER α , у субъекта, страдающего от рака, посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли.

«Мутант ER α » в настоящем изобретении означает ER α , содержащий одну или несколько замен или делеций, и варианты указанного рецептора, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью аминокислотной последовательности ER α , или состоящие или состоящие по существу из указанной аминокислотной последовательности.

[0087] Помимо ингибирования роста опухоли рака молочной железы на ксенотрансплантатной модели на животных результаты, раскрытые в настоящем изобретении, продемонстрировали, что RAD1901 демонстрирует значительное накопление в клетках опухоли и способен проникать через гематоэнцефалический барьер (пример II). Способность проникать через гематоэнцефалический барьер подтверждали посредством демонстрации того, что введение RAD1901 значительно увеличивало выживаемость на ксенотрансплантатной модели метастазов головного мозга (пример I(B)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, ER α -положительная опухоль, которая является мишенью, расположена в головном мозге или в другом месте в центральной нервной системе. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль представляет собой рак, первично связанный с головным мозгом. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль представляет собой метастазирующую опухоль, которая первично связана с другим типом рака, таким как рак молочной железы, матки, яичников или гипофиза, или опухоль, которая мигрировала из другой ткани или органа. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой метастазы в головном мозге, такие как метастазы рака молочной железы в головном мозге (breast cancer brain metastases, BCBM). Согласно определенным вариантам реализации способов, раскрытых в настоящем изобретении, RAD1901 или его соли или сольваты накапливаются в одной или нескольких клетках в опухоли-мишени.

[0088] Согласно определенным вариантам реализации способов, описанных в настоящем изобретении, RAD1901 или его сольват (например, гидрат) или соль, предпочтительно, накапливается в опухоли при соотношении О/П (концентрация RAD1901 в опухоли/концентрация RAD1901 в плазме), составляющем примерно 15 или выше, примерно 18 или выше, примерно 19 или выше, примерно 20 или выше, примерно 25 или выше, примерно 28 или выше, примерно 30 или выше, примерно 33 или выше, примерно 35 или выше или примерно 40 или выше.

[0089] Результаты, представленные в настоящем изобретении, продемонстрировали,

что введение RAD1901 защищает от атрофии костной ткани у крыс после овариоэктомии (пример IV(A)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, введение RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли не оказывает нежелательных эффектов в отношении костей, включая, например, нежелательные эффекты в отношении плотности костной ткани, плотности поверхности костей, минеральной плотности костей, числа трабекул, толщины трабекул, расстояния между трабекулами, плотности соединительной ткани и/или кажущейся плотности костей субъекта, который получает лечение. RAD1901 может особенно подходить для пациентов, страдающих от остеопороза или подверженных высокому риску развития остеопороза. Тамоксифен может быть связан с атрофией костной ткани у женщин в пременопаузальном периоде, и фулвестрант может нарушать структуру костей в связи с механизмом действия данного средства. RAD1901 может быть в особенности пригодным для женщин в пременопаузальном периоде и/или опухолей, устойчивых к тамоксифену или антиэстрогеновой терапии.

[0090] Результаты, представленные в настоящем изобретении, продемонстрировали, что RAD1901 выступал антагонистом стимуляции эстрадиолом тканей матки у крыс после овариоэктомии (пример IV(A)). Более того, у субъектов-людей, получавших лечение RAD1901 в дозе 200 мг или до 500 мг о.р.д., почти не наблюдалось изменений сигналов стандартизированного объема накопления (СУН) для тканей матки, мышц и костей, которые по существу не экспрессировали ER, до и после лечения (пример III (A)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения такое введение также не приводит к нежелательным эффектам в отношении других тканей, включая, например, ткани матки, мышц или молочной железы.

[0091] Терапевтически эффективное количество RAD1901 для применения в способах, описанных в настоящем изобретении, представляет собой количество, которое при введении в течение определенного периода времени приводит к достижению одного или нескольких терапевтических сравнительных критериев (например, замедления или прекращения роста опухоли, прекращения симптомов и т.д.). В идеальном случае терапевтически эффективное количество не превышает максимально переносимую дозу, при которой 50% или более субъектов, получающих лечение, испытывают тошноту или другие реакции токсичности, которые предотвращают последующие введения лекарственных препаратов. Терапевтически эффективное количество для субъекта может варьировать в зависимости от множества факторов, включая множество и степень симптомов, пол, возраст, массу тела или общее состояние здоровья субъекта, способ введения и тип соли или сольвата, различия в восприимчивости к лекарственному препарату, конкретный тип заболевания и т.п.

[0092] Примеры терапевтически эффективных количеств RAD1901 для применения в способах, раскрытых в настоящем изобретении, включают, без ограничения, дозы от примерно 150 до примерно 1500 мг, от примерно 200 до примерно 1500 мг, от примерно 250 до примерно 1500 мг или от примерно 300 до примерно 1500 мг о.р.д. в случае субъектов, которые страдают от устойчивых ER-зависимых опухолей или видов рака; дозы от примерно 150 до примерно 1500 мг, от примерно 200 до примерно 1000 мг или от примерно 250 до примерно 1000 мг или от примерно 300 до примерно 1000 мг о.р.д. в случае субъектов, которые страдают от ER дикого типа-зависимых опухолей и/или видов рака и устойчивых опухолей и/или видов рака; и дозы от примерно 300 до примерно 500 мг, от примерно 300 до примерно 550 мг, от примерно 300 до примерно 600 мг, от примерно 250 до примерно 500 мг, от примерно 250 до примерно 550 мг, от

примерно 250 до примерно 600 мг, от примерно 200 до примерно 500 мг, от примерно 200 до примерно 550 мг, от примерно 200 до примерно 600 мг, от примерно 150 до примерно 500 мг, от примерно 150 до примерно 550 мг или от примерно 150 до примерно 600 мг о.р.д. в случае субъектов, страдающих от, в большинстве своем, ER дикого типа-
 5 зависимых опухолей и/или вариантов рака. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения доза RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли для применения в раскрытых в настоящем изобретении способах, общепринятая для взрослого субъекта, может составлять примерно 200 мг, 400 мг, 500 мг, от 30 мг до 2000 мг, от 100 мг до 1500 мг или от 150 мг до 1500 мг п.о., о.р.д. Данной ежедневной
 10 дозы можно достичь посредством однократного введения или нескольких введений.

[0093] Введение доз RAD1901 при лечении рака молочной железы, включая устойчивые штаммы, а также случаи, экспрессирующие мутантный рецептор или рецепторы, находится в диапазоне от 100 мг до 1000 мг в день. Например, RAD1901 можно вводить в дозе 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мг в день. В
 15 частности, отмечают 200 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 800 мг и 1000 мг в день. Неожиданно длительный период полужизни RAD1901 у людей после п.о. введения в особенности свидетельствует о целесообразности данного лечения. Соответственно, лекарственный препарат можно вводить в виде 200 мг д.р.д. - два раза в день (всего 400 мг ежедневно), 250 мг д.р.д. (всего 500 мг ежедневно), 300 мг д.р.д. (всего 600 мг ежедневно), 400 мг
 20 д.р.д. (800 мг ежедневно) или 500 мг д.р.д. (всего 1000 мг ежедневно). Предпочтительным введением доз является пероральное введение.

[0094] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения варианты рака или опухоли являются устойчивыми ER-зависимыми вариантами рака или опухолями (например, содержащими мутантные домены связывания ER (например,
 25 ER α , содержащий одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и комбинации указанных мутаций), варианты рака или опухоли, сверхэкспрессирующие ER, или случаи, в которых пролиферация опухоли и/или рака становится лиганд-независимой, или опухоли и/или
 30 варианты рака, которые прогрессируют при лечении ССРЭ (например, фулвестрантом, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ингибиторами Her2 (например, трастузумабом, лапатинибом, аботрастузумабом эмтанзином и/или пертузумабом), химиотерапией (например, абраксаном, адриамицином, карбоплатином, цитоксаном, даунорубицином, доксилом, элленсом, фторурацилом, гемзаром, хелавеном, икземпрой, метотрексатом,
 35 митомицином, микоксантроном, навельбином, таксолом, таксотером, тиотепой, винкристином и кселодой), ингибитором ароматазы (например, анастрозолом, эксеместаном и летрозолом), селективными модуляторами рецептора эстрогенов (например, тамоксифеном, ралоксифеном, лазофоксифеном и/или торемифеном),
 40 ингибитором ангиогенеза (например, бевацизумабом) и/или ритуксимабом.

[0095] RAD1901 или его сольват (например, гидрат) или соль для применения в раскрытых в настоящем изобретении способах можно вводить субъекту один раз или несколько раз. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых соединения вводят несколько раз, данные соединения можно вводить с заданным
 45 интервалом, например, ежедневно, через день, еженедельно или ежемесячно. В качестве альтернативы, данные соединения можно вводить с нерегулярными интервалами, например, по мере необходимости в зависимости от симптомов, здоровья пациента и т.п.

[0096] RAD1901 или его сольват (например, гидрат) или соль для применения в раскрытых в настоящем изобретении способах можно приготовить в состав в единичных лекарственных формах, которые означают физически обособленные единицы, подходящие в качестве однократных доз для субъектов, лечение которых проводят, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, необязательно в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем. Единичная дозированная форма может предназначаться для однократной ежедневной дозы или одной из множества ежедневных доз (например, примерно от 1 до 4 или более раз каждый день). Когда используют несколько ежедневных доз, единичная дозированная форма для каждой дозы может являться одинаковой или разной. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения соединения могут быть приготовлены в состав для контролируемого высвобождения.

[0097] RAD1901 или его сольват (например, гидрат) или соль для применения в описанных в настоящем изобретении способах можно приготовить в состав согласно любому доступному общепринятому способу. Примеры предпочтительных лекарственных форм включают таблетку, порошок, измельченную гранулу, гранулу, покрытую таблетку, капсулу, сироп, пастилку, лекарственную форму для ингаляции, суппозиторий, инъекционное вещество, мазь, офтальмологическую мазь, глазные капли, капли для носа, ушные капли, горячий компресс, лосьон и т.п. В составе можно использовать обычно применяемые добавки, такие как разбавитель, связывающее вещество, разрыхляющее вещество, смазывающее вещество, красящее вещество, ароматизирующее вещество и, в случае необходимости, стабилизатор, эмульгирующее вещество, вещество, способствующее всасыванию, поверхностно-активное вещество, регулятор pH, антисептическое вещество, антиоксидант и т.п. Помимо этого, приготовление в состав также проводят посредством объединения композиций, которые, как правило, используют в качестве исходного материала для приготовления фармацевтических составов согласно общепринятым способам. Примеры данных композиций включают, например, (1) масло, такое как соевое масло, говяжье сало и синтетический глицерид; (2) углеводород, такой как жидкий парафин, сквалан и твердый парафин; (3) сложноэфирное масло, такое как октилдодецил миристиновая кислота и изопропил миристиновая кислота; (4) высший спирт, такой как цетостеариловый спирт и бегениловый спирт; (5) кремнийорганическую смолу; (6) кремнийорганическое масло; (7) поверхностно-активное вещество, такое как полиоксиэтиленовый эфир жирной кислоты, сорбитановый эфир жирной кислоты, глицериновый эфир жирной кислоты, полиоксиэтиленовый сорбитановый эфир жирной кислоты, твердое полиоксиэтиленовое касторовое масло и полиоксиэтиленовый полиоксипропиленовый блок-сополимер; (8) водорастворимую макромолекулу, такую как гидроксипропилцеллюлоза, полиакриловая кислота, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и метилцеллюлоза; (9) низший спирт, такой как этанол и изопропанол; (10) многовалентный спирт, такой как глицерин, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и сорбитол; (11) сахар, такой как глюкоза и тростниковый сахар; (12) неорганический порошок, такой как безводная кремниевая кислота, магний-алюминий силикат и силикат алюминия; (13) очищенную воду и т.п. Добавки для применения в вышеуказанных составах могут включать в качестве разбавителя, например, 1) лактозу, кукурузный крахмал, сахарозу, глюкозу, маннитол, сорбитол, кристаллическую целлюлозу, диоксид кремния; 2) в качестве связывающего вещества - поливиниловый спирт, поливиниловый эфир, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, аравийскую камедь, трагакантовую камедь,

желатин, шеллак, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, блок-сополимер полипропиленгликоль-полиоксиэтилен, меглумин, цитрат кальция, декстрин, пектин и т.п.; 3) в качестве разрыхлителей - крахмал, агар, желатиновый порошок, кристаллическую целлюлозу, карбонат кальция, бикарбонат натрия, цитрат кальция, декстрин, пектин, карбоксиметилцеллюлозу/кальций и т.п.; 4) в качестве смазывающего вещества - стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль, диоксид кремния, гидрогенированное растительное масло и т.п.; 5) любые красители, добавление которых является фармацевтически приемлемым, являются подходящими в качестве красителей; 6) в качестве ароматизирующего вещества - какао-порошок, ментол, ароматизатор, масло перечной мяты, порошок корицы; 7) антиоксиданты, добавление которых является фармацевтически приемлемым, такие как аскорбиновая кислота или альфа-тофенол.

[0098] RAD1901 или его сольват (например, гидрат) или соль для применения в раскрытых в настоящем изобретении способах можно приготовить в состав фармацевтической композиции в виде любого одного или нескольких из активных соединений, описанных в настоящем изобретении, и физиологически приемлемого носителя (также обозначаемый фармацевтически приемлемый носитель или раствор, или разбавитель). Такие носители и растворы включают фармацевтически приемлемые соли и сольваты RAD1901, используемые в способах согласно настоящему изобретению, и смеси, содержащие два или более таких соединений, фармацевтически приемлемые соли соединений и фармацевтически приемлемые сольваты соединений. Такие композиции получают в соответствии с приемлемыми фармацевтическими процедурами, такими, как описанные в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Eaton, Pa. (1985), которое включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0099] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает носитель, который не вызывает аллергической реакции или другого нежелательного эффекта в отношении пациентов, которым его вводят, и является совместимым с другими компонентами в составе. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, фармацевтические разбавители, вспомогательные вещества или носители, соответствующим способом выбранные в соответствии с предполагаемой формой введения и с учетом общепринятых фармацевтических практик. Например, твердые носители/разбавители включают, но не ограничены указанными, камедь, крахмал (например, кукурузный крахмал, прежелатинизированный крахмал), сахар (например, лактозу, маннитол, сахарозу, декстрозу), целлюлозное вещество (например, микрокристаллическую целлюлозу), акрилат (например, полиметилакрилат), карбонат кальция, оксид магния, тальк или смеси указанных веществ. Фармацевтически приемлемые носители могут также включать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность терапевтического средства.

[00100] RAD1901 в свободной форме может превращаться в соль общепринятыми способами. Термин «соль», используемый в настоящем изобретении, не ограничен, при условии, что соль образована с RAD1901 и является фармакологически приемлемой; предпочтительные примеры солей включают галоидоводородную соль (например, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид и т.п.), неорганическую кислотную соль (например, сульфат, нитрат, перхлорат, фосфат, карбонат, бикарбонат и т.п.), органическую карбоксилатную соль (например, ацетатную соль, малатную соль, тартратную соль, фумаратную соль, цитратную соль и т.п.), органическую сульфонатную соль (например,

метансульфонатную соль, этансульфонатную соль, бензолсульфонатную соль, толуенсульфонатную соль, камфорсульфонатную соль и т.п.), соль аминокислоты (например, аспартатную соль, глутаматную соль и т.п.), четвертичную аммониевую соль, соль щелочного металла (например, натриевую соль, калиевую соль и т.п.), соль щелочноземельного металла (магниевую соль, кальциевую соль и т.п.) и т.п. Помимо этого, гидрохлоридная соль, сульфатная соль, метансульфонатная соль, ацетатная соль и т.п. являются предпочтительными в качестве «фармакологически приемлемых солей» соединения согласно настоящему изобретению.

[00101] Изомеры RAD1901 (например, геометрические изомеры, оптические изомеры, ротамеры, таутомеры и т.п.) можно очистить с применением общеизвестных средств разделения, включая, например, перекристаллизацию, оптическое разрешение, такое как метод на основе диастереомерной соли, метод фракционирования ферментов, различные варианты хроматографии (например, тонкослойная хроматография, колоночная хроматография, хроматография на стекле и т.п.) с получением отдельного изомера. Термин «отдельный изомер» в настоящем изобретении включает не только изомер, который характеризуется чистотой 100%, но также изомер, содержащий изомер, отличный от целевого, который существует даже после общепринятого процесса очистки. Иногда существует кристаллический полиморф RAD1901 или его соли, и все кристаллические полиморфы указанного соединения включены в настоящее изобретение. Кристаллический полиморф иногда является отдельным, а иногда представляет собой смесь, и оба указанных варианта включены в настоящую заявку.

[00102] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 может находиться в форме пролекарства; это означает, что данное соединение должно подвергнуться некоторому изменению (например, окислению или гидролизу) для достижения своей активной формы. В качестве альтернативы, RAD1901 может представлять собой соединение, полученное посредством преобразования родительского пролекарства в его активную форму.

[00103] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения способы ингибирования роста опухоли, представленные в настоящем изобретении, также включают составление профиля гена субъекта, причем ген, профиль которого получают, представляет собой один или несколько генов, которые выбраны из группы, состоящей из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEBPA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL.

[00104] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения субпопуляции пациентов, страдающих от рака молочной железы, причем указанная субпопуляция характеризуется увеличенной экспрессией одного или нескольких из следующих генов, и лечение указанной субпопуляции эффективной дозой RAD1901 (или комбинацией) согласно вариантам реализации введения доз, описанным в настоящем изобретении.

[00105]

[00106] Помимо установления способности RAD1901 ингибировать рост опухоли

результаты, представленные в настоящем изобретении, продемонстрировали, что RAD1901 ингибирует связывание эстрадиола с ER в матке и гипофизе (пример III(A)). В данных экспериментах связывание эстрадиола с ER в ткани матки и гипофиза оценивали посредством визуализации ФЭС-ПЭТ. После лечения RAD1901 наблюдаемый

5 уровень связывания ER находился на фоновых уровнях или ниже фоновых уровней. Данные результаты позволили установить, что антагонистический эффект RAD1901 в отношении активности ER можно оценивать с применением сканирования в реальном времени. На основании данных результатов в настоящем изобретении представлены способы мониторинга эффективности лечения RAD1901 или его солью или сольватом

10 посредством измерения связывания эстрадиола с ER в одной или нескольких тканях-мишенях, причем уменьшение или исчезновение связывания означает эффективность.

[00107] Также предложены способы корректировки дозы RAD1901 или соли или сольвата на основании связывания эстрадиола с ER. Согласно определенным вариантам реализации данных способов связывание измеряют в определенной точке после одного

15 или нескольких введений первой дозы соединения. Если воздействие на связывание эстрадиола с ER отсутствует или демонстрирует уменьшение ниже заранее определенного порога (например, уменьшение связывания по сравнению с исходным уровнем составляет менее 5%, менее 10%, менее 20%, менее 30% или менее 50%), первую дозу считают слишком низкой. Согласно определенным вариантам реализации настоящего

20 изобретения данные способы включают дополнительный этап введения увеличенной второй дозы соединения. Данные этапы можно повторить с дозой, которую периодически увеличивают до достижения желаемого уменьшения связывания эстрадиола с ER. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения данные этапы можно включить в способы ингибирования роста опухоли,

25 представленные в настоящем изобретении. В данных способах связывание эстрадиола с ER может выступать в качестве посредника для ингибирования роста опухоли или в качестве дополнительного средства оценки ингибирования роста. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения данные способы можно использовать в сочетании с введением RAD1901 для целей, отличных от ингибирования роста опухоли,

30 включая, например, ингибирование пролиферации раковых клеток.

[00108] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем изобретении представлены способы корректировки дозы RAD1901 или его соли или сольвата (например, гидрата), причем указанный способ включает:

(1) введение первой дозы RAD1901 или сольвата (например, гидрата) или его соли

35 (например, от примерно 350 до примерно 500 мг или от примерно 200 до примерно 600 мг/день) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней;

(2) обнаружение активности связывания эстрадиола с ER, например, с применением визуализации ФЭС-ПЭТ, как раскрыто в настоящем изобретении; причем:

(i) если активность связывания ER является необнаруживаемой или находится ниже

40 уровня заранее определенного порога, продолжение введения первой дозы (т.е. сохранение уровня дозы); или

(ii) если активность связывания ER является обнаруживаемой или находится выше уровня заранее определенного порога, введение второй дозы, которая является большей, чем первая доза (например, первая доза плюс от примерно 50 до примерно 200 мг) в

45 течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней, затем переход к этапу (3);

(3) обнаружение активности связывания эстрадиола с ER, например, с применением визуализации ФЭС-ПЭТ, как раскрыто в настоящем изобретении; причем

(i) если активность связывания ER является необнаруживаемой или находится ниже

уровня заранее определенного порога, продолжение введения второй дозы (т.е. сохранение уровня дозы); или

(ii) если активность связывания ER является обнаруживаемой или находится выше уровня заранее определенного порога, введение третьей дозы, которая является большей, чем вторая доза (например, второй дозы плюс от примерно 50 до примерно 200 мг) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней, затем переход к этапу (4);

(4) повторение вышеуказанных этапов с использованием четвертой дозы, пятой дозы и т.д. до тех пор, пока не будет обнаруживаться какая-либо активность связывания ER.

[00109] Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение включает применение визуализации ПЭТ для обнаружения и/или лечения дозами видов рака, восприимчивых к ER или устойчивых к ER.

[00110] Пути введения RAD1901 или его сольвата (например, гидрата) или соли, описанные в настоящем изобретении, включают, но не ограничены указанными, местное введение, пероральное введение, внутрикожное введение, внутримышечное введение, интраперитонеальное введение, внутривенное введение, внутривенную инфузию, подкожное введение, трансдермальное введение и чресслизистое введение.

Взаимодействия RAD1901-ER α

(1) Мутантный ER α в ER-положительных образцах опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения

[00111] В пяти исследованиях, о которых сообщалось в последние два года, секвенировали в совокупности 187 метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения, и у 39 пациентов (21%) были обнаружены мутации ЛСД ER (Jeselson). Шесть наиболее частых мутаций ЛСД среди 39 пациентов показаны на схеме 1 по материалам публикации Jeselson, которая представлена в виде фиг. 42.

[00112] Частота всех мутаций ЛСД обобщена в таблице 11.

[00113] Компьютерное моделирование продемонстрировало, что взаимодействия RAD1901-ER α , вероятно, не нарушаются у мутантов ЛСД ER α , например, у мутанта Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P, на который приходится примерно 81,7% мутаций ЛСД, обнаруженных в недавнем исследовании метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения (таблица 11, пример V).

[00114] В настоящем изобретении представлены комплексы и кристаллы RAD1901, присоединенного к ER α и/или мутантному ER α , причем мутантный ER α содержит одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, и комбинации указанных мутаций.

[00115] Согласно определенным вариантам реализации способов, представленных в настоящем изобретении, ЛСД ER α и мутантный ER α содержит AF-2. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД содержит аминокислоты 299-554 ER α или состоит или состоит по существу из указанных аминокислот. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД мутантного ER α содержит одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, и комбинации указанных вариантов. Термин «и/или» в настоящем изобретении включает как случай «и», так и случай «или».

[00116] Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. В тех случаях, когда упоминаются конкретные материалы, данные упоминания приведены исключительно для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные способы или реактивы без приложения изобретательских усилий и не выходя за пределы объема настоящего изобретения. Следует понимать, что в процедуры, описанные в настоящем изобретении, могут быть внесены многочисленные вариации без отклонения от объема настоящего изобретения. Авторы настоящего изобретения считают, что такие вариации включены в объем настоящего изобретения.

Примеры

Материалы и методы

Исследуемые соединения

[00117] RAD1901, использованный в примерах ниже, представляет собой дигидрохлорид (6R)-6-(2-(N-(4-(2-(этиламино)этил)бензил)-N-этиламино)-4-метоксифенил)-5,6,7,8-тетрагидронафтален-2-ола, произведенный компанией IRIX Pharmaceuticals, Inc. (Флоренция, Южная Каролина). RAD1901 хранили в виде сухого порошка, приготовленного в состав для применения в виде гомогенной суспензии в 0,5% (масс./об.) метилцеллюлозы в деионизированной воде, и в случае моделей на животных вводили п.о. Тамоксифен, ралоксифен и эстрадиол (E2) получали в компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури), и вводили посредством подкожной инъекции. Фулвестрант получали в компании Tocris Biosciences (Миннеаполис, Миннесота) и вводили посредством подкожной инъекции. Другие лабораторные реактивы заказывали в компании Sigma-Aldrich, если не указано обратное.

Линии клеток

[00118] Клетки MCF-7 (метастазирующей аденокарциномы молочной железы человека) заказывали в Американской коллекции типовых клеточных культур (Роквилл, Мэриленд) и общепринятым способом поддерживали в не содержащей феноловый красный минимальной питательной среде (minimal essential medium, MEM), содержащей 2 мМ L-глутамина и ССР (сбалансированный солевой раствор) Эрла, 0,1 мМ заменимых аминокислот и 1 мМ пирувата натрия с добавлением 0,01 мг/мл инсулина быка и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) при содержании CO₂ 5%.

[00119] Клетки T47D культивировали в CO₂-инкубаторе при содержании CO₂ 5% в чашках размером 10 см до конфлюэнтности, составляющей примерно 75%, в среде роста RPMI с добавлением 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки) и 5 мкг/мл инсулина человека.

Ксенотрансплантатные модели in vivo

[00120] Всех мышей содержали в стерильных условиях в индивидуально вентилируемых клетках со стерилизованным и не содержащим пыли наполнителем, с доступом к стерилизованной пище и воде без ограничения, при цикле темноты/света (циркадный цикл искусственного света 12-14 часов) и при контролируемой комнатной температуре и влажности. Опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля с нониусом, и объемы рассчитывали с применением формулы:

$$(L \cdot W^2) \cdot 0,52.$$

PDx модели

[00121] Некоторые примеры полученных от пациентов ксенотрансплантатных моделей (PDx моделей) показаны на фиг. 1. PDx модели с полученной от пациента опухолью рака молочной железы устанавливали из жизнеспособной ткани опухоли человека или жидкости, которую перевивали сериями в животных (бестимусные мыши (Nu (NCF)-Foxn1nu)) ограниченное количество раз для поддержания гетерогенности опухоли. Перед проведением исследования регистрировали объемы опухолей для каждого эксперимента, начиная примерно за одну неделю до предполагаемой даты начала. Когда опухоли достигали соответствующего диапазона исходного объема опухоли (ИОО) (150-250 мм³), животных рандомизировали на группы лечения и контроля и начинали введение доз (день 0, 8-10 субъектов в каждой группе); животных во всех исследованиях отслеживали индивидуально в течение всего эксперимента. Изначальное введение доз начинали в день 0; животным во всех группах вводили дозы по массе (0,01 мл на грамм; 10 мл/кг). Каждая группа получала лечение наполнителем (контроль, п.о./о.р.д. до конечного критерия оценки), тамоксифеном (1 мг/субъекта, п.к./о.р.д. до конечного критерия оценки), фулвестрантом (Фаслодекс®; 1 мг/субъекта или 3 мг/субъекта при необходимости, п.к./еженедельно X 5 и увеличивали при необходимости) или RAD1901 (30, 60 или 120 мг/кг субъекта, п.о./о.р.д. до конечного критерия оценки), как указано, с дня 0. Период лечения длился в течение 56 - 60 дней в зависимости от моделей. В питьевую воду для данных PDx моделей добавляли 17β-эстрадиол.

Эффективность средства

[00122] Для всех исследований, начиная с дня 0, размеры опухоли измеряли цифровым штангенциркулем, и данные, включая отдельные и средние расчетные объемы опухолей (средний ОО (объем опухоли) ± СОС, стандартная ошибка среднего), записывали для каждой группы; объем опухоли рассчитывали с применением формулы из публикации (Yasui et al. Invasion Metastasis 17:259-269 (1997), которая включена в настоящую заявку посредством ссылки): $ОО = \text{ширина}^2 \times \text{длина} \times 0,52$. Анализ каждой группы или исследование прекращали, когда расчетный средний объем опухоли группы достигал конечной точки объема опухоли (ОО) (конечная точка времени составляла 60 дней; и конечная точка объема составляла среднее значение для группы, составляющее 2 см³); отдельных мышей, объем опухоли которых достигал 2 см³ или более, исключали из исследования, а итоговое измерение включали в среднее значение для группы до тех пор, пока среднее значение не достигало конечной точки объема, или исследование не достигало конечной точки времени.

Расчеты эффективности и статистический анализ

[00123] Значения % ингибирования роста опухоли (% ИРО) рассчитывали в одной временной точке (когда контрольная группа достигала конечной точки объема опухоли или конечной точки времени) и приводили для каждой группы лечения (Т) по сравнению с контролем (С) с применением исходных (i) и конечных (f) измерений опухоли по формуле (In vivo methods for screening and preclinical testing. In: Teicher B, ed., Anticancer Drug Development Guide. Totowa, NJ: Humana. 2004: 99-123): $\% \text{ ИРО} = 1 - \text{Tf} - \text{Ti} / \text{Cf} - \text{Ci}$.

Статистический анализ

[00124] Исследования ИРО - однофакторный дисперсионный анализ ANOVA + критерий множественного сравнения Даннета (Corbett TH et al).

Отбор образца

[00125] Опухоли отбирали в конечной точке. Один фрагмент быстро замораживали, тогда как другой фрагмент помещали в 10% ФЗН (формалин забуференный

нейтральный) по меньшей мере на 24 часа и фиксировали формалином и заливали парафином (ФФЗП). Быстро замороженные образцы хранили при температуре -80°C; блоки ФФЗП хранили при комнатной температуре.

Вестернблоттинг

5 [00126] Клетки собирали, и экспрессию белка анализировали с применением стандартной методики. Опухоли собирали в указанные временные точки после последнего дня введения дозы, гомогенизировали в буфере RIPA с ингибиторами протеазы и фосфатазы с применением гомогенизатора TissueLyser (Qiagen). Равные объемы белка разделяли в зависимости от молекулярной массы, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и получали отпечаток промоканием со следующими антителами с применением стандартной методики:

- Рецептор эстрогенов (SantaCruz (HC-20); sc-543)
- Рецептор прогестеронов (Cell Signaling Technologies; 3153)
- Винкулин (Sigma-Aldrich, v9131)

15 [00127] Анализы методом кПЦР (количественной полимеразной цепной реакции) проводили следующим образом: клетки собирали, экстрагировали мРНК, и равные объемы использовали для синтеза кДНК и кПЦР с праймерами, специфичными для рецептора прогестеронов, GREB1 и TFF1 (LifeTech). Полосы количественно определяли с применением программного обеспечения 1D Quant (GE).

Иммуногистохимия

20 [00128] Опухоли собирали, фиксировали формалином, заливали парафином. Залитые опухоли разрезали (6 мкм) и окрашивали антителами, специфичными в отношении ER, PR и Her2. Количественное определение проводили следующим образом: пять полей подсчитывали в отношении положительных клеток (0-100%) и интенсивности окрашивания (0-3+). Показатели по H-шкале (0-300) рассчитывали с применением следующей формулы: % положительности * интенсивность.

[00129] Пример I. RAD1901 ингибировал рост опухоли в опухоли и/или раке, которые экспрессировали ER ДТ или мутантный ER (например, Y537S), при различной предшествующей эндокринной терапии.

30 [00130] I(A). Эффективность RAD1901 на ксенотрансплантатных моделях на животных

[00131] I(A)(i) RAD1901 ингибировал рост опухоли на PDx моделях (от PDx-1 до PDx-12) вне зависимости от ER статуса и предшествующей эндокринной терапии

[00132] Фиг. 1 демонстрирует эффекты ингибирования роста опухоли на различных PDx моделях для мышей, получавших лечение RAD1901 в монотерапии. Проводили скрининг двенадцати полученных от пациентов ксенотрансплантатных моделей для исследования ответа на RAD1901 при множестве генетических фонов с варьирующими уровнями ER, PR и Her2. Полное исследование эффективности проводили для PDx моделей, помеченных «*» (от PDx-1 до PDx-4 и PDx-12), n=8-10. Данные PDx модели получали лечение наполнителем (отрицательный контроль) или RAD1901 в дозе 60 мг/кг в течение 60 дней п.о., о.р.д. Скрининговое исследование проводили для других PDx моделей (от PDx-5 по PDx-11), n=3, на получавших лечение наполнителем (отрицательный контроль) или RAD1901 в дозе 90 мг/кг, в течение 60 дней, п.о., о.р.д. Как продемонстрировано на фиг. 1, PDx модели, в которых рост запускался ER и дополнительным движущим механизмом (например, PR+ и/или Her2+), получали пользу от вариантов лечения RAD1901. RAD1901 являлся эффективным при ингибировании роста опухоли на моделях с мутациями ER и/или с высоким уровнем экспрессии Her2 (PDx) вне зависимости от предшествующего лечения: для не получавших лечения (не получавших рецептурных ЛП, лекарственных препаратов) или получавших лечение

ингибитором ароматазы, тамоксифеном (там), химиотерапией (химио), ингибиторами Her2 (Her2 и, например, трастузумабом, лапатинибом), бевацизумабом, фулвестрантом и/или ритуксимабом.

[00133] I(A)(ii) RAD1901 запускал регрессию на ксенотрансплантатных моделях, экспрессирующих ER ДТ

[00134] I(A)(ii)(1) RAD1901 запускал регрессию на ксенотрансплантатах MCF-7, восприимчивых к лечению фулвестрантом.

MCF-7 Ксенотрансплантатная модель-1

[00135] Противоопухолевые эффекты RAD1901 исследовали с применением первой ксенотрансплантатной модели MCF-7 (ксенотрансплантатная модель MCF-7-I) на самках бестимусных голых мышей (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu) с введением эстрадиола для стимуляции роста опухоли. За три дня до имплантации опухолевых клеток всем исследованным животным подкожно между лопатками имплантировали гранулы эстрогена (0,36 мг E2, высвобождение в течение 60 дней; Innovative Research of America, Сарасота, Флорида) с применением стерилизованного троакара. Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали до середины фазы логарифмического роста в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 100 единиц/мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 0,075% бикарбоната натрия и 25 мкг/мл гентамицина. В день имплантации опухолевых клеток клетки MCF-7 трипсинизировали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в фосфатно-буферном солевом растворе при концентрации 5×10^7 клеток/мл. Каждая исследуемая мышь получала 1×10^7 клеток MCF-7, которые имплантировали подкожно в правый бок; контролировали рост опухоли.

При необходимости массу опухоли рассчитывали на основании допущения, что 1 мм^3 объема опухоли эквивалентен 1 мг чистой массы опухоли. Массу тела измеряли о.р.д. в течение пяти дней после имплантации клеток MCF-7, затем два раза в неделю в течение оставшегося времени исследования.

[00136] Через четырнадцать дней после имплантации опухолевых клеток (обозначен как день 1 исследования) возраст мышей составлял девять недель, и масса тела варьировала от 21,4 до 32,5 грамм, объемы индивидуальных опухолей варьировали от 75 до 144 мм^3 , и средний объем опухоли (СОО) группы составлял 108 мм^3 . Мышей рандомизировали на девять групп по 15 животных в каждой, и мыши получали лечение наполнителем п.о., тамоксифеном (1 мг/животное п.к., о.р.д.д.), фулвестрантом (0,5 мг/животное п.к., о.р.д.) или RAD1901 (0,3, 1, 3, 10, 30, 60, 90 и 120 мг/кг п.о., о.р.д.).

[00137] Объемы опухолей оценивали два раза в неделю. Конечную точку опухоли определяли как СОО, составляющий в контрольной группе 1500 мм^3 . Переносимость лечения оценивали посредством измерений массы тела и частых наблюдений клинических признаков нежелательных эффектов, вызванных лечением. Животным со снижением массы тела, превосходящим 30% для одного измерения, или превосходящей 25% для трех измерений, из соображений гуманности проводили эвтаназию, и данное событие классифицировали как смерть, связанную с лечением. Приемлемую токсичность определяли как среднее снижение массы тела в группе, составляющую менее 20% в течение исследования, и не более одной смерти, связанной с лечением, на десять животных, получивших лечение, или 10%. В конце исследования животным проводили эвтаназию посредством итоговой пункции сердца с анестезией изофлураном.

[00138] Исход лечения оценивали на основании процента ингибирования роста опухоли (ИРО), который определяли как процент разности между объемом опухоли

на исходном уровне (т.е. в день 1) и объемом опухоли в конце исследования (т.е. в день 42). Совокупность данных для анализа ИРО включала всех животных в каждой группе, за исключением умерших по связанным с лечением или не связанным с лечением причинам. Порог потенциальной терапевтической активности был определен как эффект лечения $\geq 60\%$ ИРО. Результаты анализировали с применением критерия Краскела-Уоллиса или Манна-Уитни с предварительно заданным значением альфа, составляющим 0,05.

[00139] Лечение RAD1901 в дозах 30 и 60 мг/кг привело к значительному ИРО (66% ИРО ($P < 0,05$) и 88% ИРО ($P < 0,001$) в день 40, соответственно). Данные результаты являлись аналогичными таковым, полученным с тамоксифеном (86% ИРО в день 40) и фулвестрантом (88% ИРО в день 40) (фиг. 2А). На фиг. 2А ящики представляют собой от 25-ого до 75-ого перцентиля наблюдений, линии представляют собой медиану наблюдений, и «усы» представляют собой крайние значения наблюдений.

[00140] Для изучения того, будут ли более высокие дозы RAD1901 вызывать более устойчивый эффект на данной модели, оценивали дозы RAD1901 до 120 мг/кг (фиг. 2В-Д). В соответствии с ранее полученными результатами RAD1901 вызывал значительное ингибирование опухоли в дозе 60 мг/кг (94% ИРО в день 42 с 2/10 частичных регрессий, ЧР). Более высокие дозы приводили к еще большему ИРО (97% ИРО с 8/10 ЧР при 90 мг/кг; 96% ИРО с 7/10 ЧР при 120 мг/кг). Во всех исследованных дозах RAD1901 ингибировал рост опухоли в большей степени, чем тамоксифен или фулвестрант. Лечение тамоксифеном обеспечило ИРО, составляющее 90% (с 2/10 ЧР), тогда как лечение фулвестрантом привело к 87% ИРО (с 1/10 ЧР). Ингибирование RAD1901 в группе 90 и 120 мг/кг было в значительной степени большим относительно как тамоксифена ($P < 0,05$), так и фулвестранта ($P < 0,05$).

[00141] В целом, данные результаты продемонстрировали, что RAD1901 ингибирует индуцированный эстрогеном рост опухоли дозозависимым способом. В конце лечения объемы опухолей у мышей, получавших лечение RAD1901, были равными или меньшими, чем на исходном уровне; это свидетельствует, что RAD1901 не только ингибирует рост опухоли, но может также вызывать регрессию размера опухоли на ксенотрансплантатной модели на мышах.

[00142] RAD1901 хорошо переносился на всех уровнях доз, нежелательные эффекты в отношении массы тела отсутствовали (фиг. 2Е).

[00143] Противоопухолевые эффекты RAD1901 также исследовали с применением второго ксенотрансплантата MCF-7 (ксенотрансплантатная модель MCF-7-II), который получали, как описано ниже.

Ксенотрансплантатная модель MCF-7-II

[00144] За два дня до имплантации клеток мышам Balb/C-Nude инокулировали гранулы 17β -эстрадиола 0,18/высвобождение в течение 90 дней. Собирали клетки MCF-7 (PR+, Her2-), и 1×10^7 клеток имплантировали подкожно в правый бок мышей Balb/C-Nude. Когда средний размер опухоли достигал 200 мм^3 , мышей рандомизировали на группы лечения в зависимости от объема опухоли, и проводили лечение исследуемыми соединениями. Каждая группа получала лечение наполнителем (контроль, п.о., о.р.д. до конечного критерия оценки), фулвестрантом (Фаслодекс[®]; 3 мг/субъекта, п.к., о.р.н., X 5 и продолжали в случае необходимости) или RAD1901 (30 мг/кг или 60 мг/кг субъекта, п.о., о.р.д. до конечного критерия оценки), как указано, с дня 0. Период лечения длился в течение 28 дней.

[00145] Фиг. 3А-В демонстрируют, что на ксенотрансплантатной модели MCF-7-II

RAD1901 (30 мг/кг и 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) привел к более значительному ингибированию роста опухоли, чем фулвестрант (3 мг/субъект, п.к., о.р.н.). Неожиданно было установлено, что только у одного из десяти субъектов в группе лечения фулвестрантом наблюдалась незначительная регрессия опухоли в конце исследования, в то время как у пяти из десяти субъектов в группе лечения 30 мг/кг RAD1901 и у восьми из десяти субъектов в группе лечения 60 мг/кг RAD1901 наблюдался различный уровень регрессии (фиг. 3B).

[00146] I(A)(ii)(2) RAD1901 запускал регрессию опухоли на PDx моделях с ER ДТ (например, PDx-4, PDx-2 и PDx-11), восприимчивых к лечению фулвестрантом.

[00147] Несмотря на то, что различные PDx модели с ER ДТ (модели PDx-4, PR+, Her2- и PDx-2, PR+, Her2+, все не получавшие лечения; и PDx-11, PR+, Her2+, получавшие лечение ИА, фулвестрантом и химиотерапией) отвечали на фулвестрант различным образом (1 мг/дозу или 3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), лечение RAD1901 при различных дозах (30 мг/кг, 60 мг/кг и/или 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) вызвало более значительное ингибирование роста опухоли на всех PDx моделях, чем фулвестрант (фиг. 4A для PDx-4 моделей, фиг. 6 для PDx-2 моделей и фиг. 7 для PDx-11 моделей). Например, на PDx-4 моделях, которые являлись восприимчивыми к лечению фулвестрантом (1 мг/дозу), RAD1901 неожиданно останавливал рост опухоли или запускал регрессию опухоли у большего числа субъектов, чем фулвестрант (1 мг/субъекта) (фиг. 4B). Более того, на PDx-11 моделях, которые являлись восприимчивыми к лечению фулвестрантом (3 мг/дозу), RAD1901 неожиданно останавливал рост опухоли и запускал регрессию опухоли у всех субъектов, получавших лечение, тогда как фулвестрант (3 мг/субъекта) вызывал регрессию лишь у двух из 10 субъектов, получавших лечение (фиг. 7B).

[00148] RAD1901 в дозе 60 мг/кг п.о. сам по себе обеспечивал ингибирование роста опухоли, аналогичное фулвестранту 3 мг/дозу п.к. в монотерапии, на PDx-2 модели (фиг. 6). Более того, комбинация RAD1901 и фулвестранта не обеспечивала дополнительной пользы.

[00149] Наконец, на PDx-4 модели, которая являлась восприимчивой к лечению фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.), RAD1901-опосредованное ингибирование роста опухоли поддерживалось при отсутствии лечения по меньшей мере в течение двух месяцев после окончания периода лечения RAD1901 (30 мг/кг, п.о., о.р.д.), в то время как лечение эстрадиолом продолжали (фиг. 5).

[00150] I(A)(ii)(3) RAD1901 запускал регрессию на PDx моделях с ER ДТ (например, PDx-12), слабо восприимчивых к лечению фулвестрантом.

[00151] На PDx-12 с ER ДТ (PR+, Her2+, не получавшие лечения), слабо восприимчивой к фулвестранту (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.), лечение RAD1901 при различных дозах (30 мг/кг или 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) неожиданно вызвало регрессию опухоли на PDx-12 моделях (фиг. 8).

[00152] I(A)(iii) RAD1901 ингибировал рост опухоли и/или запускал регрессию на ксенотрансплантатных моделях, экспрессирующих мутантный ER (ER α Y537S)

[00153] I(A)(iii)(1) RAD1901 ингибировал рост опухоли на PDx-5 моделях, слабо восприимчивых к лечению фулвестрантом.

[00154] PDx-5 модели получали согласно аналогичному протоколу, как описано выше для PDx моделей. Размеры опухоли каждой группы введения доз измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля с нониусом, и объемы рассчитывали с применением формулы $(L \cdot W^2) \cdot 0,52$.

[00155] RAD1901 являлся более эффективным при ингибировании роста опухоли (60 мг/кг или 120 мг/кг, п.о., о.р.д.), чем фулвестрант, на PDx-5 моделях, слабо

восприимчивых к лечению фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) (фиг. 9А-С). Лечение более высокой дозой RAD1901 (120 мг/кг) являлось более эффективным, чем лечение RAD1901 меньшей дозой (60 мг/кг) (фиг. 9А-С). Размер опухоли отдельных животных измеряли в день 17 (фиг. 9В) и день 56 (фиг. 9С), соответственно.

5 [00156] I(A)(iii)(2) RAD1901 запускал регрессию на PDx-6 модели, восприимчивой к лечению фулвестрантом.

[00157] PDx модели, экспрессирующие мутантный ER (например, Y537S), восприимчивые к лечению фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и тамоксифеном (1 мг/дозу, п.к., 3 р.н. - 3 раза в неделю), например, PDx-6 (PR+, Her2:1+, ранее получавшие
10 лечение тамоксифеном, ИА и фулвестрантом) (фиг. 10А-В). RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг и 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) являлся более эффективным при ингибировании роста опухоли, чем фулвестрант и тамоксифен (фиг. 10А-В). Например, лечение PDx-6 моделей RAD1901 продемонстрировало регрессию опухолей, в то время как лечение фулвестрантом (1 мг/дозу) не продемонстрировало (фиг. 10В, демонстрирует изменение размера
15 индивидуальной опухоли в конце исследования по сравнению с исходным уровнем).

[00158] I(A)(iv) Оценка фармакокинетики лечения фулвестрантом в отношении мышей, не несущих опухоль.

[00159] Мышам вводили различные дозы фулвестранта; наблюдалась значительная экспозиция дозы в отношении субъектов (фиг. 11).

20 [00160] Фулвестрант вводили бестимусным мышам в количестве 1, 3 или 5 мг/дозу подкожно в день 1 (Д1 рецептурных ЛП) и день 8 (Д8 рецептурных ЛП, n=4/уровень дозы). Кровь собирали в указанные временные точки в течение 168 часов после введения второй дозы, центрифугировали, и плазму анализировали методом жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии.

25 [00161] I(B) RAD1901 стимулировал выживаемость на ксенотрансплантатной модели метастазов головного мозга на мышах (внутричерепные модели MCF-7).

[00162] Затем потенциальную способность RAD1901 преодолевать гематоэнцефалический барьер и ингибировать рост опухоли оценивали с применением ксенотрансплантатной модели внутричерепной опухоли MCF-7.

30 [00163] Самок бестимусных голых мышей (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu) использовали для исследований ксенотрансплантатов опухоли. За три дня до имплантации опухолевых клеток всем исследованным животным подкожно между лопатками имплантировали гранулы эстрогена (0,36 мг E2, высвобождение в течение 60 дней, Innovative Research of America, Сарасота, Флорида) с применением стерилизованного троакара. Клетки
35 аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали до середины фазы логарифмического роста в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 100 единиц/мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 2 mM глутамина, 10 mM HEPES, 0,075% бикарбоната натрия и 25 г/мл гентамицина. В день имплантации опухолевых клеток клетки трипсинизировали, осаждали
40 центрифугированием и ресуспендировали в фосфатно-буферном солевом растворе при концентрации 5×10^7 клеток/мл. Каждая исследуемая мышь получала 1×10^6 клеток MCF-7, которые имплантировали внутричерепным способом.

[00164] Через пять дней после имплантации опухолевых клеток (обозначен как день 1 исследования) мышей рандомизировали на три группы по 12 животных в каждой, и
45 проводили лечение наполнителем, фулвестрантом (0,5 мг/животное о.р.д.) или RAD1901 (120 мг/кг о.р.д.), как описано выше.

[00165] Конечная точка была определена как смертность или 3X выживаемость контрольной группы в зависимости от того, какое событие наступит первым.

Переносимость лечения оценивали посредством измерений массы тела и частых наблюдений клинических признаков нежелательных эффектов, вызванных лечением. Животным со снижением массы тела, превосходящим 30% для одного измерения, или превосходящей 25% для трех измерений, из соображений гуманности проводили эвтаназию, и данное событие классифицировали как смерть, связанную с лечением. Приемлемую токсичность определяли как среднее снижение массы тела в группе, составляющую менее 20% в течение исследования, и не более одной смерти, связанной с лечением, на десять животных, получивших лечение, или 10%. В конце исследования животным проводили эвтаназию посредством итоговой пункции сердца с анестезией изофлураном. Концентрацию RAD1901 и фулвестранта в плазме и опухоли определяли с применением ЖХ-МС/МС (жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии).

[00166] Анализ выживаемости Каплан-Мейер продемонстрировал, что RAD1901 значительно увеличивал выживаемость по сравнению с фулвестрантом ($P < 0,0001$; фиг. 12). Ни одно из животных в контрольной группе или группе фулвестранта не выжило к дню 20 и дню 34, соответственно, тогда как 41% (5/12) животных, получавших лечение RAD1901, выжили до конца исследования в день 54.

[00167] Концентрация RAD 1901 в плазме составила 738 ± 471 нг/мл, а во внутричерепной опухоли составила 462 ± 105 нг/г, что подтверждает гипотезу, согласно которой RAD1901 способен эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Напротив, концентрации фулвестранта являлись по существу более низкими в плазме (21 ± 10 нг/мл) и во внутричерепной опухоли ($8,3 \pm 0,8$ нг/г).

[00168] I(C). Исследование 1 фазы лечения RAD1901 ER+ запущенного рака молочной железы.

[00169] В исследовании 1 фазы оценивали безопасность, переносимость и фармакокинетику на 44 здоровых женщинах в постменопаузальном периоде. Дозолимитирующая токсичность не наблюдалась, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Экспозиция в плазме увеличивалась более чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

Субъекты

[00170] 8 женщин в постменопаузальном периоде с запущенной аденокарциномой молочной железы (ER+ опухоль с не менее 1% окрашиванием ИГХ, HER2-отрицательная опухоль с общим состоянием по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, восточная объединенная группа онкологов) 0 или 1) включали в качестве субъектов в данное исследование 1 фазы. Субъекты должны были получать следующие предшествующие виды лечения:

- не более 2 предшествующих режимов химиотерапии в условиях запущенного/метастазирующего заболевания

- 6 месяцев предшествующей эндокринной терапии и прогрессирование, наблюдавшееся при предшествующей эндокринной терапии

- Исключали субъектов с нелечеными или симптоматическими метастазами в ЦНС (центральной нервной системе) или с предшествующим противораковым лечением в пределах следующих окон:

- Тамоксифен <14 дней до первой дозы исследуемого лечения

- Фулвестрант <90 дней до первой дозы исследуемого лечения

- Химиотерапия <28 дней до первой дозы исследуемого лечения

- Аналог РФЛГ (релизинг-фактора лютеинизирующего гормона) <12 месяцев до первой дозы исследуемого лечения

Критерии ДЛТ

- Любая степень негематологической токсичности не менее 3 (исключая алопецию и тошноту, рвоту или диарею, которые не подвергали лечению оптимальным лекарственным препаратом)

- Любая степень гематологической токсичности не менее 3

5 - Любая степень токсичности, которая приводит к прекращению приема лекарственного препарата в течение >7 дней

- Период наблюдения дозолимитирующей токсичности представляет собой дни 1-28 цикла 1

Введение доз и оценка опухоли

10 [00171] Субъекты получали лечение одной дозой 200 мг или 400 мг п.о., о.р.д., и субъектов оценивали один раз в 8 недель до прогрессирования заболевания (фиг. 13). Ключевые демографические показатели на исходном уровне 8 женщин в постменопаузальном периоде с запущенной аденокарциномой молочной железы, включенных в исследование 1 фазы, обобщены в таблице 1.

15 [00172] Предшествующее противораковое лечение субъектов показано на фиг. 14А; и полученное лечение RAD1901 показано на фиг. 14В. Субъекты №№1-3 получали лечение 200 мг RAD1901 п.о., о.р.д., и субъекты №№4-7 получали лечение 400 мг RAD1901 п.о., о.р.д. Стрелками показаны проводимые исследования, а прямоугольниками показаны прекращенные виды лечения. На фиг. 14А «АС» представляет собой
20 доксорубицин/циклофосфамид; и «FAC» представляет собой 5-фторурацил/доксорубицин/циклофосфамид.

Нежелательные явления, возникшие после начала лечения (НЯПНЛ)

[00173] НЯПНЛ регистрировали в течение всего исследования. Предварительные данные обобщены в таблице 2. «n» представляет собой количество субъектов с по
25 меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории, НЯ классифицировали согласно общей терминологии критериев нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events, СТСАЕ) v4.0, и любого пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. Смертей или
30 дозолимитирующих токсичностей не наблюдалось, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Большинство НЯ относились к степени 1 или 2. Наиболее распространенными связанными с лечением НЯ являлись диспепсия (5/8 пациентов) и тошнота (3/8 пациентов). Наблюдались два серьезных НЯ (СНЯ), первое - констипация 3 степени, связанная с лечением, второе - затруднение дыхания (экссудат в плевральной
35 полости), не связанное с лечением.

[00174] Тяжело лечившиеся ранее субъекты данного исследования 1 фазы включали субъектов, ранее получавших лечение несколькими эндокринными средствами и средствами направленного действия, например, ингибиторами CDK4/6, PI3K и mTOR. После лечения RAD1901 в дозе 200 мг п.о., о.р.д. до 6 месяцев и в дозе 400 мг п.о., о.р.д.
40 в течение до двух месяцев дозолимитирующих токсичностей не наблюдалось. Таким образом, RAD1901 продемонстрировал потенциал лечения ER+ запущенного рака молочной железы, в особенности у субъектов, ранее получавших лечение эндокринными средствами и/или средствами направленного действия, такими как ингибиторы CDK4/6, PI3K и mTOR.

45 [00175] Пример II. RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухоли и может быть доставлен в головной мозг.

[00176] На ксенотрансплантатах MCF-7, описанных в примере I(A)(i), также оценивали концентрацию RAD1901 в плазме и опухоли с применением ЖХ-МС/МС. В конце

исследования концентрация RAD1901 в плазме составляла 344 ± 117 нг/мл, а в опухоли - 11118 ± 3801 нг/мл для уровня дозы 60 мг/кг. Аналогичное соотношение концентрации в опухоли к концентрации в плазме также наблюдалось для меньших уровней доз, когда концентрации в опухоли являлись примерно в 20-30 раз более высокими, чем в плазме.

5 Уровни RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге для мышей, получавших лечение в течение 40 дней, обобщены в таблице 3. Значительное количество RAD1901 доставлялось в головной мозг получавших лечение мышей (например, см. соотношение ГМ/П (концентрация RAD1901 в головном мозге/концентрация RAD1901 в плазме)); это свидетельствует о способности RAD1901 преодолевать гематоэнцефалический
10 барьер (ГЭБ). Неожиданно было установлено, что RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухоли. См., например, соотношение О/П (концентрация RAD1901 в опухоли/концентрация RAD1901 в плазме), представленное в таблице 3.

[00177] Пример III. RAD1901 ингибировал путь передачи сигналов посредством ER и вызывал деградацию ER.

15 [00178] III(A). RAD1901 уменьшал занятость ER в матке и гипофизе у здоровых субъектов-людей женского пола в постменопаузальном периоде.

[00179] У субъектов наблюдалась аменорея в течение по меньшей мере 12 месяцев и уровень ФСГ (фолликулостимулирующего гормона) в сыворотке, который соответствовал менопаузе. Возраст субъектов составлял 40-75 лет с ИМТ (индексом
20 массы тела) $18,0$ - 30 кг/м². Матка субъектов являлась целостной. Исключали субъектов, у которых наблюдались доказательства клинически значимой патологии, увеличенный риск инсульта или венозное тромбозное событие в анамнезе, или которые использовали сопутствующие лекарственные препараты менее чем за 14 дней до поступления в клинический исследовательский центр (прием парацетамола был разрешен
25 в течение до 3 дней до поступления).

[00180] ФЭС-ПЭТ проводили на исходном уровне и после 6 дней воздействия RAD1901 для оценки занятости ER в матке. RAD1901 оккупировал 83% и 92% ER в матке при уровнях дозы 200 мг (7 субъектов) и 500 мг (6 субъектов), соответственно.

30 [00181] Визуализация ФЭС-ПЭТ продемонстрировала значительное уменьшение связывания меченного эстрадиола как с маткой, так и с гипофизом после лечения RAD1901 200 мг или 500 мг (п.о., о.р.д., 6 дней).

[00182] В связи с высокой экспрессией ER в матке наблюдался мощный сигнал ФЭС-ПЭТ на исходном уровне до лечения RAD1901 (фиг. 15А, поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки субъекта 3, получавшего лечение уровнем дозы 200 мг, на исходном уровне;
35 фиг. 15В, сагиттальный вид и поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки, соответственно, субъекта 7, получавшего лечение уровнем дозы 500 мг, на исходном уровне). Однако при сканировании через четыре часа после введения дозы в день 6 исследования матка была слабо заметна (на уровне фонового сигнала или близко к фоновому сигналу ФЭС-ПЭТ (фиг. 15А, поперечный вид скана матки субъекта 3 в день 6; и фиг. 15В,
40 сагиттальный вид и поперечный вид скана матки, соответственно, субъекта 7 в день 6). Эти данные согласовывались с деградацией ER и/или конкуренцией за связывание с рецептором. Фиг. 15А и 15В также включают скан КТ матки, которой был получен в результате сканирования ФЭС-ПЭТ и который демонстрирует присутствие матки до и после лечения RAD1901.

45 [00183] Затем количественно определяли результаты сканирования ФЭС-ПЭТ матки, чтобы продемонстрировать изменение связывания ER после введения доз по сравнению с исходным уровнем для 7 субъектов (фиг. 15С). Представлены данные субъектов 1-3 и субъектов 4-7 в качестве примеров группы дозы 200 мг и группы дозы 500 мг,

соответственно. RAD1901 продемонстрировал устойчивую занятость ER при более низких уровнях дозы (200 мг).

[00184] На фиг. 16 продемонстрировано иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки (А) и гипофиза (В) перед (На исходном уровне) и после (После лечения) лечения RAD1901 в дозе 500 мг п.о., о.р.д., через шесть дней. На фиг. 16А продемонстрирован скан ФЭС-ПЭТ матки при (а) боковом поперечном сечении; (b) продольном поперечном сечении; и (с) продольном поперечном сечении.

[00185] На скане ФЭС-ПЭТ матки и гипофиза субъекта после введения доз наблюдалось отсутствие заметного сигнала связывания ER в матке (фиг. 16А, После лечения) и гипофизе (фиг. 16В, После лечения), соответственно.

[00186] Таким образом, результаты продемонстрировали, что RAD1901 эффективно занимал ER у человека в дозе 200 и 500 мг п.о., о.р.д., через шесть дней.

[00187] Стандартный уровень накопления (СУН) для матки, мышц и костей рассчитывали и обобщали для лечения RAD1901 в дозе 200 мг и 500 мг п.о., о.р.д. в таблицах 4 и 5, соответственно. После введения доз сигналы в матке были близки уровням от «тканей, отличных от тканей-мишеней», что свидетельствует о полном затухании накопления ФЭС-ПЭТ после лечения RAD1901. В тканях, которые в значительной степени не экспрессируют рецептор эстрогенов, практически не наблюдалось изменений на сканах ПЭТ до лечения по сравнению со сканами после лечения.

[00188] Таким образом, RAD1901 или его соль или сольват (например, гидрат) можно использовать при лечении раковых и/или опухолевых клеток, которые характеризуются сверхэкспрессией ER (например, рака молочной железы, рака матки и рака яичников), без оказания отрицательных эффектов на другие органы (например, кости, мышцы).

RAD1901 или его соль или сольват (например, гидрат) может быть в особенности пригодным при лечении метастазирующих вариантов рака и/или опухолей, характеризующихся сверхэкспрессией ER, в других органах, например, исходного рака молочной железы, рака матки и/или рака яичников, который мигрировал в другие органы (например, кости, мышцы), для лечения поражений рака молочной железы, рака матки и/или рака яичников в других органах (например, костях, мышцах) без оказания отрицательных эффектов на указанные органы.

[00189] III(В). RAD1901 уменьшал экспрессию ER и ингибировал путь передачи сигналов посредством ER.

[00190] III(В)(i)(1) Сравнение RAD1901 и фулвестранта на линиях клеток MCF-7 и T47D.

[00191] Эффекты RAD1901 и фулвестранта сравнивали с применением линий клеток MCF-7 и T47D, обе из которых представляют собой линии клеток рака молочной железы человека, при различных концентрациях, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ (фиг. 17А для анализов линии клеток MCF-7; и фиг. 17В для анализов линий клеток T47D). В качестве маркеров использовали три гена-мишени ER, рецептора прогестеронов (PgR), регуляции роста эстрогеном в раке молочной железы 1 (growth regulation by estrogen in breast cancer, GREB1) и фактора «трилистника» 1 (trefoil factor, TFF1). RAD1901 вызывал деградацию ER и ингибировал передачу сигналов посредством ER (фиг. 17А-В). Неожиданно было установлено, что RAD1901 являлся сравнимым или более эффективным, чем фулвестрант, при ингибировании роста опухоли и запуске регрессии опухоли, как раскрыто выше в примерах I(А) и I(В).

[00192] III(В)(i)(2) Лечение RAD1901 привело к деградации ER и отмене передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатной модели MCF-7-II, описанной выше

в примере I(A)(ii)(1).

[00193] Лечение RAD1901 привело к деградации ER in vivo (фиг. 18A-B, t-критерий Стьюдента: *p - значение <0,05, **p - значение <0,01) и ингибировало передачу сигналов посредством ER in vivo (фиг. 19A и 19C, t - критерий Стьюдента: *p - значение <0,05, **p-значение <0,01).

[00194] В опухоли, которую отбирали от ксенотрансплантата MCF-7 через 2 часа после введения последней дозы RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) или фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), наблюдалось значительное уменьшение экспрессии ER и PR (фиг. 18A-B). В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов после введения последней дозы лечения фулвестрантом, наблюдалась различная экспрессия PR и ER. Однако в опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов после введения последней дозы лечения RAD1901, наблюдалась уменьшенная экспрессия PR и ER (фиг. 18A и 18C).

[00195] В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов или через 12 часов после введения однократной дозы RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), наблюдалось быстрое уменьшение экспрессии PR (фиг. 19A). В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 4 часа или через 24 часа после введения 7-ой дозы RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), наблюдалось стойкое и стабильное ингибирование передачи сигналов посредством ER (фиг. 19B). Количественное определение анализов вестернблоттинга опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 в различные временные точки в течение лечения RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), продемонстрировало дозозависимое уменьшение PR (фиг. 19C).

[00196] Лечение RAD1901 вызвало быстрое уменьшение пролиферации на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. Например, опухоль, взятую у ксенотрансплантатных моделей MCF-7 через 8 часов после введения однократной дозы RAD1901 (90 мг/кг, п.о., о.р.д.) и через 24 часа после введения 4-ой дозы RAD1901 (90 мг/кг, п.о., о.р.д.), разрезали на срезы и окрашивали, чтобы продемонстрировать быстрое уменьшение уровня маркера пролиферации Ki67 (фиг. 20A и 20B).

[00197] Данные результаты свидетельствуют, что лечение RAD1901 приводит к деградации ER и ингибированию передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатах ER ДТ in vivo.

[00198] III(B)(i)(3) Лечение RAD1901 привело к деградации ER и к отмене передачи сигналов посредством ER на PDx-4 моделях, описанных выше в примере I(A)(ii).

[00199] Лечение RAD1901 вызвало быстрое уменьшение пролиферации на PDx-4 моделях. Например, через четыре часа после введения последней дозы в последний день исследования эффективности в течение 56 дней в опухоли, взятой у PDx-4 моделей, получавших лечение RAD1901 (30, 60 или 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) или фулвестрантом (1 мг/животное, о.р.н.), которые разрезали на срезы, наблюдалось быстрое уменьшение уровня маркера пролиферации Ki67 по сравнению с PDx-4 моделями, получавшими лечение фулвестрантом (фиг. 21).

[00200] Данные результаты свидетельствуют, что лечение RAD1901 приводит к деградации ER и ингибированию передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатах ER ДТ in vivo.

[00201] III(B)(ii) Лечение RAD1901 привело к уменьшению передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатных моделях (PDx-5) с мутантным ER, описанных выше в примере I(A)(iii)(1).

[00202] Опухоли собирали в указанные временные точки после последнего дня введения дозы (если не указано обратное), гомогенизировали в буфере RIPA с

ингибиторами протеазы и фосфатазы с применением гомогенизатора TissueLyser (Qiagen). Равные объемы белка разделяли в зависимости от молекулярной массы, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и получали отпечаток промоканием со следующим антителом, описанным в разделе «Материалы и методы»: рецептор прогестеронов (PR, 5 Cell Signaling Technologies; 3153).

[00203] Проводили количественное определение полос с применением программного обеспечения 1D Quant (GE), и PR (шкала Оллреда), полученные на PDx-5 моделях, описанных в примере I(A)(iii)(1), показаны на фиг. 22. Фулвестрант оказывал незначительное влияние на экспрессию PR, тогда как RAD1901 продемонстрировал 10 эффективность в дозах как 60 мг/кг, так и 120 мг/кг (п.о., о.р.д., фиг. 22).

[00204] Данные результаты свидетельствуют, что в случае опухолей, экспрессирующих определенные мутации ER α (например, Y537S), RAD1901 являлся более эффективным, чем фулвестрант, при ингибировании роста опухоли вне зависимости от того, являлась ли опухоль восприимчивой к лечению фулвестрантом/тамоксифеном (фиг. 9 для PDx-5 15 и фиг. 10 для PDx-6), и являлся в особенности эффективным при ингибировании роста опухолей, которые являлись слабо восприимчивыми к лечению фулвестрантом (например, в дозе 3 мг/дозу, п.к., о.р.н., фиг. 9 для PDx-5). Более того, в случае опухолей, которые не отвечали хорошо на лечение фулвестрантом (например, PDx-5), RAD1901 являлся эффективным для уменьшения экспрессии PR *in vivo*, в то время как фулвестрант 20 не являлся эффективным (фиг. 23).

[00205] Пример IV. Влияние лечения RAD1901 на ткани матки и/или МПК

[00206] IV(A(1)): RAD1901 выступал в качестве антагониста стимуляции ткани матки эстрадиолом.

[00207] Утеротропные эффекты RAD1901 исследовали посредством оценки изменений 25 массы матки, гистологии и экспрессии гена C3 у неполовозрелых крыс. Результаты репрезентативного исследования представлены на фиг. 23.

Оценка утеротропной активности

[00208] Детенышей крыс Спрег-Доули отлучали от матери на 19 день жизни, рандомизировали в группы (n=4) и вводили наполнитель (водную метилцеллюлозу), 30 E2 (0,01 мг/кг), ралоксифен (3 мг/кг), тамоксифен (1 мг/кг), RAD1901 сам по себе (от 0,3 до 100 мг/кг) или RAD1901 (от 0,01 до 10 мг/кг) в комбинации с E2 (0,01 мг/кг), п.к. или п.о. в установленном порядке (см. раздел «Реактивы», выше) о.р.д. в течение 3 последовательных дней. Через двадцать четыре часа после введения последней дозы всем животным проводили эвтаназию посредством ингаляции диоксида углерода. Для 35 каждого животного регистрировали массу тела и чистую массу матки. Аналогичные анализы также проводили с RAD1901 (от 0,03 до 100 мг/кг) на крысах и мышах (Charles River Laboratories, Монреаль, Квебек).

[00209] Свежую ткань матки от каждой крысы фиксировали в 4% параформальдегиде, обезвоживали этанолом и заливали в пластичный полимер JB4. Получали срезы 40 толщиной 8 мкм и окрашивали 0,1% толуидиновым синим О. Толщину эпителия эндометрия измеряли с помощью микроскопа Zeiss Axioskop 40 с применением программы Spot Advanced; рассчитывали среднее из 9 измерений на образец.

Экспрессия гена компонента 3 (C3) комплемента в матке

[00210] Для определения относительных уровней экспрессии C3 в получавшей лечение 45 ткани матки экстрагировали РНК из оставшейся ткани с применением набора для очистки РНК Micro to Midi Total RNA Purification Kit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) согласно инструкциям производителя. РНК количественно определяли, и проводили обратную транскрипцию равных объемов с применением набора High Capacity cDNA

Archive Kit (Applied Biosystems, Фостер-Сити).

[00211] Количественную ПЦР проводили с применением системы ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). ПЦР проводили с применением мастер-микс Taqman Universal с наборами зондов для C3 и для 18S рибосомальной РНК в качестве эталонного гена.

5 Условия циклического температурного воздействия включали начальный этап денатурации при температуре 95°C в течение 10 мин., после чего следовали 40 циклов при температуре 95°C в течение 15 секунд и при температуре 60°C в течение 1 минуты.

[00212] Относительную экспрессию гена определяли посредством нормирования каждого образца к эндогенному контролю (18S) и сравнения с калибратором
10 (наполнитель). Относительную экспрессию гена определяли с применением следующего уравнения: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (где Ct = пороговый цикл или номер цикла, на котором продукт ПЦР был впервые обнаружен, ΔCt = нормированное значение образца, и $\Delta\Delta Ct$ = нормированная разность между субъектом, получавшим дозу, и наполнителем). Определения экспрессии гена в пяти повторах проводили для каждой дозы во время
15 каждого исследования.

[00213] Лечение E2 (0,01 мг/кг), ралоксифеном (РАЛ, 3 мг/кг) или тамоксифеном (ТАМ, 1 мг/кг) привело к значительному увеличению чистой массы матки по сравнению с наполнителем в монотерапии, тогда как лечение RAD1901 в диапазоне доз от 0,3 до 100 мг/кг значительно не влияло на чистую массу матки (фиг. 23А). Представленные
20 данные (фиг. 23А) представляют собой средние значения ($\pm COC$); n=4 крыс на группу; Р по сравнению с наполнителем: $* < 0,05$; по сравнению с E2: $\ddagger < 0,05$. Также при введении в комбинации с E2 (0,01 мг/кг) RAD1901 выступал в качестве антагониста E2-опосредованной стимуляции матки дозозависимым способом, демонстрируя значительное ингибирование утеротропной активности в дозе 0,1 мг/кг и более и полное
25 ингибирование в дозе 3 мг/кг. EC_{50} для RAD1901 составляла примерно 0,3 мг/кг.

Аналогичные результаты были получены на мышах, когда дозы RAD1901 от 0,03 до 100 мг/кг также не оказывали эффекта в отношении чистой массы матки или толщины эпителия (данные не показаны).

[00214] Затем связанные с лечением изменения ткани матки исследовали посредством
30 количественной микроскопической гистологии. Наблюдалось статистически значимое увеличение толщины эндометриального эпителия после лечения E2 в дозах 0,01 и 0,3 мг/кг (фиг. 23В). Значительное увеличение толщины эпителия также наблюдалось после лечения тамоксифеном (1 мг/кг) или ралоксифеном (3 мг/кг). Напротив, лечение RAD1901 не вызвало увеличения толщины эндометриального эпителия до наивысшей
35 исследованной дозы 100 мг/кг. Иллюстративные изображения эпителия эндометрия представлены на фиг. 23С.

[00215] В соответствии с изменениями массы матки и толщины эндометриального эпителия E2, тамоксифен и ралоксифен значительно увеличивали экспрессию гена регулируемого эстрогеном компонента, C3 (фиг. 23D). Напротив, RAD1901 не
40 увеличивал экспрессию гена C3 ни в одной из исследованных доз (от 0,3 до 100 мг/кг). Более того, RAD1901 в дозах 1, 3 и 10 мг/кг значительно подавлял стимулированную E2 экспрессию гена C3.

RAD1901 не стимулирует матку неполовозрелых самок крыс

[00216] Неполовозрелым самкам крыс вводили п.о., о.р.д. в течение 3
45 последовательных дней наполнитель (НАПОЛН), эстрадиол (E2), ралоксифен (РАЛ), тамоксифен (ТАМ), RAD1901 или RAD1901+E2. Измеряли чистую массу матки. Представленные данные (фиг. 23А) представляют собой средние значения ($\pm COC$); n=4 крыс на группу; Р по сравнению с наполнителем: $* < 0,05$; по сравнению с E2: $\ddagger < 0,05$.

Пример 11(A)(2). Лечение RAD1901 защищало от атрофии костной ткани у крыс после овариоэктомии

[00217] Специфичные в отношении костей эффекты RAD1901 исследовали на крысах после овариоэктомии.

5 [00218] Для получения модели постменопаузальной атрофии костной ткани проводили овариоэктомию на взрослых самках крыс Спрег-Доули при анестезии с имитацией хирургического вмешательства в качестве контроля. После хирургического вмешательства крысы после овариоэктомии получали лечение о.р.д. в течение 4 недель наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (0,1, 0,3, 1, 3 мг/кг), которые вводили, как
10 описано выше; группы содержали по 20 животных. Животные в группе имитации хирургического вмешательства получали лечение наполнителем. Всем животным проводили эвтаназию посредством ингаляции диоксида углерода через 24 часа после введения последней дозы. Минеральную плотность костей оценивали на исходном уровне и снова через 4 недели лечения с применением двухэнергетической рентгеновской
15 абсорбциометрии PIXImus.

[00219] При вскрытии левую бедренную кость каждого животного отбирали, рассекали без присутствия мягких тканей и хранили в 70% этаноле перед проведением анализа. Подробную качественную и количественную 3-D оценку проводили с применением системы micro-CT40 (Scanco Systems, Уэйн, Пенсильвания). Для каждого
20 образца получали 250 изображений срезов метафиза дистальной бедренной кости. Морфометрические параметры определяли с применением прямого 3-D подхода в предварительно выбранных областях для анализа. Параметры, которые определяли в трабекулярной кости, включали плотность костной ткани, плотность поверхности костей, число трабекул, толщину трабекул, расстояние между трабекулами, плотность
25 соединительной ткани и кажущуюся плотность костей.

[00220] После овариоэктомии у не получавших лечение (получавших контроль - наполнитель) крыс наблюдалось уменьшение минеральной плотности костей как во всей полной бедренной кости, так и в поясничном отделе по сравнению с исходным уровнем (таблица 6). Лечение E2 было связано с предотвращением атрофии костной
30 ткани как в бедренной кости, так и в спинном хребте. Лечение RAD1901 привело к дозозависимому и статистически значимому подавлению вызванной овариоэктомией атрофии костной ткани (данные представлены для группы лечения 3 мг/кг). В дозах от 0,1 мг/кг до 3 мг/кг минеральная плотность костей у получавших лечение RAD1901 крыс была полной при отсутствии статистически значимых различий по сравнению с
35 группой, получавшей лечение E2.

[00221] Анализ дистальной бедренной кости методом микро-КТ (таблица 7) продемонстрировал, что овариоэктомия вызвала значительные изменения количества ключевых параметров микроархитектуры по сравнению с животными с имитацией хирургической операции. Данные изменения согласовывались с уменьшением массы
40 костей и включали уменьшение объема костей, уменьшение числа трабекул, толщины и плотности и увеличение разделения трабекул. В соответствии с сохранением минеральной плотности костей, которое наблюдалось после лечения RAD1901, в ключевых микроструктурных параметрах наблюдалось значительное сохранение архитектуры трабекул (таблица 7).

45 [00222] Пример IV(B): Исследование 1 фазы с увеличением дозы RAD101 у здоровых женщин в постменопаузальном периоде

[00223] В исследовании 1 фазы оценивали безопасность, переносимость и фармакокинетику на 44 здоровых женщинах в постменопаузальном периоде.

Дозолимитирующие токсичности (ДЛТ) не наблюдались, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Экспозиция в плазме увеличивалась более чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

Субъекты

5 [00224] 44 здоровых женщин в постменопаузальном периоде включали в качестве субъектов в данное исследование 1 фазы. У субъектов наблюдались аменорея в течение по меньшей мере 12 месяцев и уровень ФСГ в сыворотке, который соответствовал менопаузе. Возраст субъектов составлял 40-75 лет с ИМТ 18,0-30 кг/м². Исключали субъектов, у которых наблюдались доказательства клинически значимой патологии, 10 увеличенный риск инсульта или венозное тромбозное событие в анамнезе, или которые использовали сопутствующие лекарственные препараты менее чем за 14 дней до поступления в клинический исследовательский центр (прием парацетамола был разрешен в течение до 3 дней до поступления).

Введение доз

15 [00225] Субъекты получали лечение плацебо или по меньшей мере одну дозу п.о., о.р.д. после легкого завтрака в течение 7 дней при уровнях дозы 200 мг, 500 мг, 750 мг и 1000 мг, соответственно. Ключевые демографические показатели на исходном уровне 44 здоровых женщин в постменопаузальном периоде, включенных в исследование 1 фазы, обобщены в таблице 8.

20 Нежелательные явления, возникшие после начала лечения (НЯПНЛ)

[00226] Регистрировали НЯПНЛ, и наиболее частые (>10% пациентов в суммарной активной группе, у которых наблюдались любые связанные НЯПНЛ) нежелательные явления (НЯ) обобщены в таблице 9, «n» представляет собой количество субъектов с по меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории, НЯ 25 классифицировали согласно общей терминологии критериев нежелательных явлений (СТСАЕ) v4.0, и любого пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. Дозолимитирующая токсичность не наблюдалась, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена.

30 Оценка фармакокинетики

[00227] Серии образцов крови отбирали в течение исследования для анализа RAD1901 в плазме. Образцы крови объемом по 5 мл каждый отбирали посредством баллонного внутривенного катетера или посредством прямой венопункции в пробирки, содержащие K₃-EDTA в качестве антикоагулянта. Устойчивого состояния достигали на день 5 35 лечения. Оценивали геометрическое среднее (Geo-Mean) профилей RAD1901 концентрация в плазме - время. Результаты определения фармакокинетики в плазме групп, получавших лечение RAD1901 (200, 500, 750 или 1000 мг), в день 7 (N=35) исследования представлены в таблице 10 и на фиг. 24 в качестве примера. Медиана t_{1/2} находилась в диапазоне 40 между 37,5 и 42,3 часов (таблица 10). После введения нескольких доз RAD1901 медиана t_{max} варьировала в диапазоне между 3 и 4 часами после введения доз.

[00228] Пример V(A)-1. Моделирование связывания RAD1901-ER α с применением избранных опубликованных структур ER.

45 [00229] Если не указано обратное, когда структуры представлены реберной моделью, каждый конец связи окрашен тем же цветом, что и атом, к которому присоединена данная связь, где серый цвет представляет собой углерод, красный - кислород, синий - азот и белый - водород.

[00230] Четырнадцать опубликованных структур (т.е. моделей) лиганд-связывающего

домена (ЛСД) ER α , образовавших комплексы с различными лигандами ER, выбирали из 96 опубликованных моделей посредством тщательной оценки. Одна из данных четырнадцати моделей представляла собой 3ERT (ЛСД ER α человека, присоединенный к 4-гидрокситамоксифену (ОНТ)). ОНТ представляет собой активный метаболит тамоксифена и СМРЭ первого поколения, который действует в качестве антагониста в ткани молочной железы.

[00231] В 3ERT (фиг. 25 и 26) сайт связывания ER α принимает вид трехслойного «сэндвича из спиралей», образующего гидрофобный карман, который содержит спираль 3 (H3), спираль 5 (H5) и спираль 11 (H11) (фиг. 25). Пунктирный ящик на фиг. 26 представляет собой сайт связывания и остатки в сайте связывания, которые являются важными или осуществляются в результате связывания ОНТ. ОНТ выступает в качестве антагониста посредством вытеснения H12 в сайт, в котором связывается коактиватор (или коактиваторы) LXXLL. ОНТ оккупирует пространство, в норме заполненное L540, и модифицирует конформацию четырех остатков на С-конце спирали 11 (G521, H524, L525 и M528). ОНТ также образует соляной мостик с D351, что приводит к нейтрализации заряда.

[00232] Другие тринадцать моделей ЛСД ER α -лиганд ER сравнивали с 3ERT. Различия в положениях остатков данных моделей обобщены в таблице 12. Наложение структур ER α четырнадцати моделей (фиг. 27) демонстрирует, что данные структуры значительно отличаются в остатках E380, M421, G521, M522, H524, Y526, S527, M528, P535, Y537, L540 и различных комбинациях указанных остатков.

[00233] Расчеты среднего квадратичного отклонения (СКО) для любой пары четырнадцати моделей обобщены в таблице 13. Структуры считали перекрывающимися, когда СКО структур составляло $<2 \text{ \AA}$. Таблица 13 демонстрирует, что все четырнадцать моделей характеризуются СКО $<1,5 \text{ \AA}$. Применение анализа условного форматирования свидетельствует, что 1R5K и 3UUC являлись наименее подобными другим моделям (анализ не показан). Вследствие этого 1R5K и 3UUC считали уникальным, отдельным структурным кластером для исследования.

[00234] Остатки ER α , связанные лигандом на четырнадцати моделях, обобщены в таблице 14. В таблице 14 также представлена EC₅₀ в комплексах ЛСД ER α - антагонист. Из четырнадцати моделей в тринадцати наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и E353; в двенадцати наблюдались пи-взаимодействия между лигандом и F404; в пяти наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и D351; в шести наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и H524; в четырех наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и R394; и в одной (3UUC) наблюдались взаимодействия между лигандом и T347.

[00235] Каждую из четырнадцати моделей использовали для докинга случайной библиотеки из 1000 соединений плюс лиганд, с которым была опубликована модель (известный антагонист), для определения того, может ли модель обнаружить и отдавать предпочтение известному антагонисту. Если модель способна обнаружить известный антагонист, модель определяли как способную предсказывать положение ее собственного опубликованного лиганда. Затем рассчитывали EF₅₀ для количественного определения силы модели, чтобы увидеть, насколько данная модель превосходила случайный выбор. RAD1901 состыковывали в выбранных моделях (например, фиг. 28-32). Определяли показатели докинга опубликованного лиганда и RAD1901 в моделях. Также определяли EC₅₀. Визуальное изучение RAD1901 продемонстрировало, что

данное соединение «подчинялось» взаимодействию, представленному с опубликованными лигандами в 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ. Пространственные конфликты не были отмечены. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения, например, в 1R5k и 2BJ4, RAD1901 обладал более высоким показателем докинга, чем опубликованный лиганд.

[00236] Результаты оценки девяти моделей (1ERR, 3ERT, 3UCC, 2IOK, 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ) обобщены в таблице 15.

[00237] 1ERR и 3ERT не могли предсказать верное положение своего кристаллизованного лиганда. RAD1901 не состыковывался в 3UCC. Тетрагидронафтаден связывался в 2IOK-RAD1901 нетрадиционным способом.

[00238] Основные различия между моделями 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ наблюдались в остатках в С-конце спирали 11 (G521-M528).

[00239] На фиг. 28А-В представлено моделирование RAD1901-1R5K (А) и GW5-1R5K (В). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353, R394 и L536; и посредством пи-взаимодействия с F404.

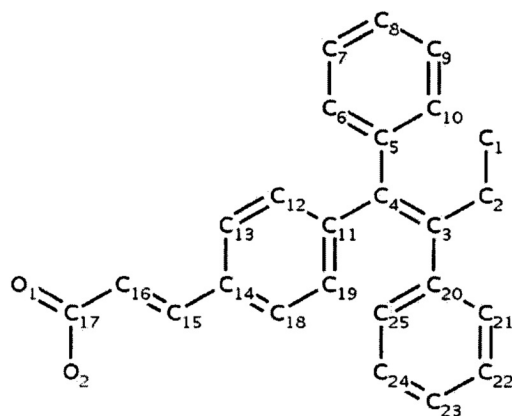
[00240] На фиг. 29А-В представлено моделирование RAD1901-1SJ0 (А) и E4D-1SJ0 (В). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353 и D351; и посредством пи-взаимодействия с F404.

[00241] На фиг. 30А-В представлено моделирование RAD1901-2JFA (А) и RAL-2JFA (В). RAD1901 связывался посредством пи-взаимодействия с F404.

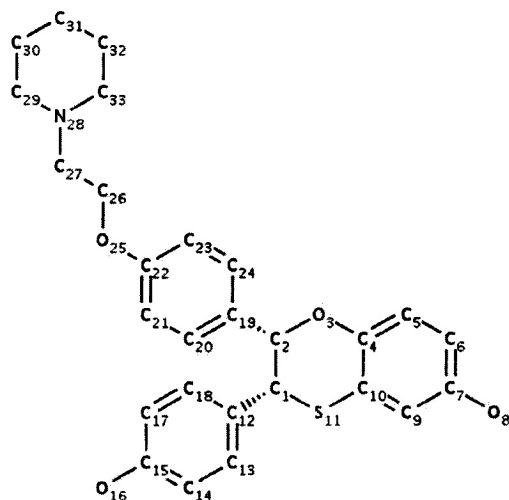
[00242] На фиг. 31 А-В представлено моделирование RAD1901-2BJ4 (А) и ОНТ-2BJ4 (В). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353 и R394; и посредством пи-взаимодействия с F404.

[00243] На фиг. 32А-В представлено моделирование RAD1901-2IOK (А) и IOK-2IOK (В). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353, R394 и D351; и посредством пи-взаимодействия с F404.

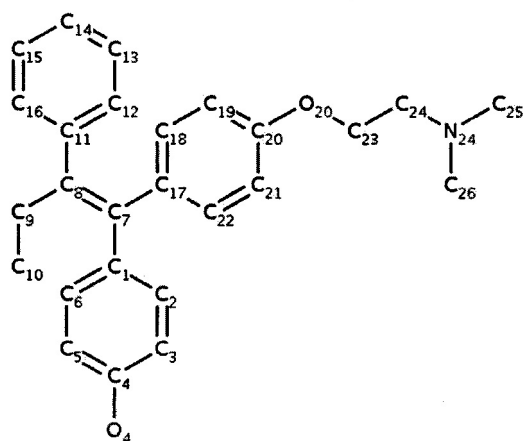
[00244] Опубликованные лиганды в моделях имеют следующие структуры:



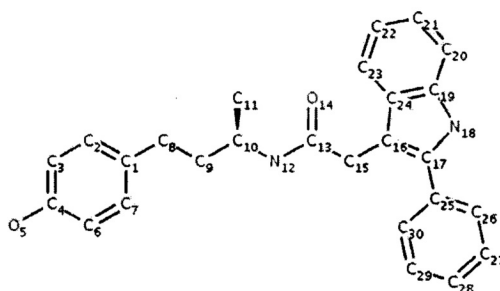
GW5, (2E)-3-{4-[(1E)-1,2-ДИФЕНИЛБУТ-1-ЕНИЛ]ФЕНИЛ}АКРИЛОВАЯ КИСЛОТА



Е4D, (2S,3R)-2-(4-(2-(ПИПЕРИДИН-1-ИЛ)ЭТОКСИ)ФЕНИЛ)-2,3-ДИГИДРО-3-(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)БЕНЗО[В][1,4]ОКСАТИИН-6-ОЛ



ОНТ, 4-ГИДРОКСИТАМОКСИФЕН



ИОК, N-[(1R)-3-(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-1-МЕТИЛПРОПИЛ]-2-(2-ФЕНИЛ-1Н-ИНДОЛ-3-ИЛ)АЦЕТАМИД

[00245] Пример V(A)-2. Докинг индуцированного соответствия (ДИС) ER α с RAD1901

и фулвестрантом

[00246] Конформацию связывания RAD1901 в ER α дополнительно оптимизировали посредством анализа ДИС пяти кристаллических структур ER α : 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ. В анализе ДИС учитывали гибкость рецептора (после связывания лиганда)

5 для аккомодации его правильной конформаций связывания.

[00247] Библиотеку различных конформаций для каждого лиганда (например, RAD1901 и фулвестранта) получали посредством поиска локальных минимумов как функции вращений относительно вращающихся связей. Библиотека для RAD1901 содержала 25 различных конформаций.

10 [00248] Пять кристаллических структур ER α получали и минимизировали.

Соответствующий лиганд в опубликованных рентгеновских структурах использовали для определения кармана связывания ER α .

[00249] Конформаций RAD1901 состыковывали в полученные структуры ER α , где данным конформациям позволяли вызывать движения боковой цепи или остова к

15 остаткам, расположенным в кармане связывания. Данные движения позволяли ER α изменять сайт связывания, так что он приобретал более близкую конформацию к форме и способу связывания конформаций RAD1901. В некоторых примерах при анализе ДИС допускали небольшие релаксации остова в структуре рецептора и значительные изменения конформаций боковой цепи.

[00250] Эмпирическую оценочную функцию использовали для приближения свободной энергии связывания лиганда с целью получения показателя докинга, или Gscore. Gscore также известен как GlideScore, и в данном примере данный термин можно использовать

20 взаимозаменяемо с показателем докинга. Показатель докинга представлял собой оценку аффинности связывания. Вследствие этого чем ниже значение показателя докинга, тем

25 «лучше» лиганд присоединяется к своему рецептору. Показатель докинга от -13 до -14 соответствовал очень хорошему взаимодействию связывания.

[00251] Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа ДИС с 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ, соответственно, накладывали, чтобы продемонстрировать различия между ними (фиг. 33-35, показаны на реберной модели). Все связи в каждой конформаций

30 RAD1901 на фиг. 33, 34 и 35А представлены одинаковым цветом.

[00252] Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 1R5K (синий) и 2OUZ (желтый), содержали группу RAD1901 N-бензил-N-этиланилин на передней стороне (фиг. 33). Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 2BJ4 (зеленый) и 2JFA (розовый), содержали группу RAD1901 N-бензил-N-этиланилин на задней стороне

35 (фиг. 34). Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 2BJ4 (зеленый), 2JFA (розовый) и 1SJ0 (коричневый), являлись вполне аналогичными, что демонстрируется наложением данных конформаций (фиг. 34А и 34В). Показатели докинга ДИС RAD1901 обобщены в таблице 16.

[00253] ДИС RAD1901 с 2BJ4 продемонстрировал взаимодействия водородной связи

40 с E353 и D351 и пи-взаимодействия с F404 (фиг. 36А-36С). На фиг. 36А представлены области в сайте связывания, подходящие для акцепторной группы водородной связи (красный), донорной группы водородной связи (синий) и гидрофобной группы (желтый). На фиг. 36А-36В светло-синий цвет означает углерод для RAD1901. На фиг. 37А-37С представлены взаимодействия белок-поверхность ДИС RAD1901 с 2BJ4. Фиг. 37А и

45 37В представляют собой вид спереди, и фиг. 37С представляет собой вид сбоку.

Молекулярная поверхность RAD1901 окрашена синим цветом на фиг. 37А и зеленым - на фиг. 37С. Фиг. 37В и 37С представляют собой электростатическое представление доступной для растворителя поверхности ER α , где красный цвет представляет собой

электроотрицательную, и синий представляет собой электроположительную поверхность.

[00254] Аналогичный анализ ДИС проводили для фулвестранта с 2BJ4, как описано выше. ДИС фулвестрант-2BJ4 привел к получению Gscore, который составлял -14,945, и продемонстрировал взаимодействия водородной связи с E353, Y526 и H524 и пи-взаимодействия с F404 (фиг. 38A-38C). На фиг. 38A представлены области в сайте связывания, подходящие для акцепторной группы водородной связи (красный), донорной группы водородной связи (синий) и гидрофобной группы (желтый). На фиг. 38A светло-синий цвет означает углерод для RAD1901.

[00255] На фиг. 39A и 39B представлены RAD1901 и фулвестрант, состыкованный в 2BJ4 посредством ДИС, оба из которых образовывали пи-взаимодействия с F404 и взаимодействия водородной связи с E353. Более того, RAD1901 содержал взаимодействие водородной связи с D351 (синий цвет представляет молекулярную поверхность RAD1901, фиг. 39B), в то время как фулвестрант содержал взаимодействие водородной связи с Y526 и H524 (зеленый цвет представляет молекулярную поверхность фулвестранта, фиг. 39C). Наложения 2BJ4, состыкованного с RAD1901 и фулвестрантом, показаны на фиг. 40A и 40B. На фиг. 40A зеленый цвет представляет собой молекулярную поверхность фулвестранта, и синий цвет представляет собой молекулярную поверхность RAD1901. На фиг. 40B коричневая структура представляет собой фулвестрант, и синяя структура представляет собой RAD1901.

[00256] Пример V(A)-3. Оценка моделирования избранных мутаций ER α .

[00257] Оценивали эффекты различных мутаций ER α в отношении С-конца лиганд-связывающего домена. Конкретные мутации ER α , оценку которых проводили, представляли собой мутант Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P.

[00258] Y537 расположен в спирали 12. Данный остаток может регулировать связывание лиганда, гомодимеризацию и связывание ДНК, когда является фосфорилированным, и может позволить ER α избежать опосредованных фосфорилированием контролей и обеспечить клетке потенциальное селективное опухолегенное преимущество. Помимо этого, данный остаток может вызывать

конформационные изменения, которые приводят к постоянной активации рецептора.

[00259] Мутация Y537S способствует транскрипционно активной закрытой конформаций кармана независимо от того, занят карман лигандом или нет. Закрытый, но не занятый карман может обуславливать конститутивную активность ER α (Carlson et al. Biochemistry 36:14897-14905 (1997)). Ser537 устанавливает взаимодействие водородной связи с Asp351, которое приводит к изменению конформаций спирали петли 11-12 и к заглублению Leu536 в недоступное для растворителя положение. Данное событие может способствовать конститутивной активности мутантного белка Y537S. Мутация поверхности Y537S не оказывает влияния на структуру кармана ЛСД.

[00260] Y537N распространен в ER α -отрицательном метастазирующем раке молочной железы. Мутация в данном сайте может позволить ER α избежать опосредованных фосфорилированием контролей и обеспечить клетке потенциальное селективное опухолегенное преимущество. В частности, замена Y537N вызывает конформационные изменения в ER α , которые могут имитировать связывание гормона, не нарушая способности рецептора димеризоваться, но предоставляя рецептору функцию конститутивной трансактивации (Zhang et al. Cancer Res 57:1244-1249 (1997)).

[00261] Y537C оказывает аналогичный эффект в отношении Y537N.

[00262] D538G может сдвигать весь энергетический ландшафт посредством стабилизации как активной, так и неактивной конформаций, несмотря на то, что более

предпочтительной является активная конформация. Данное событие может приводить к конститутивной активности данного мутанта при отсутствии гормонов, как наблюдалось на устойчивых к гормонам вариантах рака молочной железы (Huang et al., "A newfound cancer activating mutation reshapes the energy landscape of estrogen-binding domain, "J. Chem. Theory Comput. 10:2897-2900 (2014)).

[00263] Ни одна из данных мутаций, как ожидается, не оказывает влияния на лиганд-связывающий домен и специфично не препятствует связыванию RAD1901. Y537 и D538 могут вызывать конформационные изменения, которые приводят к конститутивной активации рецептора вне зависимости от связывания лиганда.

[00264] Пример V(B). Анализ связывания конструкций ER α дикого типа и мутанта ЛСД с RAD1901 и другими соединениями *in vitro*

[00265] Анализ связывания конструкций ER α дикого типа (ДТ) и мутантного ЛСД с RAD1901 *in vitro* продемонстрировал, что RAD1901 присоединяется к мутантному ER α с аналогичной аффинностью, что и к ER α ДТ.

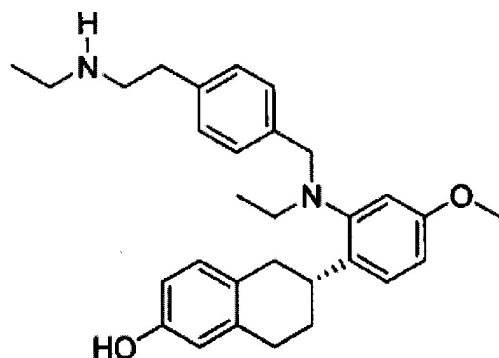
[00266] Конструкции ER α ДТ и мутантного ЛСД получали посредством экспрессии и очистки соответствующих остатков ЛСД 302-552 с N-концевым тиоредоксином и метками 6xHis, которые отщеплялись протеазой TEV.

[00267] Метод флуоресцентной поляризации (ФП) применяли для определения связывания исследуемых соединений (RAD1901, фулвестранта, базедоксифена, ралоксифена, тамоксифена и AZD9496) с ER α согласно инструкциям производителя (Polar Screen, Invitrogen) с 2 нМ фторомона, 100 нМ конструкции ER α ДТ или мутантного ЛСД. Каждую серию проводили в двух повторах, и анализировали одно исследуемое соединение для определения IC₅₀ для различных конструкций ER α (фиг. 41 для анализа связывания RAD1901).

[00268] Как указано выше, вышеизложенное описание предназначено исключительно для иллюстрации различных вариантов реализации настоящего изобретения. Специфичные модификации, которые обсуждаются выше, не следует истолковывать как ограничения объема настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что можно получить различные эквиваленты, изменения и модификации, не выходя за рамки объема настоящего изобретения, при этом следует понимать, что такие эквивалентные варианты реализации включены в настоящую заявку. Все источники, ссылки на которые содержатся в настоящем изобретении, включены посредством ссылки в той же мере, как если бы указанные источники были полностью изложены в настоящем изобретении.

(57) Формула изобретения

1. Способ ингибирования роста опухоли или обеспечения регрессии опухоли у субъекта, страдающего от рака молочной железы, положительного по мутантному рецептору эстрогенов альфа, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества RAD1901 следующей структуры:



или его соли или сольвата.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой устойчивый к лекарственным препаратам рак молочной железы, положительный по рецептору эстрогенов альфа.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой метастазирующий рак молочной железы.

4. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный рак является положительным по мутантному рецептору эстрогенов альфа, содержащему одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы, состоящей из Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, D538G, E380Q и комбинации указанных мутаций, где:

X₁ представляет собой S, N или C, и X₂ представляет собой R или Q.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанная мутация представляет собой Y537S.

6. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что соотношение концентрации RAD1901 или его соли или сольвата в опухоли и концентрации RAD1901 или его соли или сольвата в плазме (О/П) после введения составляет по меньшей мере 15.

7. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный субъект страдает от остеопороза или имеет высокий риск развития остеопороза.

8. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой женщину в перименопаузальном периоде.

9. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой женщину в постменопаузальном периоде, у которой был рецидив или прогрессирование заболевания после предшествующего лечения СМРЭ (селективными модуляторами рецептора эстрогенов) и/или ИА (ингибиторами ароматазы).

10. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет от 150 до 1500 мг один раз в день.

11. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что соль указанного соединения представляет собой дигидрохлорид RAD1901.

12. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанная опухоль является устойчивой к лекарственному препарату, выбранному из группы, состоящей из антиэстрогенов, ингибиторов ароматазы и комбинаций указанных препаратов.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный антиэстроген представляет собой тамоксифен или фулвестрант.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный ингибитор ароматазы представляет собой аромазин.

15. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет от 150 мг до 2000 мг.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанное терапевтически эффективное

количество составляет 200 мг, 400 мг или 500 мг.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

1

Фиг. 1

Монотерапия RAD1901						
	Модель	История приема рецептурных ЛП	ER	PR	Her2	RAD1901
Низкий уровень ER+/Her2	PDx-1*	Не получавшие рецептурных ЛП	+	-	+	
	PDx-2*	Не получавшие рецептурных ЛП	++	++	+	
	PDx-3*	Не получавшие рецептурных ЛП	+++	+++	+	
	PDx-4*	Не получавшие рецептурных ЛП	+++	+++	-	
Мутант ESR1	PDx-5	ИА	Y537S, ++	+++	+	
	PDx-6	там, ИА, фулвестрант	Y537S, ++	+++	+	
Высокий уровень ER+/Her2	PDx-7	Не получавшие рецептурных ЛП	++	-	++	
	PDx-8	Her2и, там, бевацизумаб, химио	+	-	+++	
	PDx-9	там, ИА, химио	+	-	+++	
	PDx-10	ИА, ритуксимаб, химио	++	-	++	
	PDx-11	ИА, фулвестрант, химио	+++	+++	++	
	PDx-12*	Не получавшие рецептурных ЛП	++	++	++	

ИА: ингибитор ароматазы

там: тамоксифен

химио: химиотерапия

Her2и: трастузумаб, лапатиниб

Не получавшие рецептурных ЛП: не получавшие лечения

Показатели ИГХ (по Н-шкале)

+ = 0-100

+ = 101-200

+ = 201-300

<25% ИРО

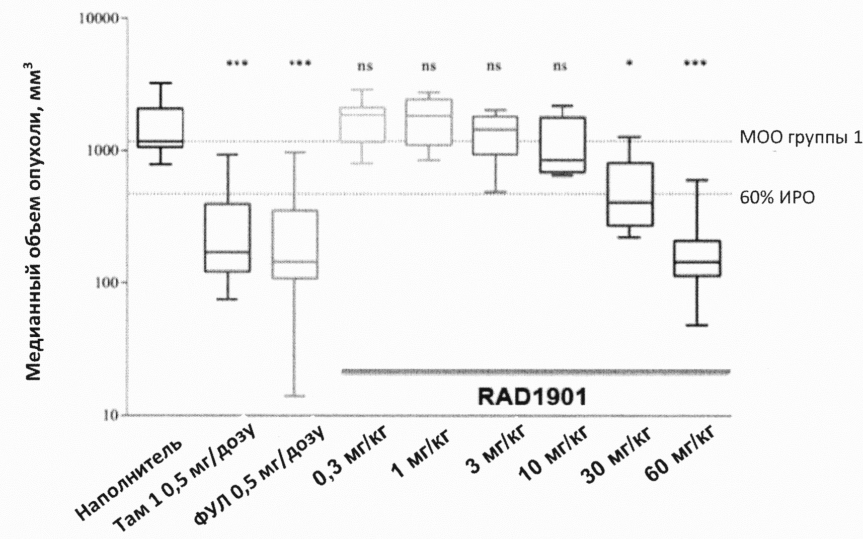
26-64% ИРО

65-100% ИРО

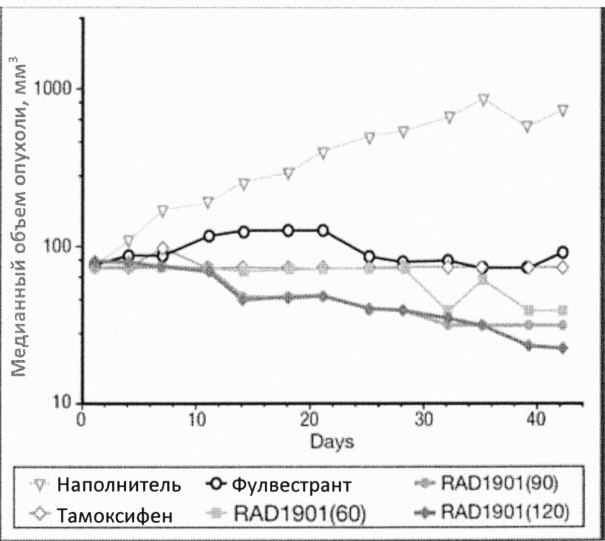
Ингибирование роста опухоли (ИРО) = (1 - [Средний объем опухоли группы RAD1901/ Средний объем опухоли

2

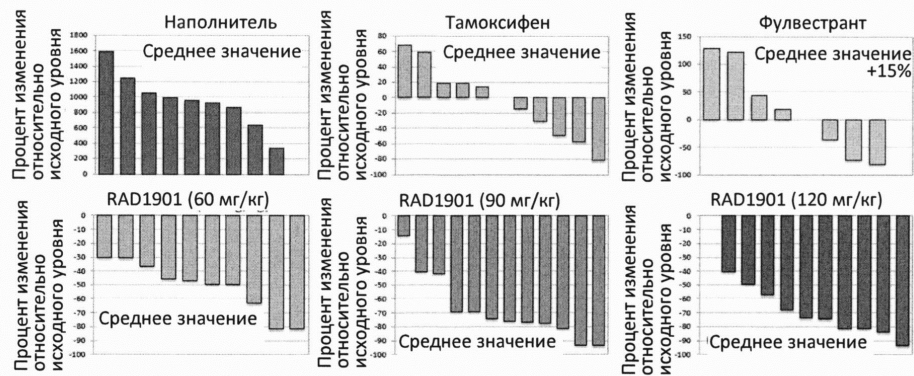
Фиг. 2А



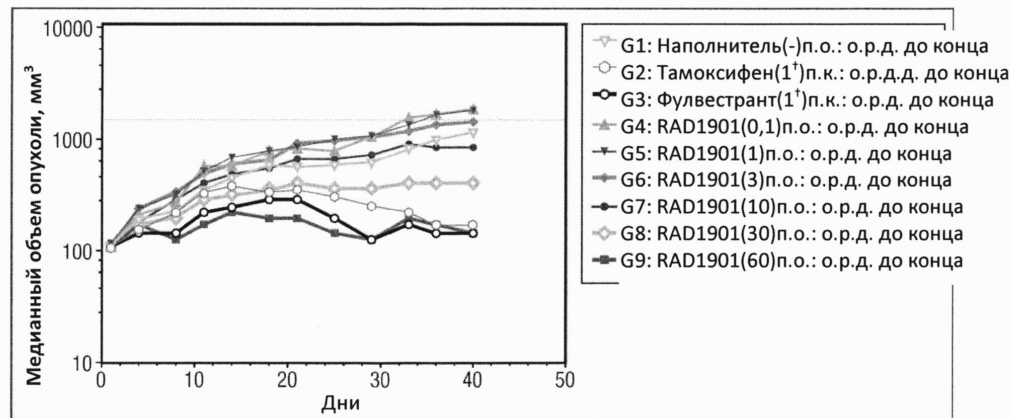
Фиг. 2В



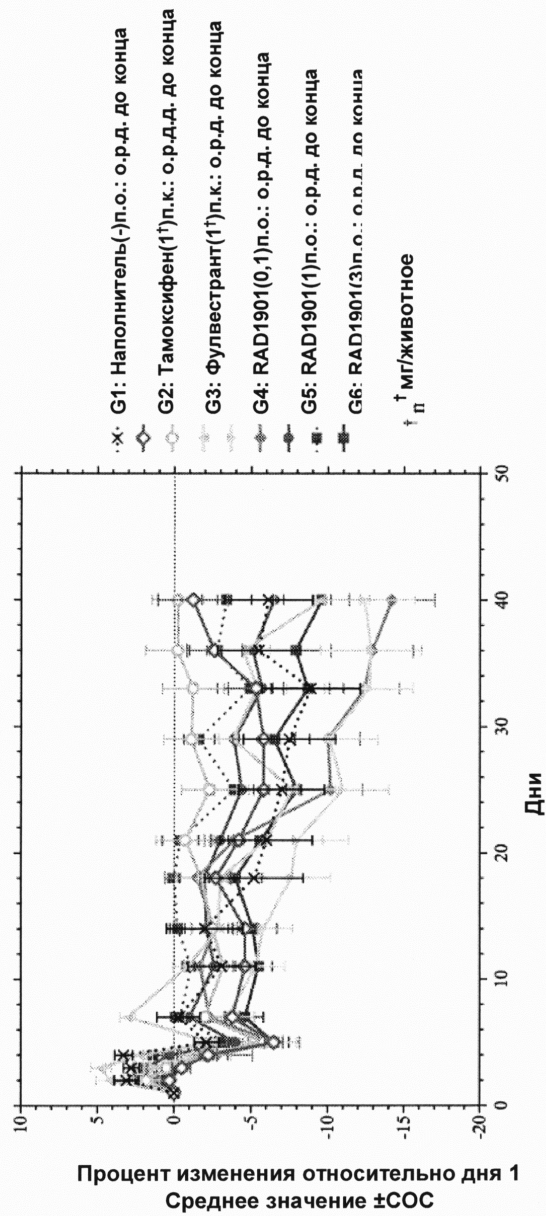
Фиг. 2С



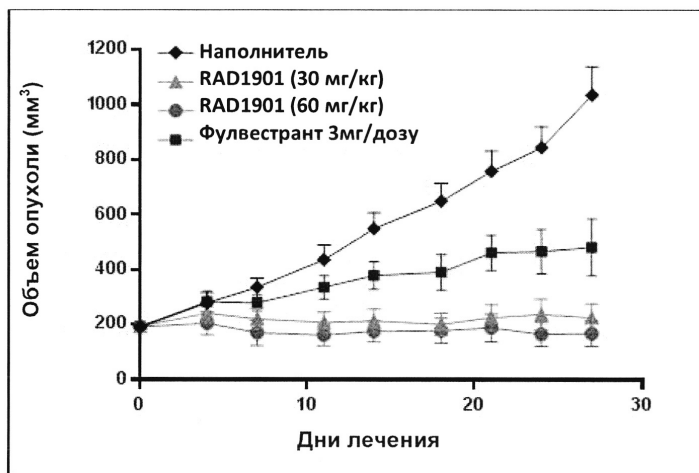
Фиг. 2D



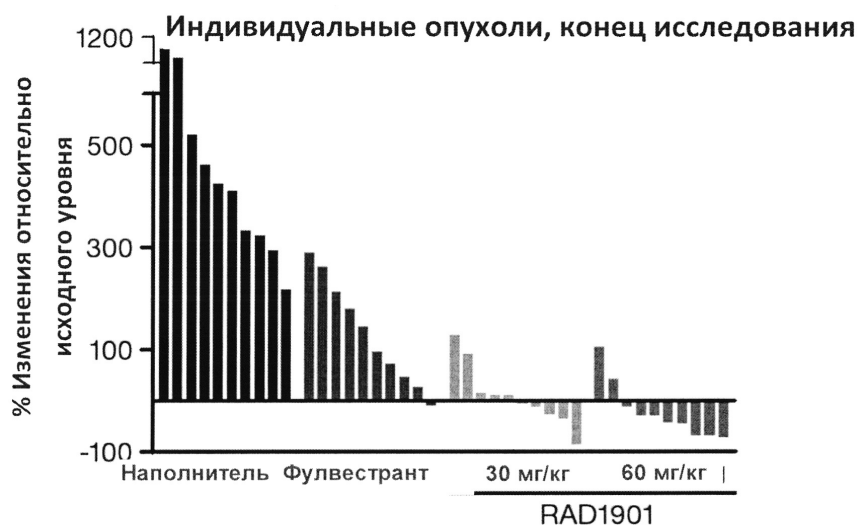
Фиг. 2Е



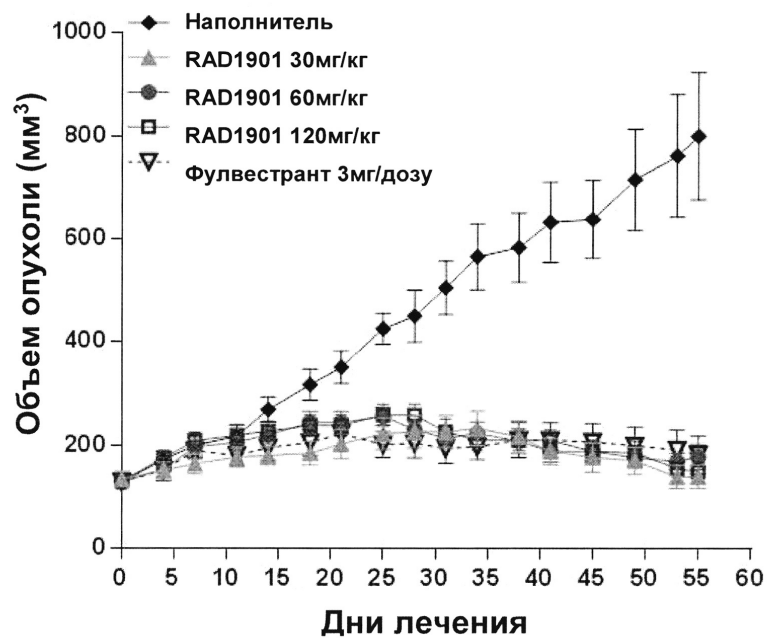
Фиг. 3А



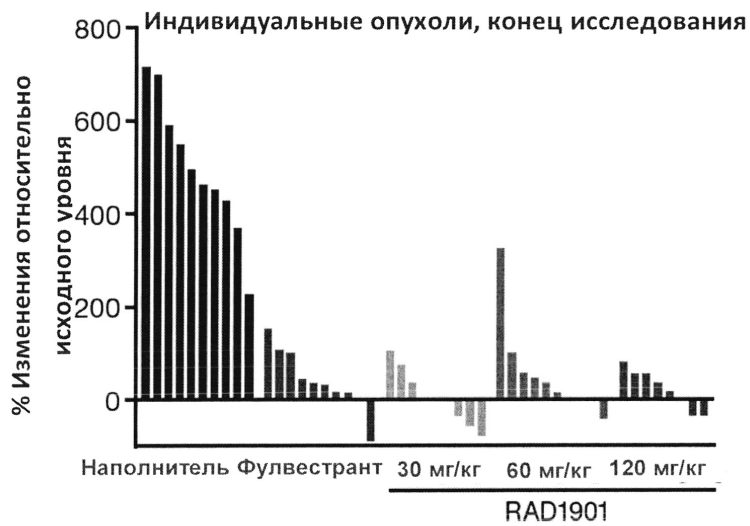
Фиг. 3В



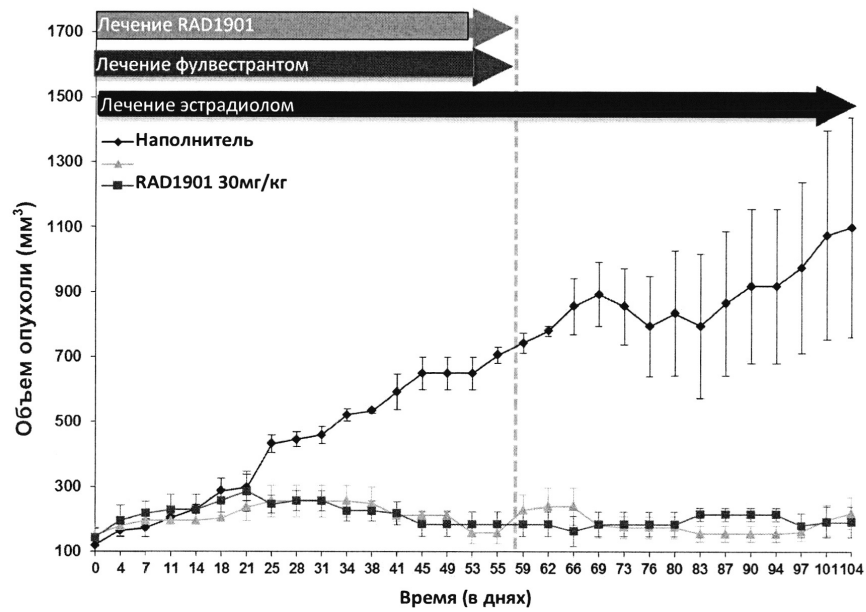
Фиг. 4А



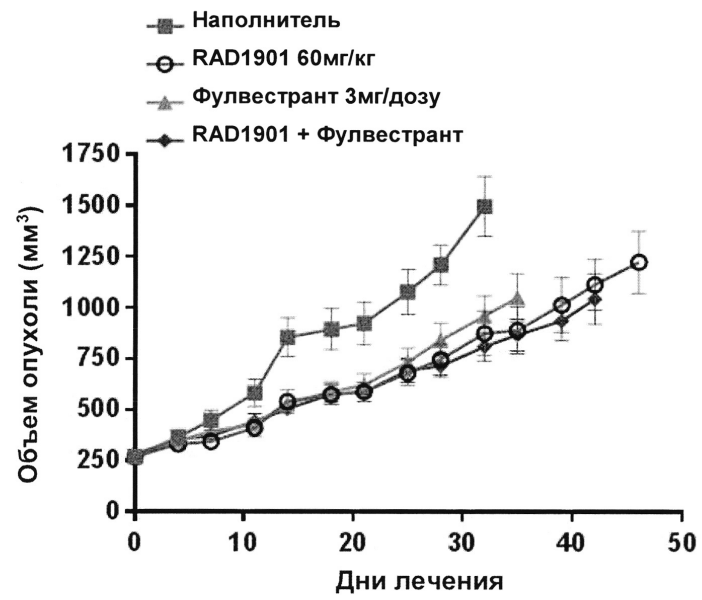
Фиг. 4В



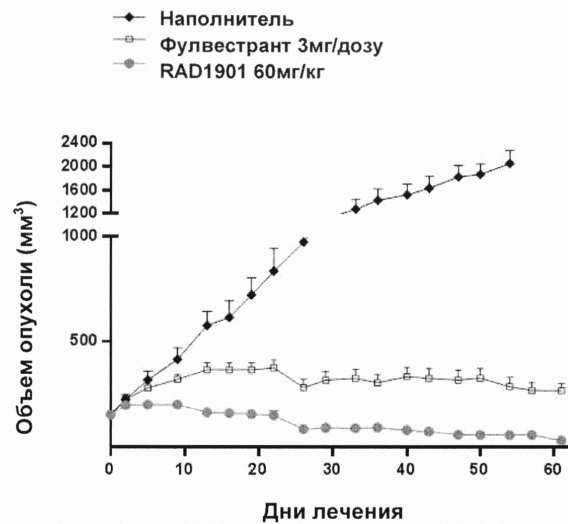
Фиг. 5



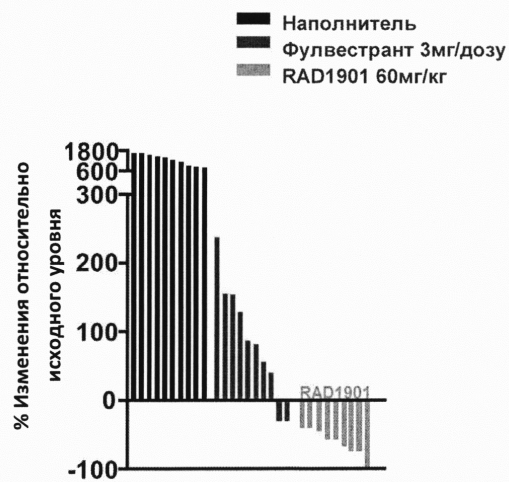
Фиг. 6



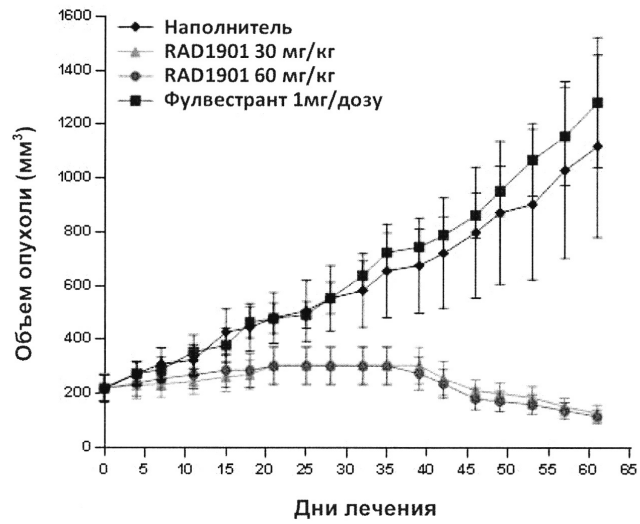
Фиг. 7А



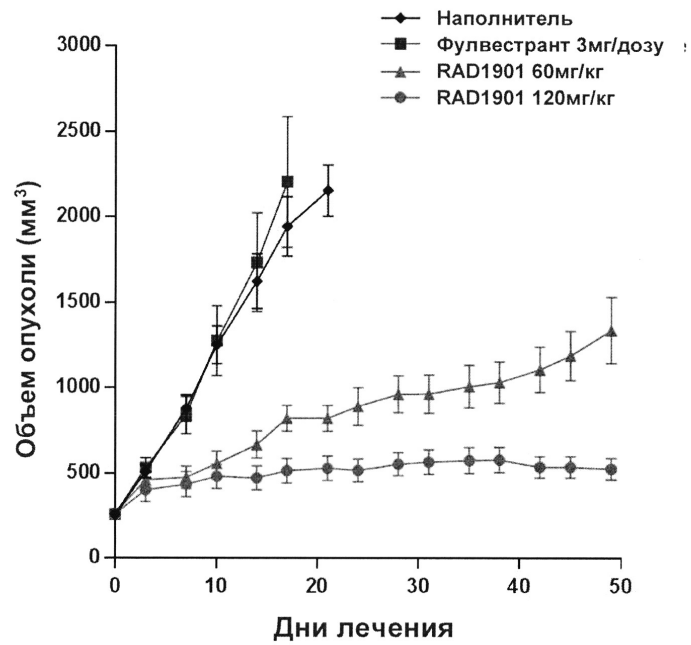
Фиг. 7В



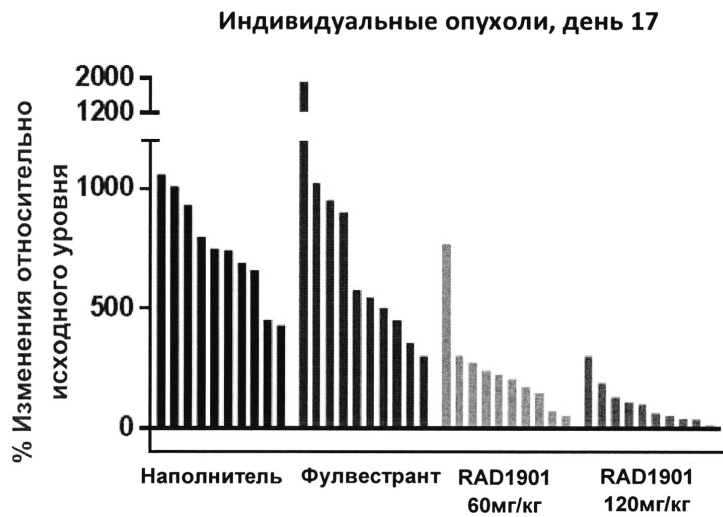
Фиг. 8



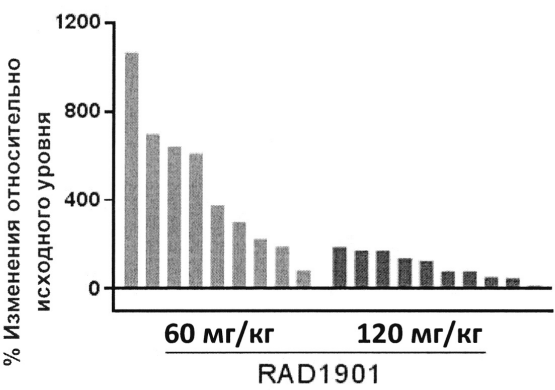
Фиг. 9А



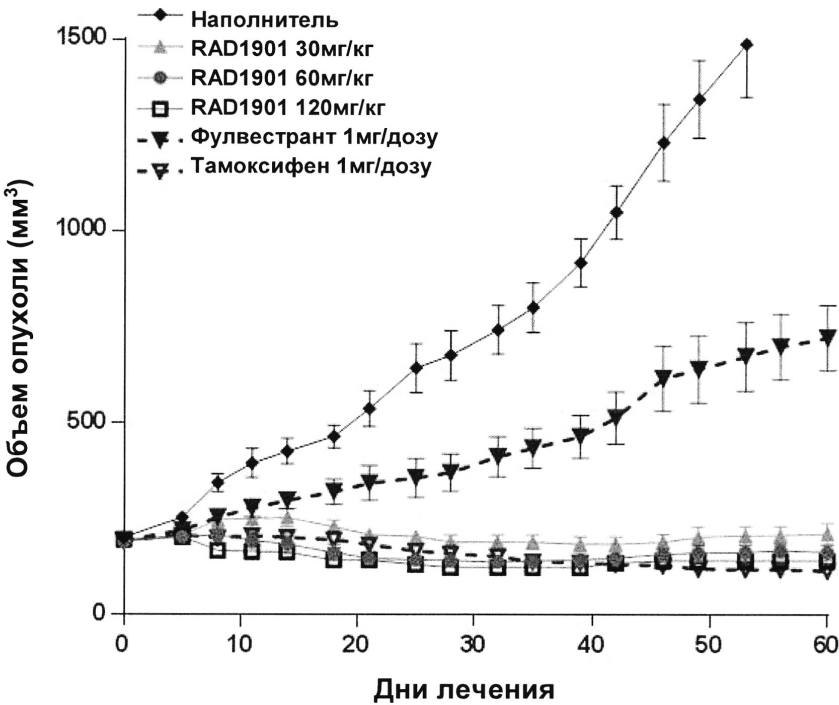
Фиг. 9В



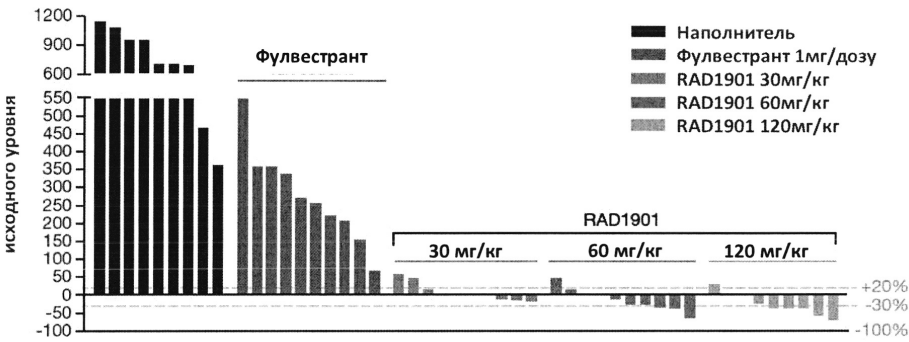
Фиг. 9С



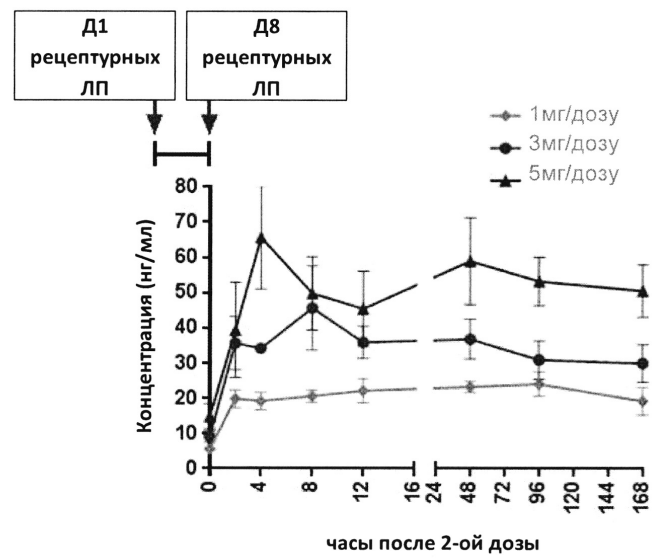
Фиг. 10А



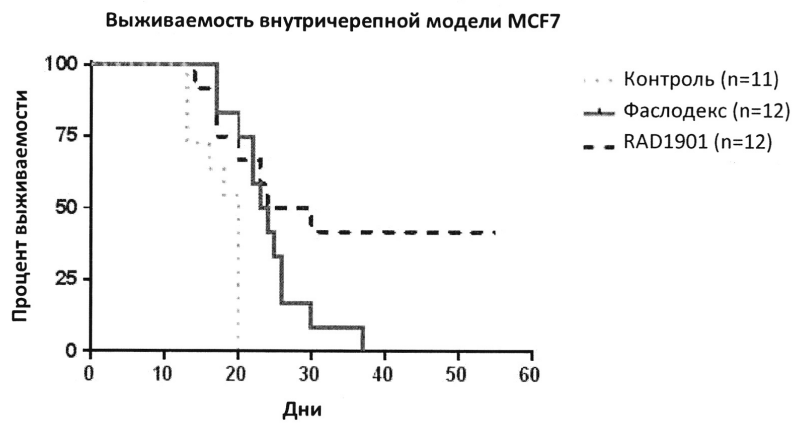
Фиг. 10В



Фиг. 11



Фиг. 12

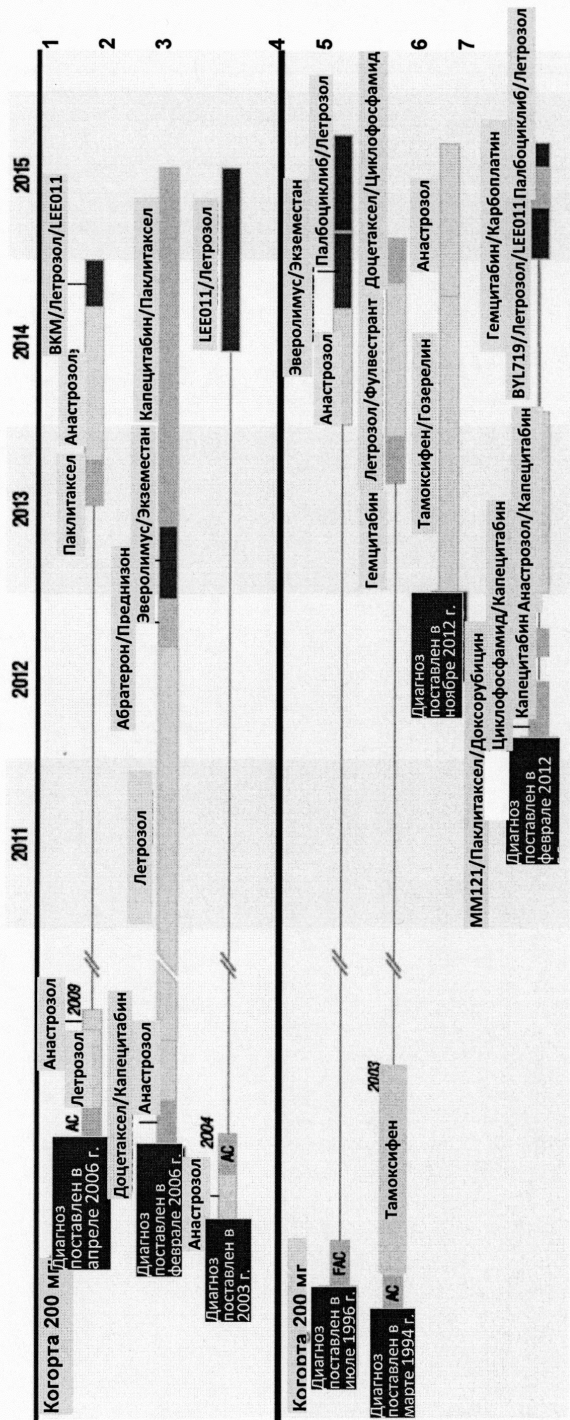


Фиг. 13



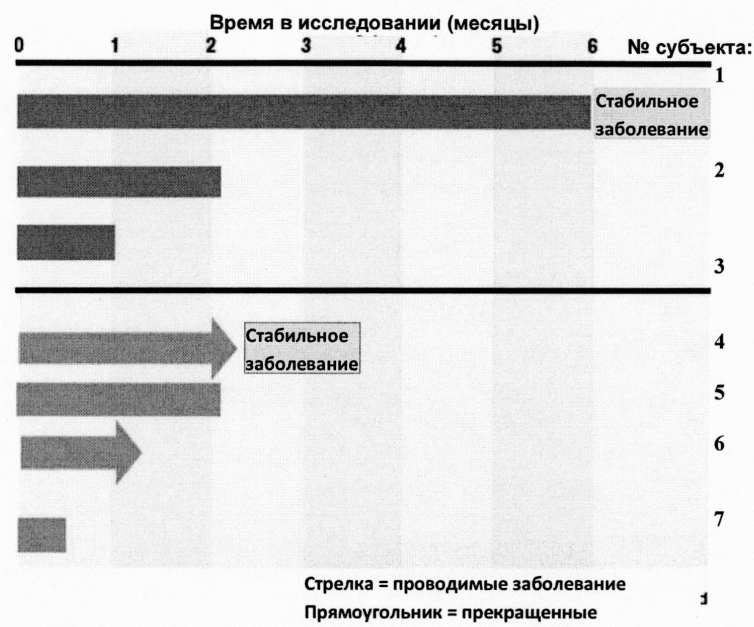
№ субъекта

Фиг. 14А

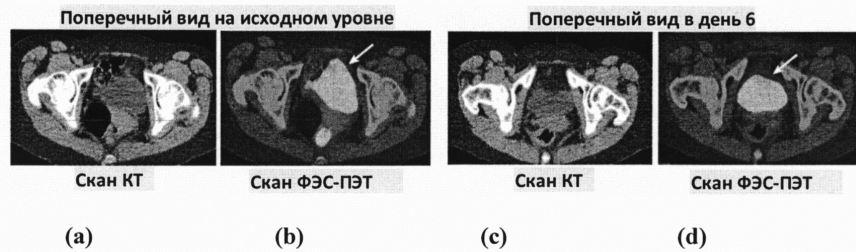


Сокращения: АС, доксорубицин/циклофосфамид; FAC, 5-фторурацил/доксорубицин/циклофосфамид

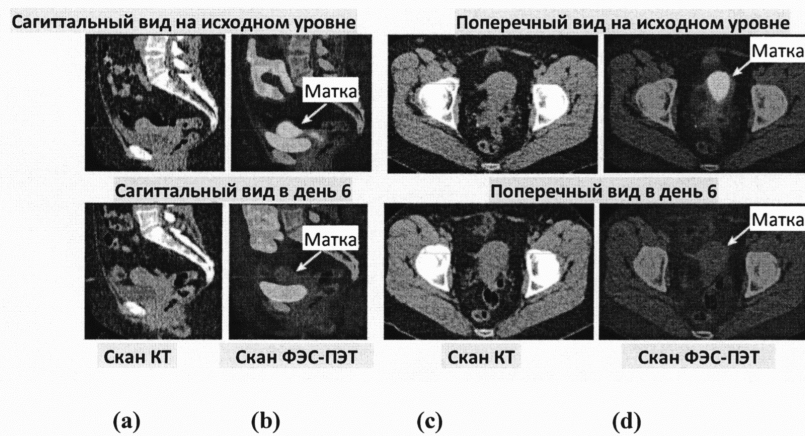
Фиг. 14В



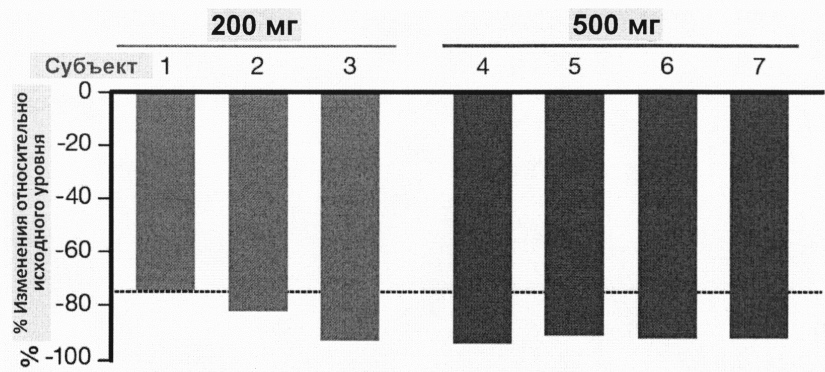
Фиг. 15А



Фиг. 15В



Фиг. 15С



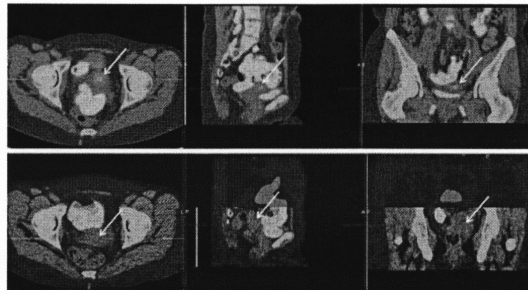
Фиг. 16А

А

Матка

На
исходном
уровне

После
лечения



(a)

(b)

(c)

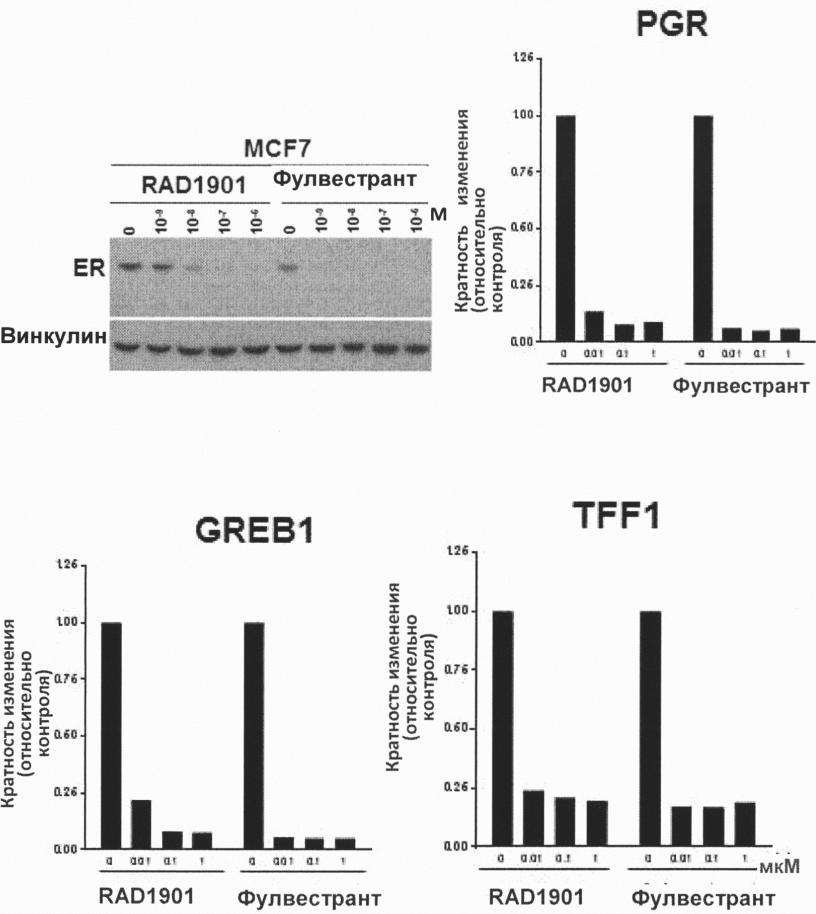
Фиг. 16В

В

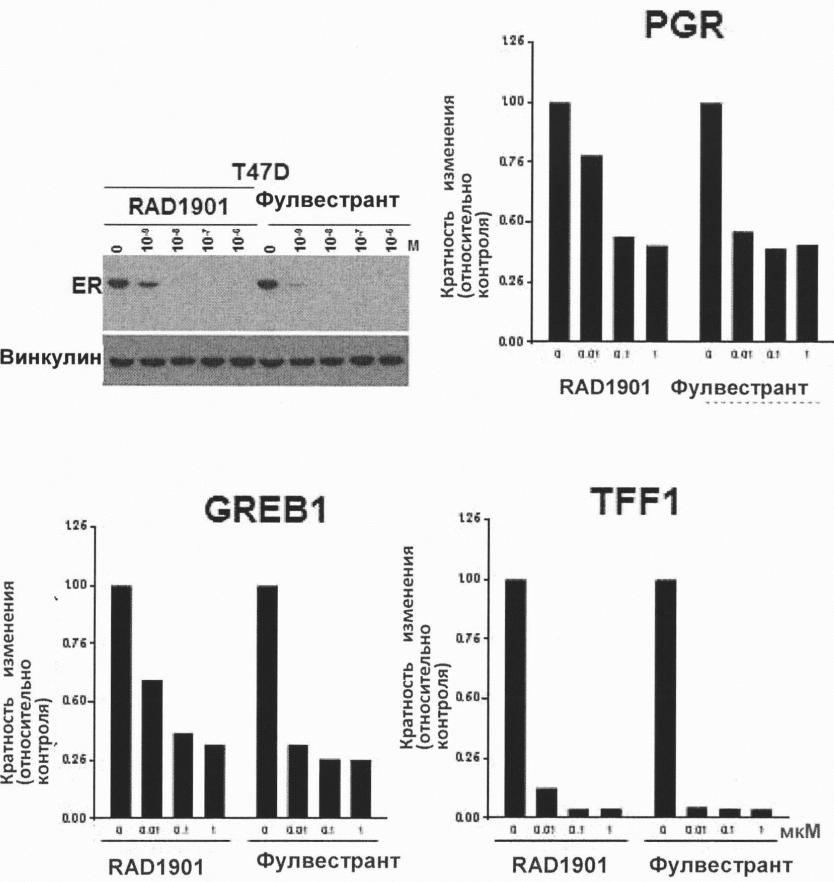
Гипофиз



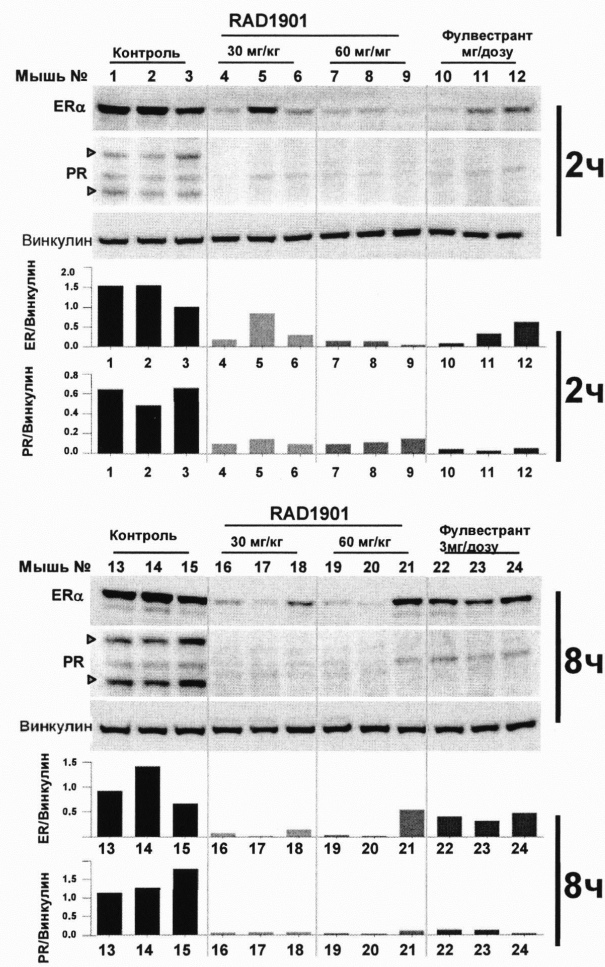
Фиг. 17А



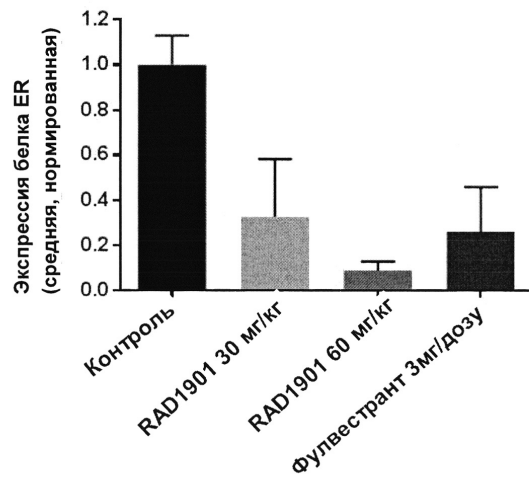
Фиг. 17В



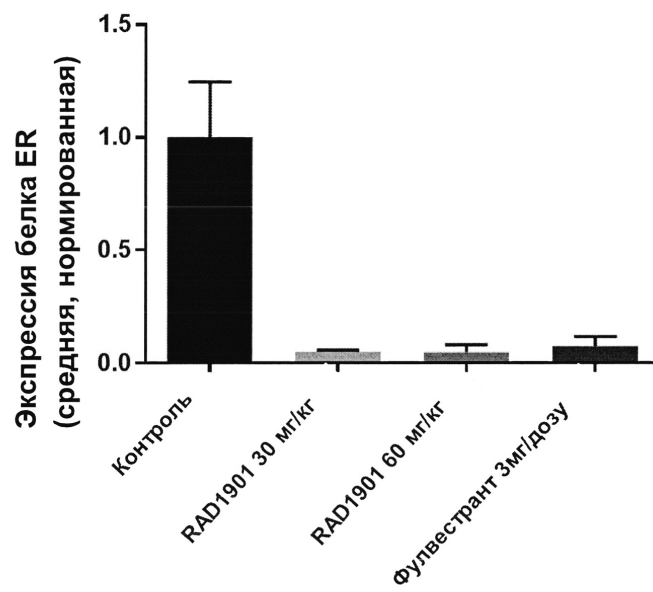
Фиг. 18А



Фиг. 18В



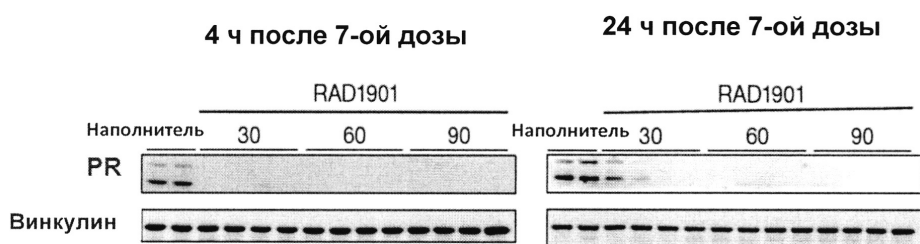
Фиг. 18С



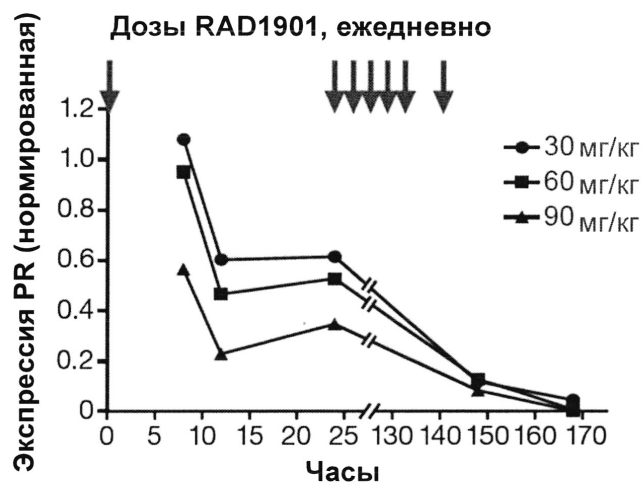
Фиг. 19А



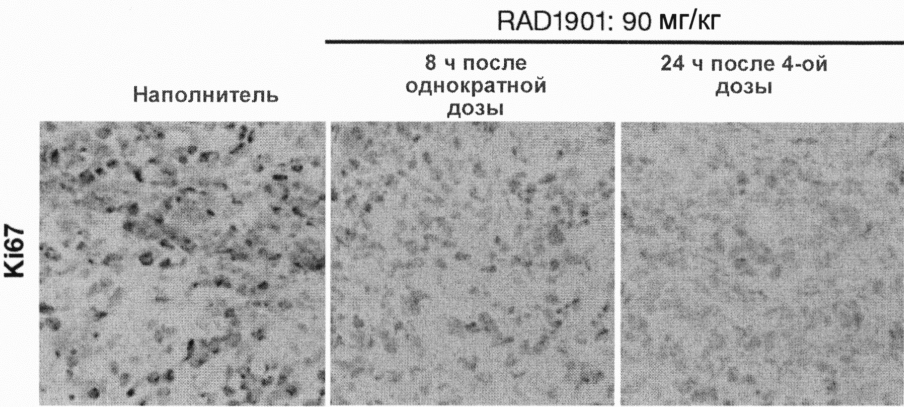
Фиг. 19В



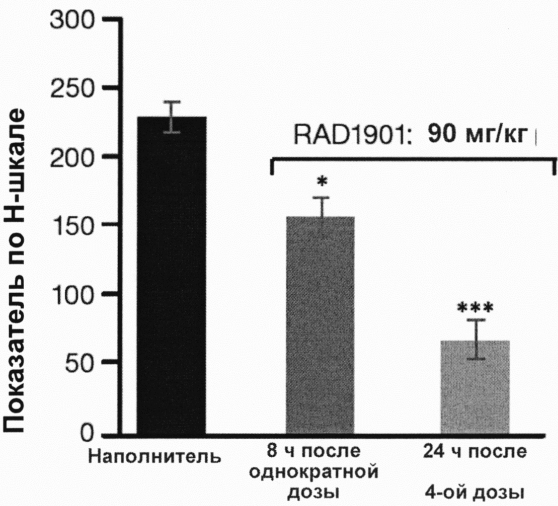
Фиг. 19С



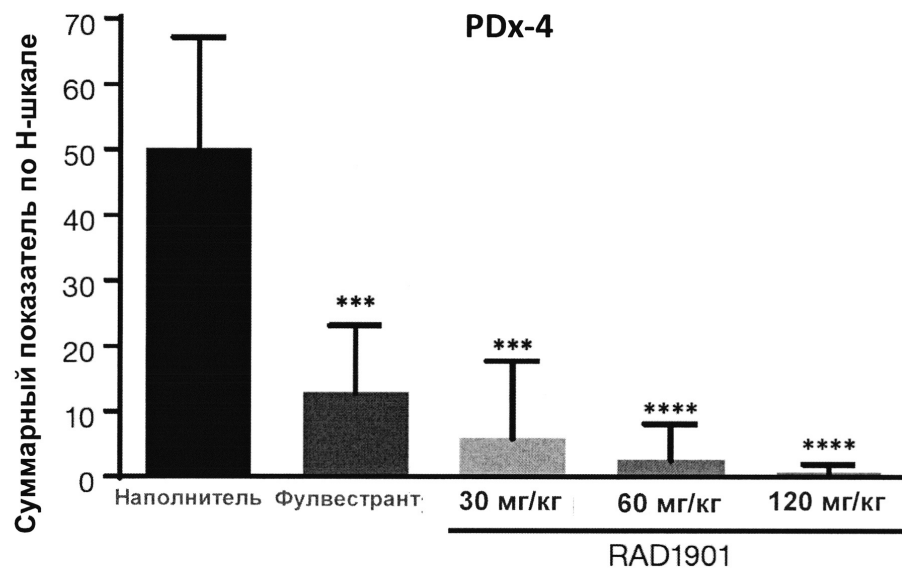
Фиг. 20А



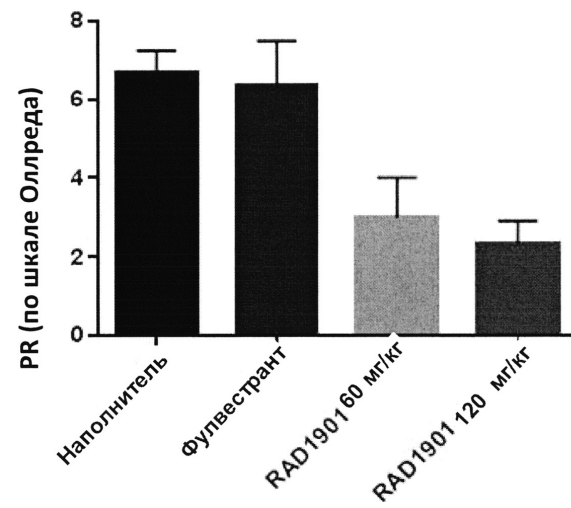
Фиг. 20В



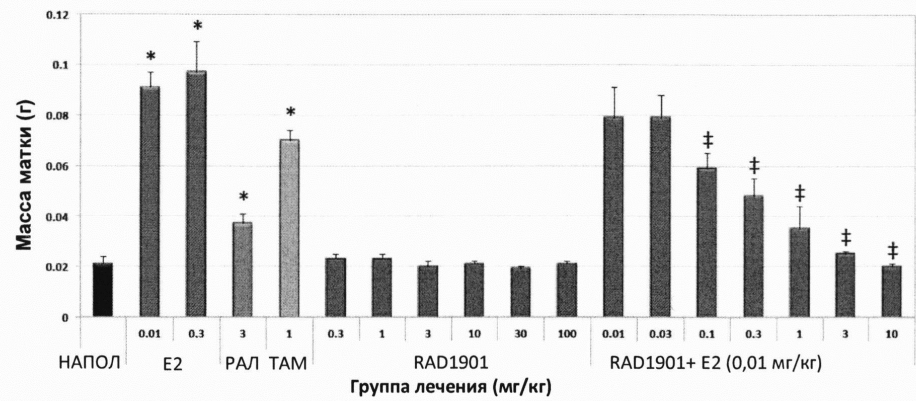
Фиг. 21



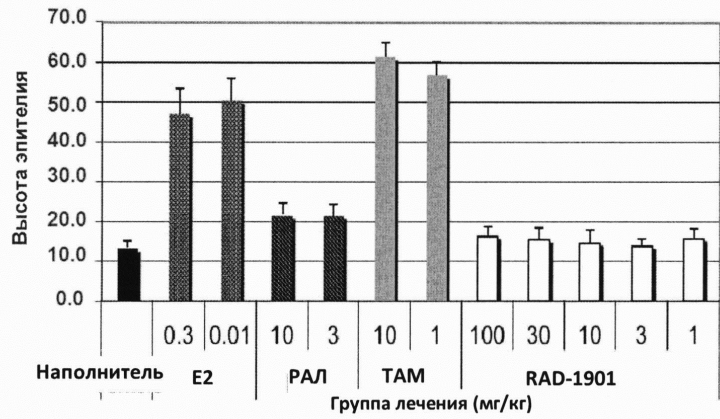
Фиг. 22



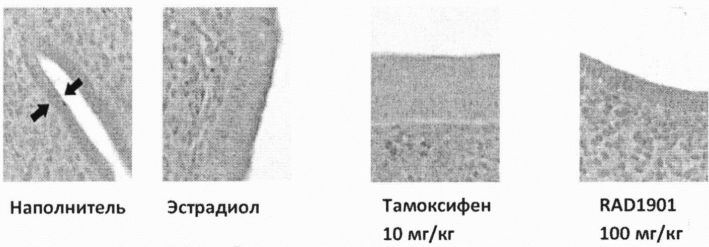
Фиг. 23А



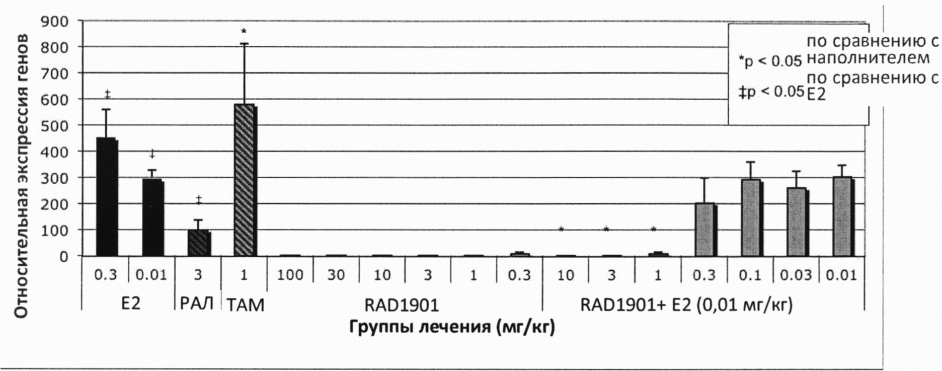
Фиг. 23В



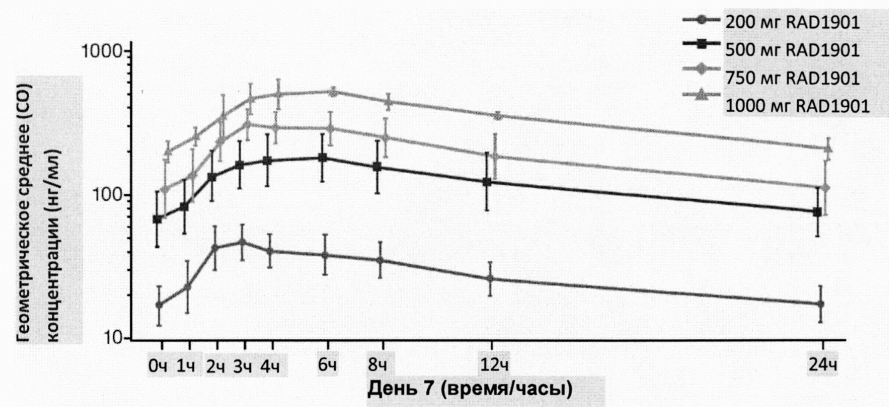
Фиг. 23С



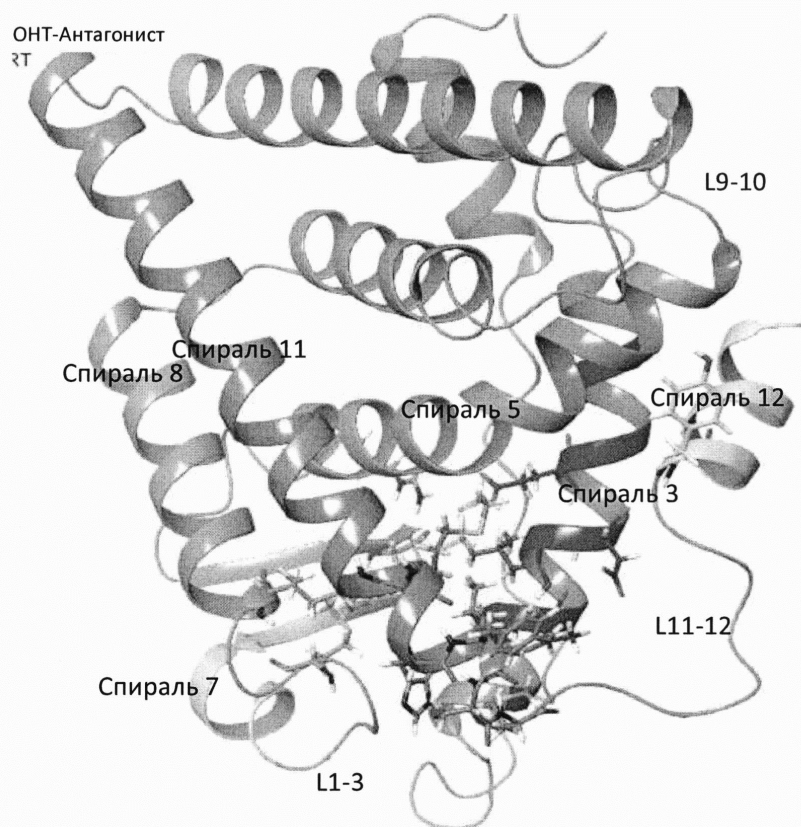
Фиг. 23D



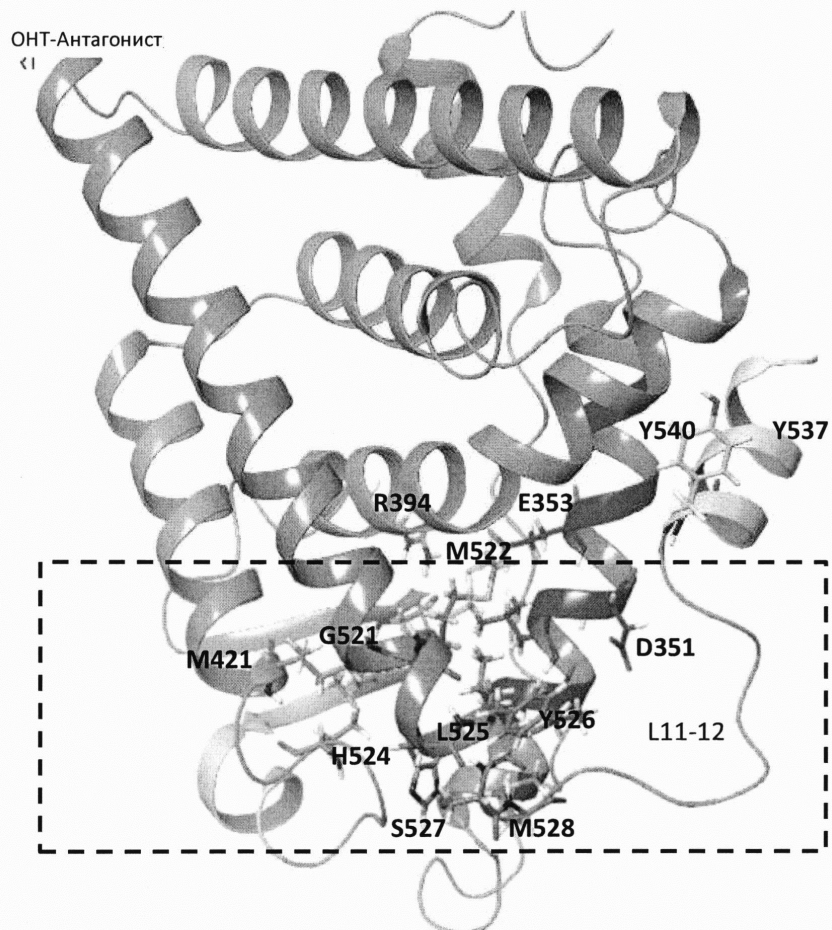
Фиг. 24



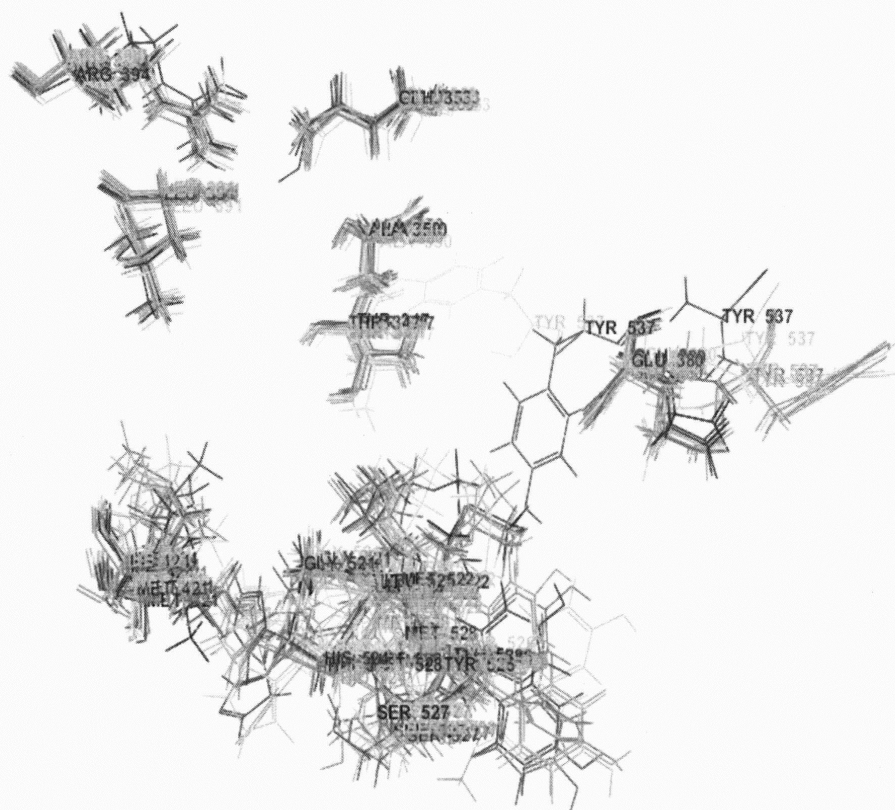
Фиг. 25



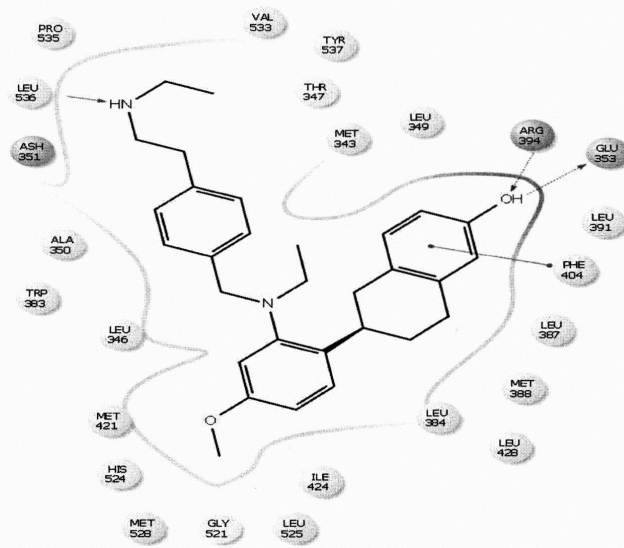
Фиг. 26



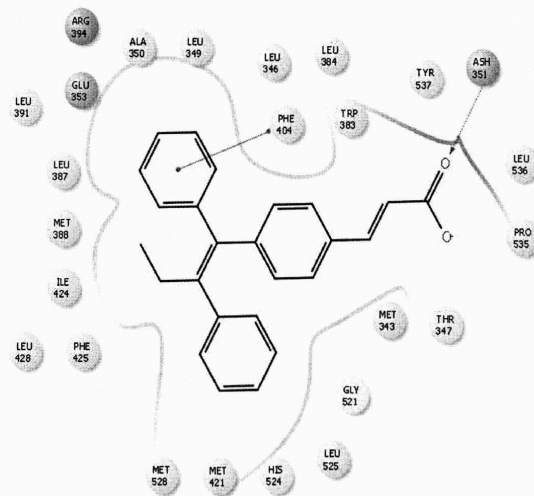
Фиг. 27



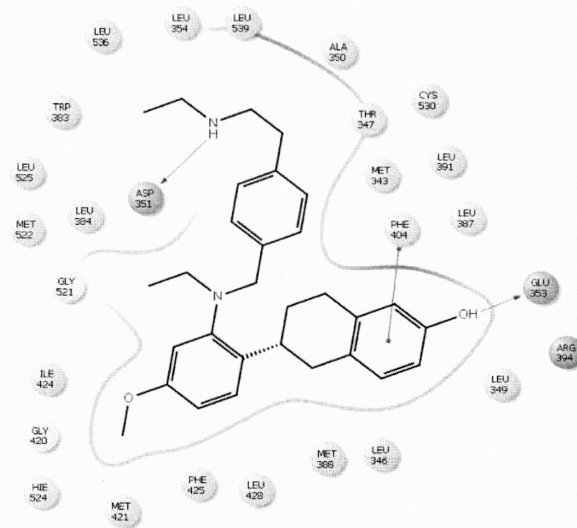
Фиг. 28А



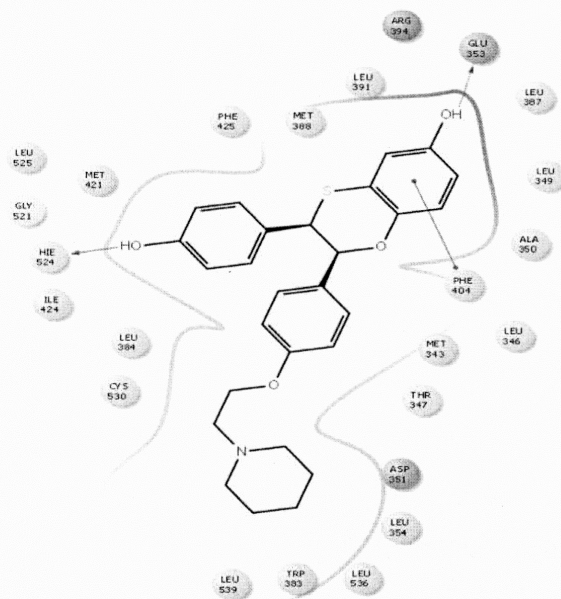
Фиг. 28В



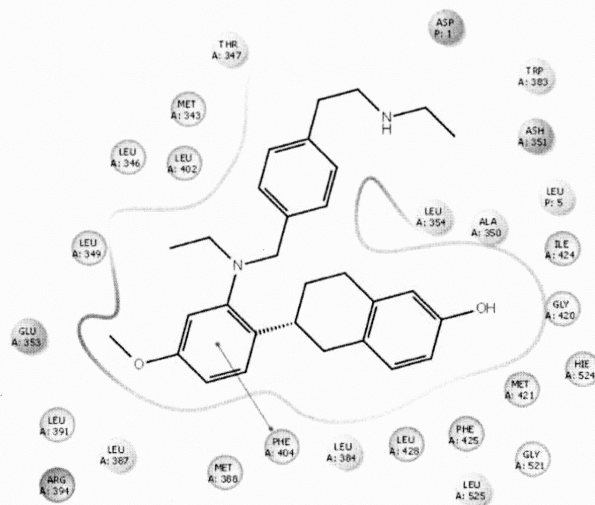
Фиг. 29А



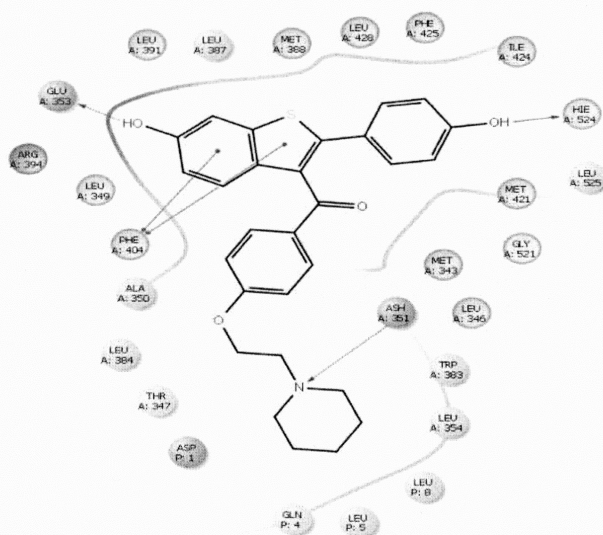
Фиг. 29В



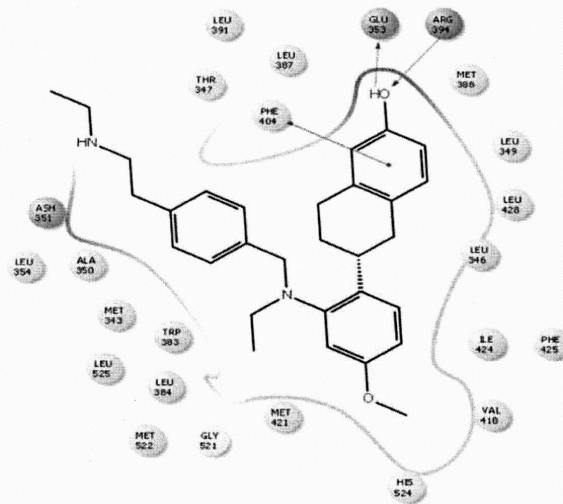
Фиг. 30А



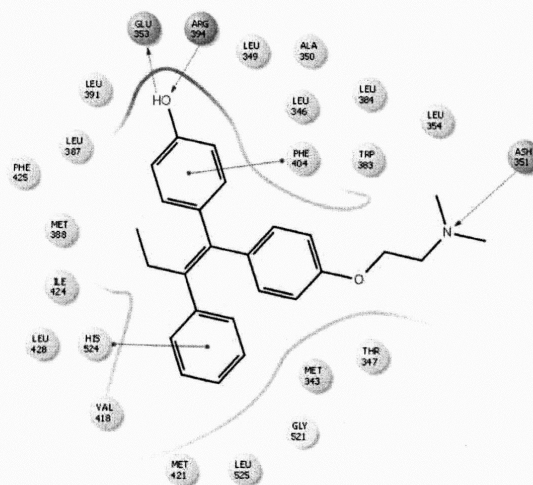
Фиг. 30В



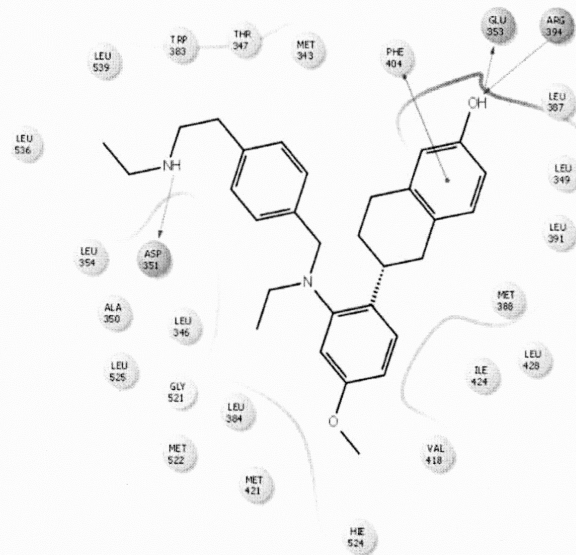
Фиг. 31А



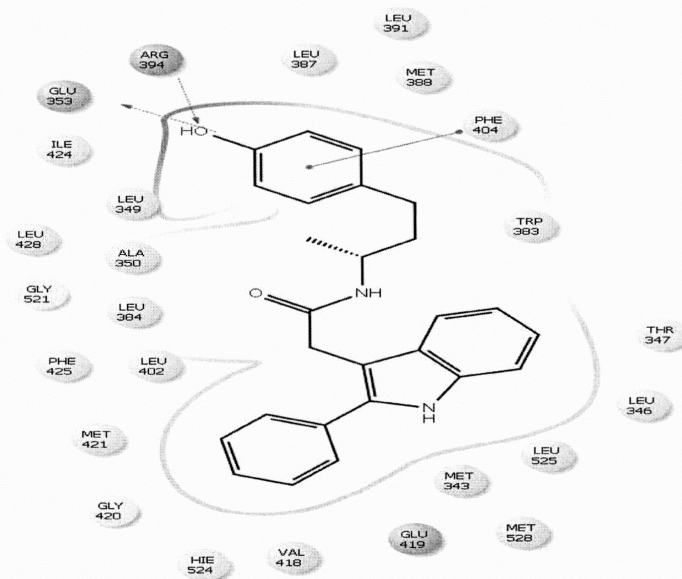
Фиг. 31В



Фиг. 32А

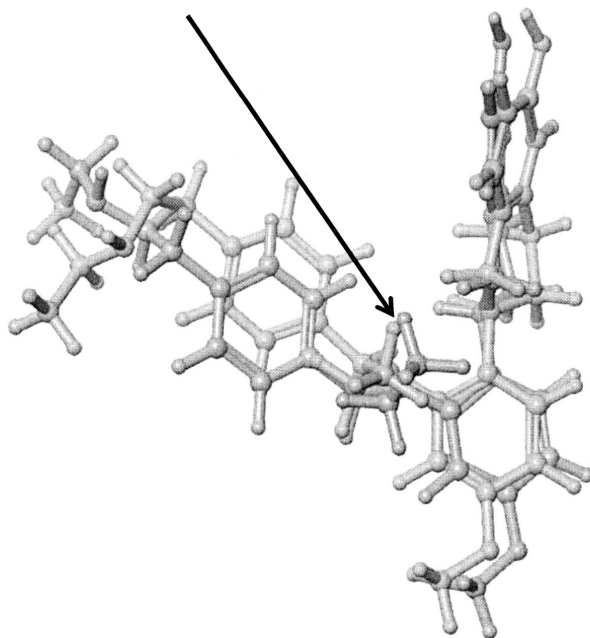


Фиг. 32В



Фиг. 33

N-бензил-*N*-этиланилин на передней стороне



Фиг. 34

Этиламино-этил

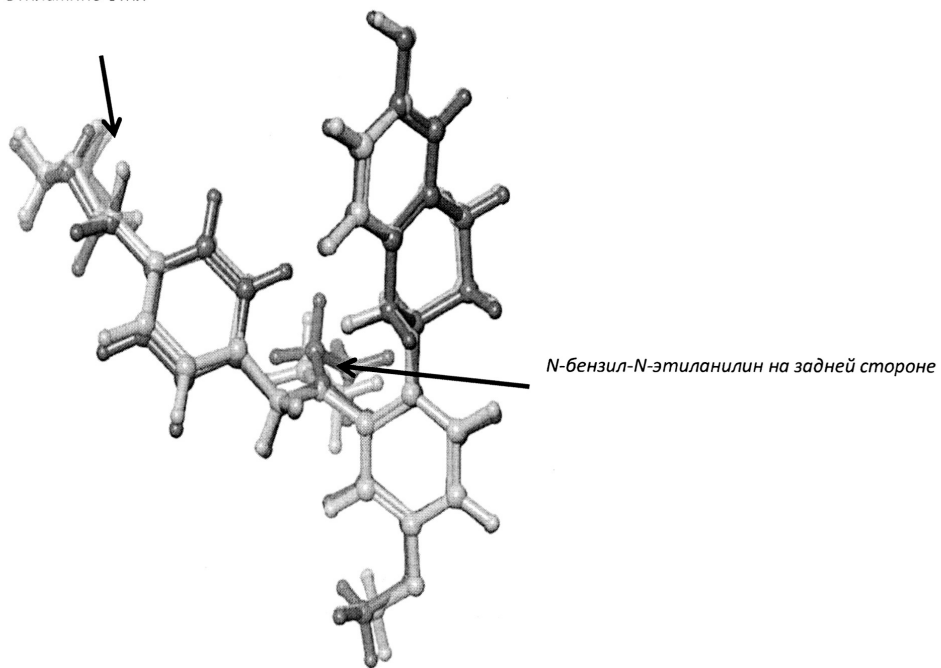
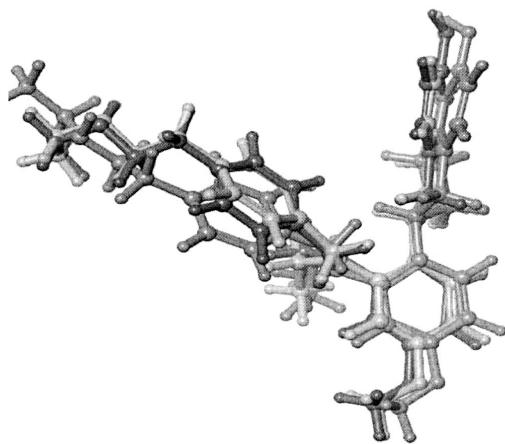
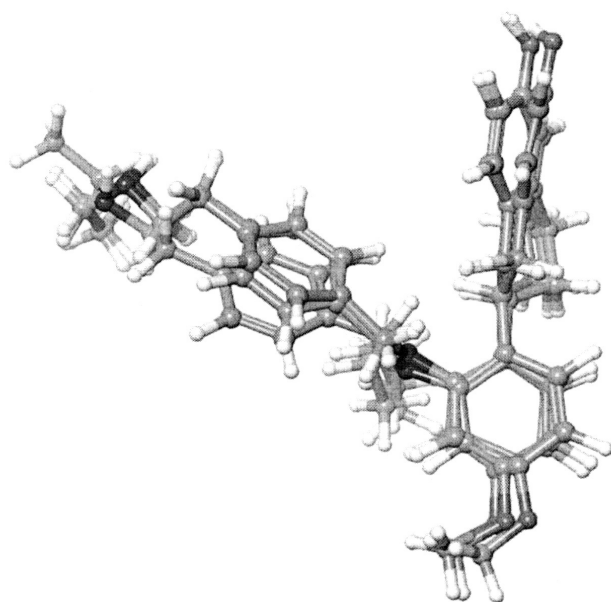


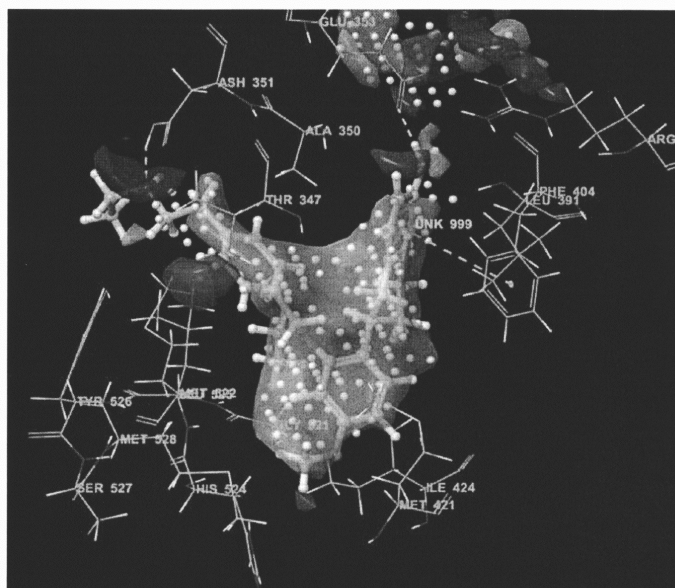
Fig. 35A



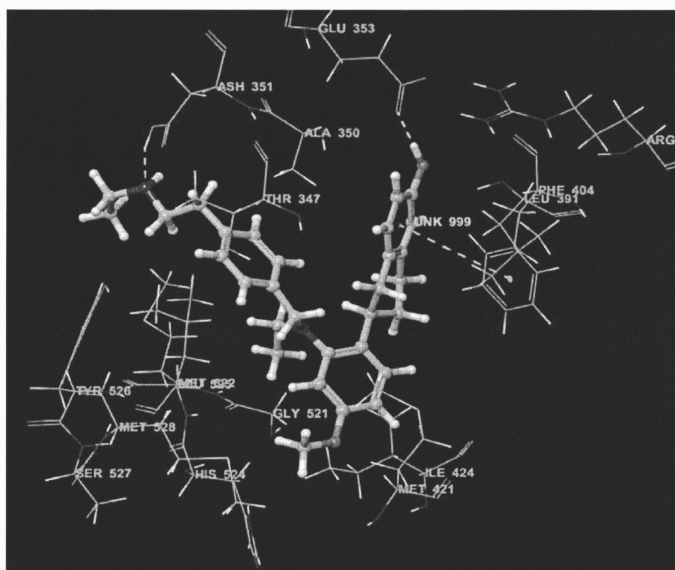
Фиг. 35В



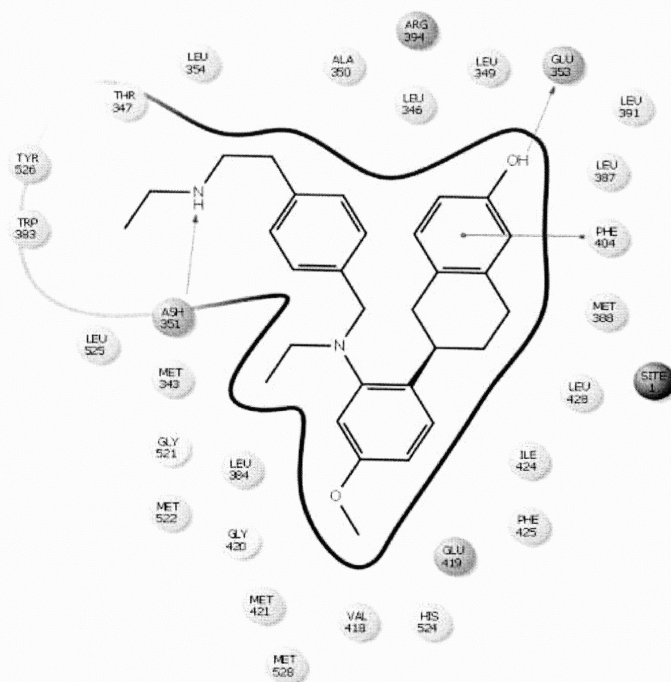
Фиг. 36А



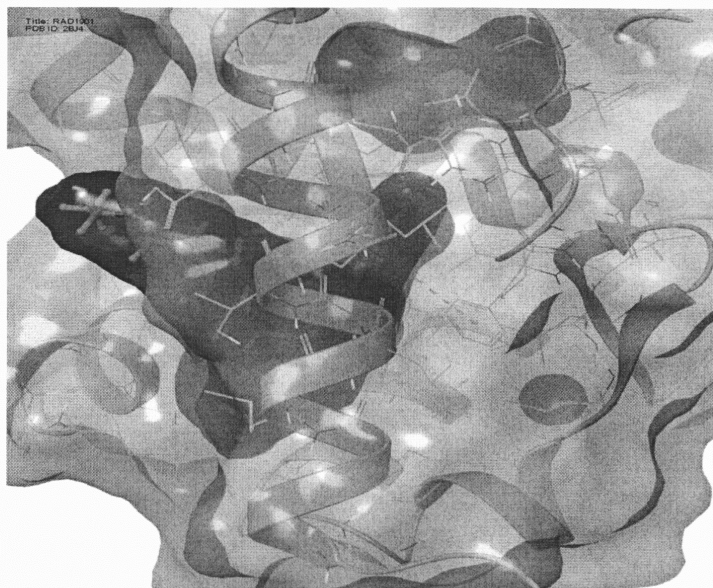
Фиг. 36В



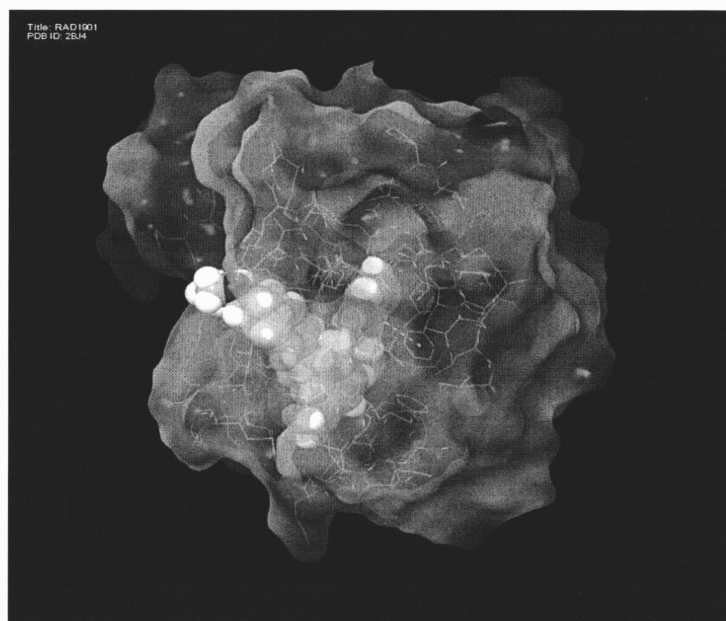
Фиг. 36С



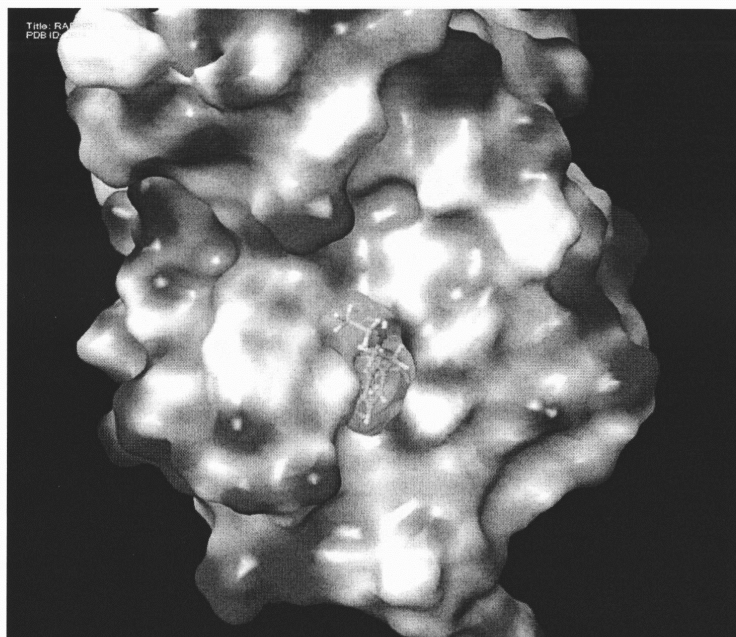
Фиг. 37А

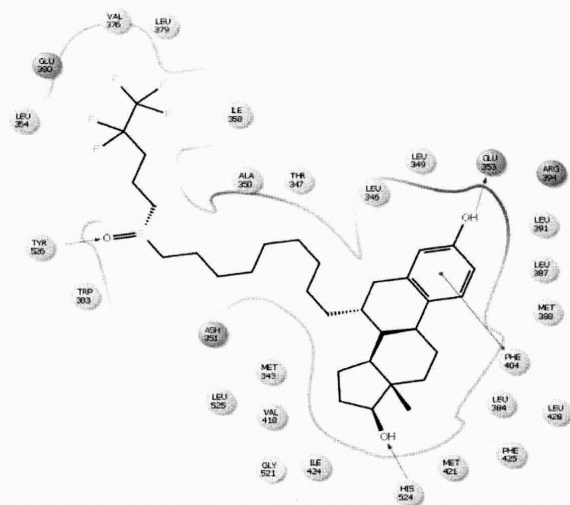


Фиг. 37В

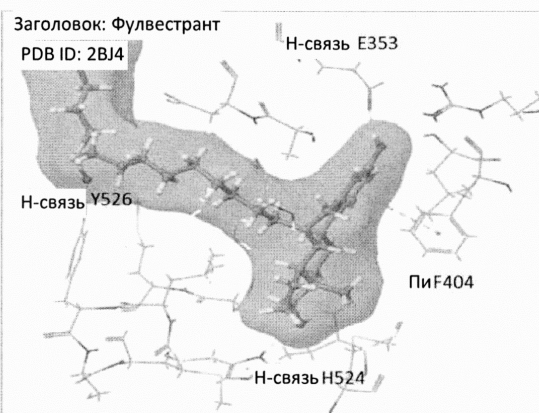


Фиг. 37С

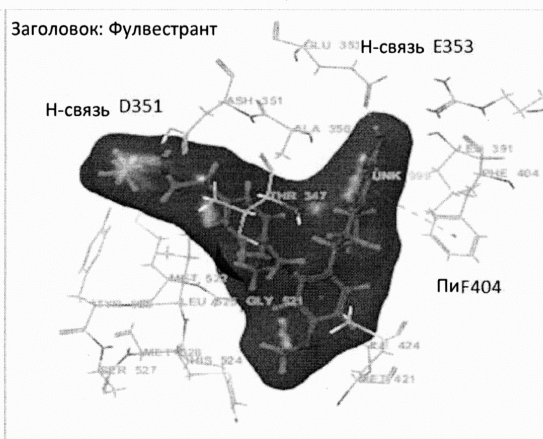




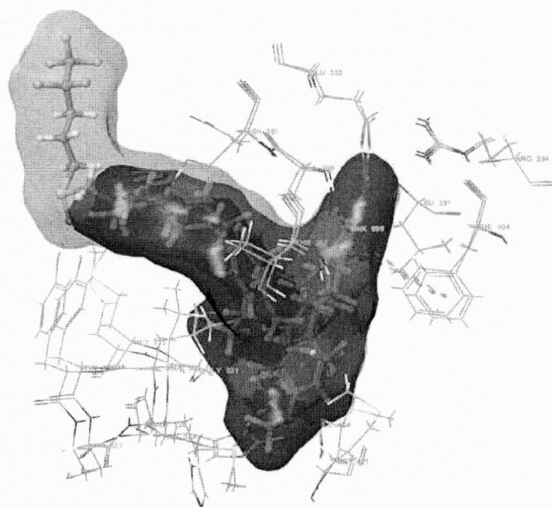
Фиг. 39А



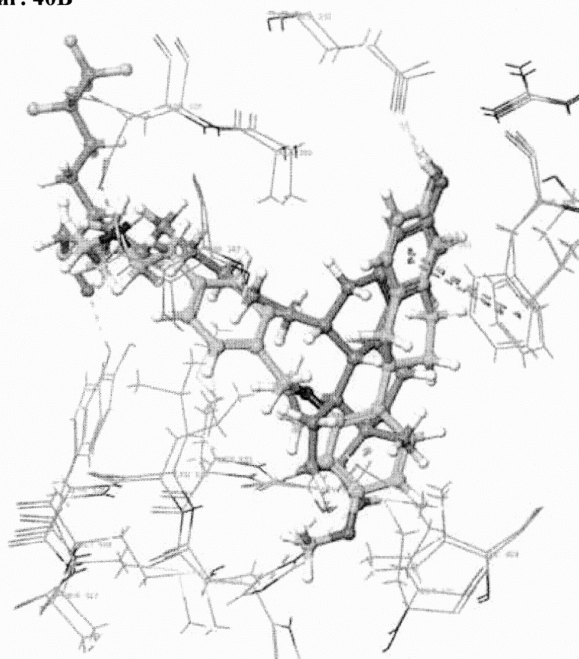
Фиг. 39В



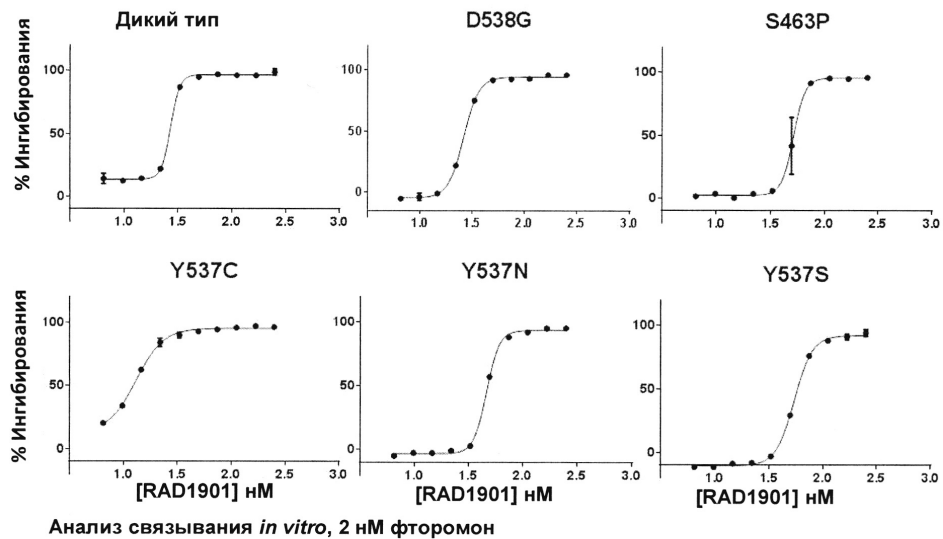
Фиг. 40А



Фиг. 40В



Фиг. 41



Фиг. 42



Таблица 1

Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования 1 фазы RAD1901 для лечения запущенного ER+ рака молочной железы

	200 мг RAD1901 (N=4)	400 мг RAD1901 (N=4)	Всего (N=8)
Средний возраст, лет (диапазон)	63 (55-74)	54 (43-70)	59 (43-74)
Общее состояние по шкале ECOG, n (%)			
0	1(25)	2(50)	3(38)
1	3(75)	2(50)	5(62)

Таблица 2

Связанные с лечением НЯ в исследовании 1 фазы RAD1901 для лечения запущенного ER+ рака молочной железы

	200 мг			400 мг			Всего		
	N=4			N=4			N=8		
Предпочтительный термин	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 1	Степень 2	Степень 3
Диспепсия	1	1	0	2	1	0	3	2	0
Тошнота	1	0	0	2	0	0	3	0	0
Анемия	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Головная боль	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Боль в области живота	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Астения	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Констипация	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Акнеформный дерматит	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Диарея	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Головокружение	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Удлинение интервала QT на электрокардиограмме	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Отрыжка	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Патологическая усталость	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Метеоризм	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Прилив	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Гипокалиемия	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Спазм пищевода	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Боль в конечности	1	0	0	0	0	0	1	0	0

Таблица 3

Уровень RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге мышей, которым имплантировали клетки MCF7, после лечения в течение 40 дней

	Доза (мг/кг)	Плазма (нг/мл)	Опухоль (нг/мл)	Головной мозг (нг/мл)	Соотношение ГМ/П	Соотношение О/П
Наполнитель		НПКО*	НПКО	НПКО	-	-
RAD1901	0,3	2	11	НПКО	-	
RAD1901	1	3	45	НПКО	-	
RAD1901	3	9	169	7	0,78	18,78
RAD1901	10	39	757	14	0,36	19,41
RAD1901	30	137	3875	72	0,53	28,28
RAD1901	60	334	11117	201	0,60	33,28

* НПКО: ниже предела количественного определения

Таблица 4

СУН для матки, мышц и костей для субъекта-человека, получавшего лечение дозой 200 мг п.о. один раз/день в течение шести дней

Доза	СУН, матка, % изменения	СУН, кости, % изменения	СУН, мышцы, % изменения
200 мг	-85%	16%	0%

Таблица 5

СУН для матки, мышц и костей для субъектов-людей (n=4), получавших лечение дозой 500 мг п.о. один раз/день в течение шести дней.

№ субъекта	Скан	СУН, матка, среднее значение	СУН, матка, изменение (%)	СУН, мышцы, среднее значение	СУН, мышцы, изменение (%)	СУН, кости, среднее значение	СУН, кости, изменение (%)
1	Исходный уровень	3,88		0,33		0,36	
	День 6	0,58	-85	0,31	-6	0,48	33
2	Исходный уровень	6,47		0,25		0,49	
	День 6	0,33	-86	0,42	68	0,55	12
3	Исходный уровень	3,66		0,50		0,41	
	День 6	0,58	-84	0,31	-38	0,47	-23
4	Исходный уровень	3,35		0,30		0,40	
	День 6	0,41	-88	0,24	-20	0,52	30
Среднее значение			-86		1		13

Таблица 6

Эффект RAD1901 в отношении МПК на крысах после овариоэктомии.^a

Лечение	МПК бедренной кости (% изменения)	МПК поясничного отдела (% изменения)
Симуляция	3,1 ± 2,4*	2,7 ± 5,0*
OVX+наполн.	-5,4 ± 5,1	-10,2 ± 12,8
OVX+E2	-0,5 ± 2,6*	-2,1 ± 12,2*
OVX+RAD1901	0,4 ± 2,8*	-1,1 ± 7,9*

^aВзрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство – овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу лечения). МПК измеряли посредством двухфазной рентгеновской абсорбциометрии на исходном уровне и после 4 недель лечения. Данные выражены в виде среднего значения ± СО (стандартное отклонение). *P < 0,05 по сравнению с соответствующим OVX (овариоэктомия) + Контроль наполн. МПК, минеральная плотность костей; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; Наполн, наполнитель.

Таблица 7

Эффект RAD1901 в отношении микроархитектуры бедренной кости на крысах после овариоэктомии^a

Лечение	ОК/О О (%)	ПлотнСое д (1/мм ³)	ЧТ (1/мм)	ТТ (мм)	РМТ (мм)	КПК (мг гидроксипатита/см ³)
Симуляция	0,394 ± 0,069*	138 ± 21*	5,2 ± 0,6*	0,095 ± 0,008 *	0,175 ± 0,029 *	456 ± 61*
OVX+Наполн.	0,234 ± 0,065	91 ± 32	3,5 ± 0,9	0,085 ± 0,011	0,307 ± 0,086	301 ± 69
OVX+E2	0,309 ± 0,079*	125 ± 25*	4,8 ± 0,8*	0,086 ± 0,008	0,204 ± 0,054 *	379 ± 75*
OVX+RAD1901	0,300 ± 0,066*	113 ± 22*	4,5 ± 0,8*	0,088 ± 0,008	0,218 ± 0,057 *	370 ± 66*

^aВзрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство – овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу лечения). Через 4 недели микроархитектуру кости оценивали с применением компьютерной микротомографии. Данные выражены в виде среднего значения ± СО. *P < 0,05 по сравнению с соответствующим OVX+Контроль наполн. КПК, кажущаяся плотность костей; ОК/ОО, плотность объема костей; ПлотнСоед, плотность соединительной ткани; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; ЧТ, число трабекул; ТТ, толщина трабекул; РМТ, расстояние между трабекулами; Наполн, наполнитель

Таблица 8

**Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования
фазы 1 с увеличением дозы RAD1901**

	Плацебо (N=8)	200 мг RAD1901 (N=15)	500 мг RAD1901 (N=14)	750 мг RAD1901 (N=8)	1000 мг RAD1901 (N=7)
Белая раса (% от когорты)	8(100)	14(93)	10(71)	8(100)	7(100)
Средний возраст, лет	64	62	59	64	64
Среднее значение ИМТ, кг/м²	26,1	25	24,4	24,9	26,7

Таблица 9

Наиболее частые (>10%) связанные с лечением НЯ (нежелательные явления) в исследовании фазы 1 с увеличением дозы RAD1901

	Плацебо N=8 n(%)			200 мг N=15 n(%)			500 мг N=14 n(%)			750 мг N=8 n(%)			1000 мг N=7 n(%)			Всего активных N=44 n(%)			Вс е о Н Я П Н Л N- 44
	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	Ст еп ен ь 1	Ст еп ен ь 2	Ст еп ен ь 3	В се
Тош нота	2(25)	0	0	5(33)	0	0	3(21)	2(14)	0	2(25)	1(13)	0	4(57)	2(29)	0	14 (3 2)	5(11)	0	19 (4 3)
Дисп епси я	1(13)	0	0	3(20)	0	0	5(36)	2(14)	0	4(50)	0	0	1(14)	1(14)	0	13 (3 0)	3(7)	0	16 (3 6)
Рвота	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	5(36)	1(7)	0	2(25)	0	0	3(43)	0	3(7)	10 (2 3)	1(2)	14 (3 2)
Прил ив	1(13)	0	0	2(13)	0	0	6(43)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	0	0	11 (2 5)	0	0	11 (2 5)
Боль в облас ти живо та	1(13)	0	0	2(13)	2(13)	0	3(21)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	1(14)	0	7(16)	3(7)	0	10 (2 3)
Боль в пище воде	0	0	0	0	2(13)	0	1(7)	3(21)	0	1(13)	0	0	1(14)	1(14)	1(14)	3(7)	6(14)	1(2)	10 (2 3)
Голо вная боль	0	0	0	3(20)	0	0	1(7)	1(7)	0	3(38)	0	0	2(29)	0	0	9(20)	1(2)	0	10 (2 3)
Икот а	0	0	0	1(7)	0	0	4(29)	0	0	2(25)	0	0	2(29)	0	0	9(20)	0	0	9(20)
Гипе рсекре ция слюны	0	0	0	2(13)	0	0	2(14)	0	0	2(25)	0	0	2(29)	0	0	8(18)	0	0	8(18)
Диар ея	1(13)	0	0	0	0	0	3(21)	0	0	0	0	0	3(43)	1(14)	0	6(14)	1(2)	0	7(16)
Дисф агия	0	0	0	0	0	0	1(7)	2(14)	0	3(38)	1(13)	0	0	0	0	4(9)	3(7)	0	7(16)
Ощу щени	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	0	0	0	0	0	4(57)	0	0	7(16)	0	0	7(16)

61 / 69

е чуже родн ого тела				)									)			)			)
Взду тие живо та	0	0	0	1(7)	1(7)	0	1(7)	0	0	1(13)	0	0	2(29)	0	0	5(11)	1(2)	0	6(14)
Один офаг ия	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	1(7)	0	0	0	0	1(14)	1(14)	0	4(9)	2(5)	0	6(14)
Голо вокр ужен ие	2(25)	0	0	1(7)	0	0	2(14)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	0	0	5(11)	0	0	5(11)
Непр иятн ые ощу щени я в живо те	0	0	0	3(20)	0	0	0	0	0	1(13)	1(13)	0	0	0	0	4(9)	1(2)	0	5(11)
Мете ориз м	0	0	0	2(13)	0	0	2(14)	0	0	1(13)	0	0	0	0	0	5(11)	0	0	5(11)
Боль в мыш цах	1(13)	0	0	2(13)	1(7)	0	0	1(7)	0	1(13)	0	0	0	0	0	3(7)	2(5)	0	5(11)

Таблица 10

**Фармакокинетические параметры в исследовании фазы 1 с увеличением дозы
RAD1901 (день 7)**

Параметр	Статистические данные	200 мг N=15	500 мг N=11	750 мг N=6	1000 мг N=3
C_{max} (нг/мл)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	49,8 30,6, 85,5	197 105, 316	322 248, 420	540 481, 602
t_{max} (ч)	Медиана, минимум, максимум	3,00 2,00, 6,00	4,00 2,00 – 6,02	3,00 3,00, 4,00	4,00 3,00, 6,00
$AUC_{0-\tau}$ (ч*нг/мл)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	670 418, 1181	2927 1562, 5460	4614 3209, 7183	8292 7281, 8947
$t_{1/2}$ (ч)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	38,3 27,7, 51,4	37,5 33,8, 41,3	38,4 34,6, 46,4	42,3 38,7, 49,4

Таблица 11

Частота мутаций ЛСД

	Частота (%)
D538G	29,5
Y537S	25,0
Y537N	13,6
Y537C	9,1
E380Q	6,8
S463P	4,5
L536R	2,3
L536Q	2,3
P535H	2,3
V392I	2,3
V534E	2,3

Таблица 12

Различия комплексов ЛСД ER- α – антагонист в положениях остатков по сравнению с 3ERT

№ основани я/PDB	L1- 3/Спира ль 8		Спираль 11								Спир аль 5	Спирал ь 12	
	M4 21	I4 24	E5 21	M5 22		M4 21	I4 24	E5 21	M5 22			M4 21	I4 24
2BJ4	x	x		x	2BJ 4	x	x		x	2BJ4		x	
2JFA	x	x		x	2JF A	x	x		x	2JFA		x	
1SJ0	x	x	x	x	1SJ 0	x	x	x	x	1SJ0		x	x
2JF9		x		x	2JF 9		x		x	2JF9			
1YIM	x	x		x	1YI M	x	x		x	1YIM		x	x
1R5K	x	x		x	1R5 K	x	x		x	1R5K		x	x
1UMO	x	x		x	1U MO	x	x		x	1UM O		x	x
1ERR	x	x			1ER R	x	x			1ERR		x	x
2IOK	x	x			2IO K	x	x			2IOK		x	x
3UUC	x	x			3U UC	x	x			3UUC		x	x
1YIN	x	x	x	X	1YI N	x	x	x	X	1YIN		x	x
2AYR	x			X	2A YR	x			X	2AYR		x	
2OUZ	x	x			2O UZ	x	x			2OUZ		x	x

Таблица 13

Оценка наложения структур комплексов ЛСД ER-α – антагонист посредством расчетов СКО:

	3ERT	2BJ4	2JFA	1SJ0	2JF9	1Y1M	1R5K	1UOM	1ERR	2IOK	3UUC	1Y1N	2AYR
RMSD													
3ERT													
2BJ4	0,804												
2JFA	1,196	0,554											
1SJ0	0,786	0,637	1,115										
2JF9	1,177	0,411	0,415	1,186									
1Y1M	0,978	0,687	1,118	0,276	1,072								
1R5K	1,483	0,759	0,52	1,307	0,892	1,342							
1UOM	0,739	0,761	0,723	0,489	0,909	0,499	1,115						
1ERR	1,12	0,483	0,595	1,016	0,851	1,112	1,208	0,918					
2IOK	0,824	0,689	0,787	0,899	0,897	0,854	1,208	0,736	0,838				
3UUC	1,024	0,915	0,896	1,03	0,888	1,036	1,228	1,012	0,873	0,929			
1Y1N	0,749	0,683	1,105	0,432	1,061	0,318	1,293	0,557	1,076	0,744	1,015		
2AYR	0,659	0,682	0,95	0,792	1,124	0,777	1,391	0,491	1,118	0,071	1,031	0,581	

Таблица 14

Анализ связывания лиганда в комплексах ЛСД ER- α – антагонист

	Лиганд: связывание с	EC ₅₀ (мкМ)	Примечания
3ERT	ОНТ: E353, R394	0,010	Зеркально отраженный амин, F404 был расположен слишком далеко от фенола, вследствие чего пи-взаимодействия отсутствовали
2BJ4	ОНТ: E353, R394, пи F404	0,010	
2JF9	ОНТ: E353, D351, H524, пи F404	0,010	
2JFA	RAL: E353, D351, H524 и пи F404 x2	0,002	
1ERR	RAL: E353, D351, R394 и пи F404 x2	0,002	Фенол, зеркально отраженный в отношении H524
1YIM	CM3: E353, H524, D351 пи F404	0,0015(IC ₅₀)	D351-карбоксил хорошо ориентировался с пирролидином
1YIN	CM3: E353, H524 пи F404	0,001	
1SJ0	E4D: E353, H524, пи F404 x 2	0,0008(IC ₅₀)	
1R5K	GW5: D351 пи F404	0,039(IC ₅₀)	Отсутствие связи якоря с E353
1UOM	PTI: E353, H524 пи F404	НД	
2IOK	IOK: E353 пи F404	0,001	
3UUC	OD1: E353, R394, T347	НД	Крайне небольшое соединение
2OUZ	C3D: E353, пи F404	0,003	
2AYR	L4G: E353, пи F404 x2	0,0107	

Таблица 15

Оценка модели для докинга RAD1901

	EC ₅₀ (мкМ)	EF ₅₀ (=прогностическая сила)	Может ли модель прогнозировать кристаллическую структуру?	Показатель докинга лиганда	Показатель докинга RAD1901
1ERR	0,001		Нет	-11,452	-7,912
3ERT	0,002		Нет	-12,175	-8,151
3UC C	НД	8474	Да	-9,278	НД
2IOK	0,001		Да	-11,952	-10,478
1R5K	0,039	6100	Да	-11,518	-12,102
1SJ0	0,001	7511	Да	-12,507	-9,816
2JFA	0,001	6780	Да	-11,480	-11,055
2BJ4	0,002	5642	Да	-9,727	-11,971
2OU Z	0,003	--	Да	-11,789	-9,611

Таблица 16

Показатель докинга индуцированного соответствия RAD1901 с 1R5K, 2IFA, 2BJ4
и 2OUZ.

Кристаллическая структура ER- α	Показатель докинга ДИС RAD1901
1R5K	-14,1
1SJ0	-13,1
2JFA	-13,9
2BJ4	-13,8
2OUZ	-13,4