

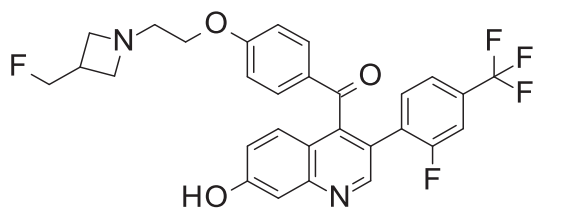
DEGRADADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

ANTECEDENTES

Los degradadores selectivos del receptor de estrógeno (SERD) se unen al receptor de estrógeno (ER) y regulan negativamente la actividad transcripcional mediada por ER. Esta degradación y regulación negativa causada por los SERD puede ser útil en el tratamiento de trastornos de proliferación celular, tales como cáncer. Se han descrito en la bibliografía algunos ejemplos de moléculas pequeñas de SERD (ver, por ejemplo, los documentos WO2005073204, WO2014205136, y WO2016097071). Sin embargo, los SERD conocidos aún no han sido tan útiles como resulta necesario para tratar el cáncer de manera eficaz. Por ejemplo, en lo que respecta al tratamiento contra el cáncer, sería muy útil descubrir SERD con mejores propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD), mayor eficacia en la clínica y buena biodisponibilidad oral. Un SERD antagonista puro con potente inhibición de la transcripción mediada por ER sería expresamente beneficioso en el tratamiento del el cáncer. Existe una necesidad de nuevos SERD para tratar tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico y cáncer de pulmón, así como mutaciones debido a una resistencia emergente. En particular, existe una necesidad de nuevos SERD para tratar el cáncer de mama, el cáncer gástrico y/o el cáncer de pulmón, ER positivos.

SUMARIO

Un compuesto de la fórmula:



y sales farmacéuticamente aceptables de este y composiciones farmacéuticas de este. También se proporcionan métodos para el uso de los compuestos como se describen en la presente, sales farmacéuticamente aceptables de estos y composiciones farmacéuticas de estos para tratar el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un

compuesto como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesite.

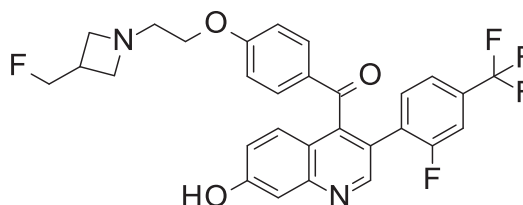
Además, se proporciona el compuesto como se describe en la presente descripción y una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en terapia. Los compuestos descritos en la presente descripción, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, pueden usarse en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón.

Se proporciona, además, el uso de los compuestos como se describen en la presente descripción, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón.

DESCRIPCIÓN

En la presente descripción se describe un compuesto tetracíclico novedoso y sales farmacéuticas de este que actúan como SERD. Los SERD pueden usarse ya sea como agentes únicos o en combinación con otras clases de fármacos, incluidos moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), inhibidores de la aromatasa, inhibidores de CDK4, inhibidores de CDK6, inhibidores de PI3K e inhibidores de mTOR para tratar el cáncer de mama positivo a receptor hormonal.

El compuesto novedoso descrito en la presente descripción es un compuesto de fórmula:



Se describen, además, las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto. El compuesto puede nombrarse mediante el uso de la nomenclatura IUPAC como (4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolina-4-il}metanona.

Además, en la presente descripción se describe una composición farmacéutica que incluye un compuesto como se describe en la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas en

la presente pueden prepararse con aditivos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente, el término "aditivos farmacéuticamente aceptables" se refiere a uno o más portadores, diluyentes y excipientes que son compatibles con los otros aditivos de las composiciones o formulaciones y no son perjudiciales para el paciente. El compuesto o sus sales farmacéuticamente aceptables, descritos en la presente descripción pueden formularse como composiciones farmacéuticas que se administran por una variedad de vías, tales como oral o IV. La biodisponibilidad es a menudo un factor en el tratamiento del cáncer, y la capacidad de elegir métodos de administración y composiciones farmacéuticas para controlar u optimizar la biodisponibilidad de un ingrediente activo es útil. Una composición de SERD biodisponible por vía oral sería particularmente útil. El compuesto, o sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en la presente descripción, se cree que tiene biodisponibilidad oral. Pueden encontrarse ejemplos de composiciones farmacéuticas y procesos para su preparación en "Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*", L. V. Allen Jr, Editor, 22ª edición, Mack Publishing Co., 2012. Los ejemplos no limitantes de portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen los siguientes: solución salina, agua, almidón, azúcares, manitol y derivados de sílice; agentes aglutinantes tales como carboximetilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona; caolín y bentonita; y polietilglicoles.

En la presente se describen también métodos para tratar un tipo de cáncer. Los métodos descritos en la presente incluyen administrar a un paciente que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Por ejemplo, el método de administración de la cantidad eficaz de un compuesto como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede ser la administración oral. El cáncer puede ser un cáncer sensible al estrógeno. Además, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón. Por ejemplo, el cáncer puede ser cáncer de mama ER positivo, cáncer gástrico ER positivo o cáncer de pulmón ER positivo.

Además, en la presente descripción se describe un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia. Los compuestos que se describen en la presente, o sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en la presente descripción, pueden usarse en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero,

cáncer gástrico o cáncer de pulmón. En particular, el cáncer puede ser cáncer de mama ER positivo, cáncer gástrico ER positivo o cáncer de pulmón ER positivo. Por ejemplo, el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, pueden administrarse por vía oral.

Adicionalmente, para el compuesto como se describe en la presente, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tipo de cáncer. Por ejemplo, el medicamento puede administrarse por vía oral. Los tipos de cáncer que se pueden tratar mediante el uso de los medicamentos como se describen en la presente incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón. En particular, el cáncer puede ser cáncer de mama ER positivo, cáncer gástrico ER positivo o cáncer de pulmón ER positivo.

El compuesto como se describe en la presente, y sales farmacéuticamente aceptables de este, puede tener utilidad clínica como agente único o en combinación con otros agentes anticancerígenos para el tratamiento de tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón. Cuando se usa en combinación con otros agentes anticancerígenos, el compuesto como se describe en la presente descripción, o sus sales farmacéuticamente aceptables, puede usarse de forma simultánea, secuencial o separada con los otros agentes anticancerígenos. Un ejemplo de otro agente anticancerígeno que puede combinarse con el compuesto como se describe en la presente descripción es 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto como se describe en la presente descripción, o sales farmacéuticamente aceptable de este, que, tras administrarse al paciente en dosis única o múltiple, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Preferentemente, un efecto deseado es la inhibición de la proliferación de células tumorales, la muerte de células tumorales, o ambas. El compuesto como se describe en la presente descripción, o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, como se describen en la presente descripción, son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, las dosis diarias suelen estar en el rango diario de alrededor de 100 mg a alrededor de 2000 mg.

Como se usa en la presente, "tratar" o "tratamiento" se refiere a restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un ser humano que padece una enfermedad, trastorno o afección en particular.

Los compuestos como se describen en la presente, o sales farmacéuticamente aceptables de estos, pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en las Preparaciones y Ejemplos que figuran más adelante. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras, o en combinación con etapas de diferentes procedimientos, para preparar el compuesto como se describe en la presente, o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los productos pueden recuperarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Los expertos pueden acceder con facilidad a los reactivos y los materiales de inicio.

En una etapa opcional, una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto como se describe en la presente descripción puede formarse por la reacción de una base libre apropiada de la presente invención con un ácido adecuado farmacéuticamente aceptable en un disolvente adecuado en condiciones estándar. Además, la formación de tales sales puede ocurrir simultáneamente con la desprotección de un grupo protector de nitrógeno. La posible formación de sales farmacéuticamente aceptables es conocida. Ver, por ejemplo, Gould, PL, "Salt selection for basic drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); y Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977). Un experto en la técnica apreciará que un compuesto como se describe en la presente se convierte fácilmente en, y puede aislarse como, una sal farmacéuticamente aceptable.

A menos que se indique específicamente, las abreviaturas que se usan en la presente se definen de acuerdo con *Aldrichimica Acta*, vol. 17, N. 1, 1984, o los significados comúnmente aceptados por los expertos en la técnica. Otras abreviaturas se definen de la siguiente manera: "AUC" se refiere al área bajo la curva; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DCM" se refiere a diclorometano o cloruro de metileno; "DMA" se refiere a dimetilamina; "DMEM" se refiere a medio de Eagle modificado por Dulbecco; "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "ADN" se refiere a ácido desoxirribonucleico; "ADNc" se refiere a ADN complementario; "DNasa" se refiere a desoxirribonucleasa; "DTT" se refiere a

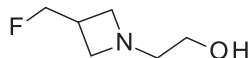
ditiotritol; "EC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce 50 % de respuesta de la actividad diana en comparación con un compuesto de control positivo predefinido (EC₅₀ absoluta); "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "ER α " se refiere a receptor de estrógeno alfa; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HBSS" se refiere a solución salina equilibrada de Hank; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinotansulfónico; "IC₅₀" se refiere a concentración de un agente que produce 50 % de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente (IC₅₀ relativa), o la concentración de un agente que produce 50 % de inhibición de la actividad enzimática diana en comparación con el control de placebo (IC₅₀ absoluta); "IPrOH" se refiere a isopropanol o alcohol isopropílico; "IV" se refiere a administración intravenosa; "K_i" se refiere a constante de inhibición; "MeOH" se refiere a alcohol metílico o metanol; "MTBE" se refiere a metil *t*-butiléter; "PBS" se refiere a solución salina amortiguada con fosfato; "PO" se refiere a administración oral; "PR α " se refiere a receptor alfa de progesterona; "QD" se refiere a dosis una vez por día; "ARN" se refiere a ácido ribonucleico; "RNasa" se refiere a ribonucleasa; "RT-PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa; "RT-qPCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; y "XPHOS Pd G2" se refiere a cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II).

Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Preparaciones y Ejemplos

Preparación 1

2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etan-1-ol

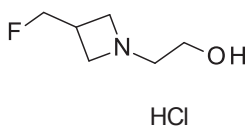


Agregar triacetoxiborohidruro de sodio (405 g, 1,91 mol) en porciones durante un período de 15 minutos a una solución agitada a 0 °C de clorhidrato de 3-(fluorometil)azetidina (160 g, 1,28 mol) en DCM (2,4 l) en N₂ y agitar a 0 °C durante 10 minutos. Agregar 1,4-dioxan-2,5-diol (99 g, 0,83 mol) a 0 °C en 6 porciones durante un período de 1 hora y luego agitar a 0-5 °C durante 15 minutos. Dejar que la reacción se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante 2 horas bajo N₂. Enfriar la reacción hasta 10-15 °C durante un período de 20 minutos. Agregar agua (800 ml) durante un período de 25-30 minutos a 10-15 °C, dejar que se caliente hasta

temperatura ambiente durante 5-10 minutos y luego separar las capas. Lavar la capa acuosa con DCM (800 ml), separar las capas, luego enfriar las capas acuosas combinadas hasta 10-15 °C y ajustar el pH a 13-14 mediante el uso de solución de hidróxido de sodio al 50 % (~540 mL). Dejar que la capa acuosa se caliente hasta temperatura ambiente, extraer con DCM (4 x 800 ml), secar con sulfato de sodio (80 g), filtrar y concentrar hasta sequedad para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 139 g (82 %) del compuesto del título como un aceite amarillo espeso con un ES/MS (m/z) de 134,1 (M+H).

Preparación 2

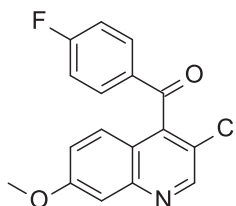
Clorhidrato de 2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etan-1-ol



Disolver 2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etan-1-ol (529 g, 4 mol) en MTBE (2,6 l) y enfriar hasta 0 °C. Agregar solución de HCl/EtOH (492 ml, 30 % en peso) por goteo durante 30 minutos y luego agitar a 0 °C durante 30 minutos. Filtrar los sólidos y lavar la torta de filtro con MTBE (2 x 200 ml). Secar bajo N₂ durante 8 horas para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 580 g (86 %) del compuesto del título como un sólido blanco con una ES/MS (m/z) de 134,0 (M+H).

Preparación 3

(3-cloro-7-metoxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona

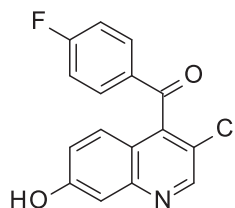


Enfriar una mezcla de 4-bromo-3-cloro-7-metoxiquinolína (70 g, 254 mmol) y THF (1 l) hasta -40 °C bajo N₂, lo que da como resultado la precipitación del material. Agregar cloruro de isopropilmagnesio (2 M en THF, 254 ml, 509 mmol) durante 20 minutos y agitar la mezcla durante 1 hora. Agregar una solución de cloruro de 4-fluorobenzoilo (66 ml, 559 mmol) en THF (140 ml) por goteo y luego dejar que se caliente hasta temperatura ambiente. Inactivar la reacción con solución saturada de cloruro de amonio (300 ml) y agua (200 ml) y separar las capas. Lavar la capa orgánica con

solución saturada de cloruro de amonio (300 ml), secar sobre MgSO_4 , filtrar y concentrar para obtener un residuo oleoso. Filtrar el aceite marrón crudo a través de gel de sílice que se eluye con una mezcla de MTBE/hexano (1:1) para obtener el producto crudo como un sólido amarillo (84 g). Tratar el sólido con 10 % de metilacetato/heptano (800 ml) y agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. Filtrar para recolectar los sólidos y reservar. Concentrar el filtrado y purificar en gel de sílice que se eluye con 10-40 % de EtOAc/hexanos, luego tratar el producto con metilacetato/heptano al 10 % (200 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 3 horas. Filtrar los sólidos resultantes, combinar con los sólidos de la filtración anterior y secar al vacío durante toda la noche para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación se obtuvieron 31 g (38%) del compuesto del título como un sólido amarillo con un ES/MS (m/z) de 316,0 ($M+H$).

Preparación 4

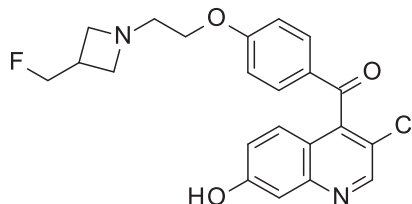
(3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona



Agregar tribromuro de boro (1 M en DCM, 295 ml, 295 mmol) a una mezcla de (3-cloro-7-metoxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona (31 g, 98 mmol) en DCM (217 ml) y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 días. Verter la mezcla lentamente en una solución a 0 °C de fosfato de potasio dibásico (2 M en agua, 700 ml) y agua (200 ml). Dejar que la mezcla se caliente hasta temperatura ambiente y agitar durante 1 hora. Concentrar la solución al vacío para eliminar los disolventes orgánicos, filtrar, recolectar el filtrado y secar el filtrado al vacío a 45 °C durante toda la noche. Tratar los sólidos con DCM/heptano (1:1, 450 ml) y agitar durante la noche. Recolectar los sólidos y secar al vacío durante toda la noche para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 32 g (rendimiento cuantitativo) del compuesto del título como un sólido de color marrón claro con una ES/MS (m/z) de 302,0 ($M+H$).

Preparación 5

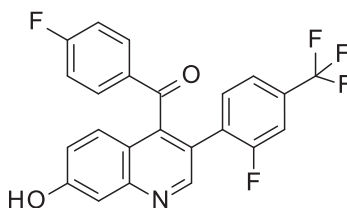
(3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)metanona



Agregar clorhidrato de 2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etan-1-ol (3,90 g, 23,0 mmol) a una solución agitada de (3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona (5,00 g, 15,3 mmol) en DMF (75 ml) seguido de hidruro de sodio (60 % en aceite mineral, 3,07 g, 76,6 mmol). Agitar bajo N₂ y calentar hasta 40 °C durante 45 minutos. Inactivar la solución con agua y concentrar. Dividir el residuo entre 20 % de iPrOH/CHCl₃ y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y separar, extraer lo acuoso con 2 x 20 % de iPrOH/CHCl₃, combinar los extractos orgánicos, secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar el filtrado para obtener el producto crudo como un aceite rojo oscuro. Purificar el material crudo mediante cromatografía en columna de gel de sílice que se eluye con un gradiente de 5-10 % de NH₃ 7 N en MeOH/DCM para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 5,31 g (84 %) del compuesto del título como un sólido amarillo con un ES/MS (m/z) de 415,0 (M+H).

Preparación 6

(4-fluorofenil)-[3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxi-4-quinolil]metanona

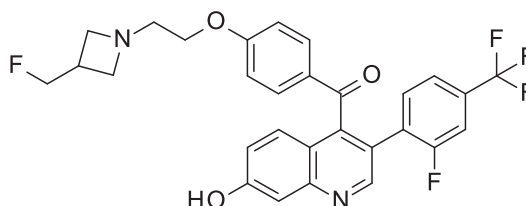


Desgasificar/purgar con 5 X N₂ una mezcla de ácido (3-cloro-7-hidroxi-4-quinolil)-(4-fluorofenil)metanona (140 g, 440,8 mmol), ácido 2-fluoro-4-(trifluorometil)fenilborónico (183,3 g, 881,7 mmol), carbonato de potasio (184,6 g, 1,3 mol), 2-metil-2-butanol (1,7 L) y agua (0,56 L). Añadir XPhos Pd G2 (7,1 g, 8,82 mmol) y calentar a 80 °C durante 2 horas. Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y evaporar el disolvente orgánico. Agregar EtOAc (1 L) y agua (0,2 L). Separar la capa orgánica y secarla sobre sulfato de magnesio. Filtrar este material a través de gel de sílice y concentrar hasta sequedad. Triturar el material crudo con una mezcla de hexanos (1,25 L) y

MTBE (0,25 L) para proporcionar un sólido. Filtrar el sólido y secar al vacío. Disolver el sólido en THF (1,5 L) y añadir un depurador de SiliaMetS® Tiol (150 g). Revolver la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche. Filtrar el depurador y evaporar el filtrado hasta sequedad para dar el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 185,5 g (96 %) del compuesto del título como un sólido blanco con una ES/MS (m/z) de 430,0 (M+H).

Ejemplo 1

(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il}metanona



A un recipiente, equipado con una entrada de N₂, agregar THF (2,8 L), *terc*-butóxido de potasio (274,5 g, 2,45 mol) y 2- (3-(fluorometil)azetidín-1-il)etan-1-ol (168 g, 1,22 mol). Revolver la mezcla durante 10 minutos. Añadir gota a gota una solución de (4-fluorofenil)-[3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxi-4-quinolil]metanona (350 g, 0,81 mol) en THF (0,7 L). Revolver a temperatura ambiente durante una hora. Inactivar la reacción con HCl 1 N hasta pH 8 y diluir con EtOAc (4 L). Separar la capa orgánica y lavarla con salmuera (2 L). Secar la solución sobre sulfato de magnesio, filtrar la solución y concentrar hasta sequedad para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación se obtuvieron 415 gramos (93,8 %) del compuesto del título como un sólido marrón pálido con un ES/MS (m/z) de 543,2 (M+H).

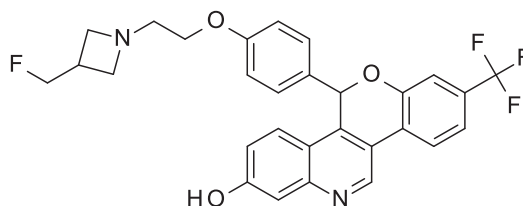
Ejemplo Alternativo 1

Desgasificar/purgar con N₂ x 5 una mezcla de (3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)metanona (200 mg, 0,48 mmol), ácido 2-fluoro-4-(trifluorometil)fenilborónico (158 mg, 0,72 mmol), carbonato de potasio (202 mg, 1,45 mmol), 2-metil-2-butanol (3 ml), y agua (1 ml) en un vial de microondas. Agregar XPhos Pd G2 (12 mg, 0,015 mmol), sellar la mezcla, y calentar en microondas a 80 °C durante 2 horas. Repartir el residuo entre MTBE y solución saturada de cloruro de amonio. Separar las capas y extraer la capa acuosa con MTBE. Combinar los extractos orgánicos, secarlos sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar el filtrado para obtener un residuo anaranjado. Purificar el material crudo mediante cromatografía

en columna de gel de sílice que se eluye con 5 % de MeOH/DCM para obtener el compuesto del título. Después de esta preparación, se obtuvieron 205 mg (78 %) del compuesto del título como un sólido amarillo con ES/MS (m/z) de 543,2 (M+H).

EJEMPLO 2

5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico



Enfriar una solución de (4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il}metanona (5,27 g, 9,71 mmol) en 1,4-dioxano (100 ml) hasta 5 °C. Agregar trietilborohidruro de litio (1 M en THF, 30,0 ml, 30,0 mmol). Retirar el baño de enfriamiento y agitar durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Inactivar la mezcla con agua. Agregar solución saturada de NH₄Cl y EtOAc. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar los extractos orgánicos, secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Disolver el residuo crudo en THF (100 ml). Agregar hidruro de sodio (60 % en aceite mineral, 1,94 g, 48,5 mmol). Someter la solución a reflujo durante 1,5 horas. Agregar hidruro de sodio adicional (60 % en aceite mineral, 1,94 g, 48,5 mmol) y luego someter a reflujo durante 30 minutos adicionales. Enfriar la solución hasta temperatura ambiente e inactivar con agua. Agregar EtOAc y solución saturada de NH₄Cl. Separar las capas y extraer la capa acuosa con EtOAc. Combinar el extracto orgánico, secar en MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. Purificar el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice que se eluye con un gradiente de 5-7 % de MeOH en DCM para obtener el compuesto del título (3,70 mg, 72 %) como una espuma amarilla clara. ES/MS (m/z): 525,2 (M+H).

Ensayos biológicos

La relación entre la expresión del receptor de estrógeno y ciertos cánceres se ha informado en la literatura (para el cáncer de mama, ver, por ejemplo, Puhalla S, Bhattacharya S, Davidson N., Hormonal therapy in breast cancer: A model disease for the personalization of cancer care, Molecular Oncology, 2012, 6:222-236; Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K,

Metastatic behavior of breast cancer subtypes, *J Clin Oncol*, 2010, 28(20):3271-3277; para el cáncer de ovario ver, por ejemplo, O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP, Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen, *Endocr Relat Cancer*, 2005;12(4):851-66; Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP, Estrogen regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer, *Gynecol Oncol*, 2007, 106(3):461-8; Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, y otros, Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: The use of letrozole in estrogen receptor-positive patients, *Clin Cancer Res*, 2007, 13(12):3617-22; para el cáncer de próstata, ver, por ejemplo, Bonkohoff H, Fixemer T, Hunsicker I y Remberger K, Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostate lesions, *Am J Pathol*, 1999, 155:641-647; para el cáncer de endometrio y útero, ver, por ejemplo, Krasner C, Aromatase inhibitors in gynecologic cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, Aug-Sep;106(1-5):76-80; Boisen MM, Andersen CL, Sreekumar S, y otros, Treating gynecologic malignancies with selective estrogen receptor downregulators (SERDs): Promise and challenges, *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 418:322-3330; para el cáncer de pulmón, ver, por ejemplo, Baik CS, Eaton KD y otros, Estrogen signaling in lung cancer: An opportunity for novel therapy, *Cancer*, 2012, 4:969-988; Marquez-Garban DC, Chen H-W, Goodglick L, Fishbein MC y Pietras RJ, Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer. Steroid enzymes and cancer, *Ann. N. Y. Acad Sci*, 2009, 1155:194-205; Hamilton DH, Griner LM, Keller JM, Hu X, Southall N, Marugan J, David JM, Ferrer M y Palena C, Targeting estrogen receptor signaling with fulvestrant enhances immune and chemotherapy mediated cytotoxicity of human lung cancer, *Clin Cancer Res*, 2016, 22(24):6204-16; Rodriguez-Lara V, Hernandez-Martinez JM, Arrieta O, Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications, *J Thoracic Disease*, 2018, 10(1):482-497; para cáncer gástrico, ver, por ejemplo, Tang W, Liu R, Yan Y, Pan X, Wang M, Han X, Ren H, y Zhang Z, Expression of estrogen receptors and androgen receptor and their clinical significance in gastric cancer, *Oncotarget*, 2017, 8(25) 40765-777).

Los siguientes ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son potentes degradadores de las proteínas ER α de tipos silvestres y mutantes. Los resultados de los ensayos demuestran, además, que los compuestos ejemplificados son potentes antagonistas de los receptores mutantes y de tipo silvestre ER α e inhiben la actividad transcripcional mediada por ER. Además, los ensayos demuestran que el compuesto

del ejemplo 1 inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama ER+, y la señalización de ER α y la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ER positivo.

Ensayo de unión competitiva a ER α (tipo silvestre), ER α (mutante Y537S)

El propósito de los siguientes ensayos de unión competitiva con ER es determinar la afinidad de unión de un compuesto de prueba contra ER α (tipo silvestre) y ER α (mutante Y537S) Ver Fanning y otros, "Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation," eLife 2016;5:e12792.

Ejecutar el ensayo de unión competitiva en un tampón que contenga HEPES 50 mM, pH 7,5, EDTA 1,5 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %, 1 mg/ml de ovalbúmina y DTT 5 mM, mediante el uso de 0,025 μ Ci por pocillo de ^{3} H-estradiol (118 Ci/mmol, 1 mCi/ml), 7,2 ng/pocillo de ER α (tipo silvestre), o 7,2 ng/ pocillo de ER α (mutante Y537S). Agregar el compuesto de prueba a 10 concentraciones diferentes que oscilen de 10 000 nM a 0,5 nM y determinar la fijación no específica en presencia de 1 μ M de 17- β estradiol. Incubar la reacción de fijación (140 μ l) durante 4 horas a temperatura ambiente y luego agregar amortiguador frío de dextrano-carbón (70 μ l) (que contenga por 50 ml de amortiguador de ensayo, 0,75 g de carbón y 0,25 g de dextrano) a cada reacción. Mezclar las placas durante 8 minutos en un agitador orbital a 4 °C y luego centrifugar a 3000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Transferir una alícuota (120 μ l) de la mezcla a otra placa de fondo plano blanca de 96 pocillos (Costar) y agregar fluido de centelleo Perkin Elmer Optiphase Supermix (175 μ l) a cada pocillo. Sellar las placas y agitar vigorosamente en un agitador orbital. Después de una incubación de 2,5 horas, leer las placas en un contador Wallac Microbeta. Calcular la IC₅₀ mediante el uso de un ajuste de curva logística de 4 parámetros y calcular el % de inhibición a 10 μ M. Convertir los valores de IC₅₀ para el compuesto a K_i mediante el uso de la ecuación de Cheng-Prusoff. Los resultados de este ensayo demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 se une al ER α tipo silvestre recombinante con una K_i (nM) de $3,78 \pm 0,74$ (n=3) y se une al ER α mutante (Y537S) con una K_i (nM) de $21,24 \pm 2,12$ (n=3).

Los resultados de este ensayo demuestran la afinidad y potencia de unión del compuesto ejemplificado contra proteínas de ER α de tipos silvestres y mutantes (ESR1 Y537S).

Ensayo de degradación de ER α en células MCF7

El propósito del siguiente ensayo de degradación de ER α es medir la degradación de ER α mediante un compuesto de prueba en una línea celular de cáncer de mama ER α positivo, tal como MCF7.

Cultivar células MCF7 (adquiridas a través de ATCC HTB-22) en medio DMEM complementado con FBS al 10 %, 0,01 mg/ml de insulina humana 1 y 1 % de antibióticos de penicilina/estreptomicina y colocar en placas de fondo plano de 384 pocillos a una densidad de 4 000 células por pocillo en medio DMEM libre de rojo de fenol (20 μ l) que contiene FBS al 10 % despojado de carbón. Incubar las células durante toda la noche en una incubadora de cultivo celular (5 % de CO₂, 95 % de humedad relativa y 37 °C) y permitir que las células se adhieran a la placa. Al día siguiente dosificar las células con el compuesto de prueba. Usar un dispensador acústico Echo 555 para preparar diluciones en serie del compuesto de prueba (1:3) en un intervalo de 6 μ M a 0,0003 μ M. Dosificar las células con la adición de 5 μ l de la placa de dilución en serie a la placa celular, lo que produce una concentración final de DMSO de 0,2 % con un intervalo de dosis de concentración del compuesto de prueba final que oscila entre 2 y 0,0001 μ M. Para el punto máximo, usar medios que contengan DMSO al 0,2 % y, para el punto mínimo, usar fulvestrant diluido en concentraciones finales de 2 μ M en los medios de crecimiento que contengan DMSO al 0,2 %. Después de la dosificación con el compuesto de prueba, incubar las placas celulares a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. Fijar las células al agregar paraformaldehído al 14 % (10 μ l) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar las células una vez con PBS (20 μ l) e incubar con PBS (20 μ l) que contenga TWEEN® 20 al 0,5 % (v/v) durante 1 hora. Lavar las células con PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % (2x) y bloquear con BSA al 3 % en PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % y TRITON™ X-100 al 0,1 % (20 μ l/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar 1:500 de dilución de anticuerpo primario (20 μ l) (anticuerpo contra ER α (Clone SP1) monoclonal de conejo #RM-9101-S, Thermo Scientific) en BSA al 1 % en PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % por pocillo, sellar las placas e incubar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, lavar las células con PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % (2x) e incubar con un anticuerpo secundario (20 μ l/pocillo) (dilución 1:1000, anti-IgM de conejo en cabra ALEXA FLUOR™ 488) en BSA al 1 % en PBS durante 105 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS (2 x 20 μ l), agregar RNasa (Sigma) (20 μ l de 50 μ g/ml) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por pocillo (20 μ l). Sellar las placas e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la mesa de trabajo (preservada de la luz). Someter las

placas a barrido con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser fabricado por TTP LABTECH LTD] para medir el ER α . El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células positivas al receptor de estrógeno por medio de la intensidad. Usar la intensidad total a 575-640 nm de yoduro de propidio/ADN para identificar células individuales. El resultado del ensayo es el % de células positivas al receptor de estrógeno. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado mediante el uso de GENE DATA™.

Los resultados de este ensayo demuestran que el compuesto de la fórmula (I) es un SERD con una potente actividad de degradación de ER α en las células. Específicamente, los resultados muestran una potente degradación de ER α por parte del compuesto del Ejemplo 1 en células de cáncer de mama MCF7. Mediante el uso de este ensayo, el valor de la IC₅₀ Relativa (μ M) para el compuesto del Ejemplo 1 es $2,16 \pm 0,96$ nM (n=15).

Ensayo de inducción de PR α en células MCF7

El propósito del siguiente ensayo de inducción de PR α es determinar si un compuesto de prueba tiene actividad agonista contra el receptor ER α (se esperaría que un agonista active el receptor).

Cultivar MCF7 (adquiridas a través de ATCC HTB-22) en medio DMEM complementado con FBS al 10 %, 0,01 mg/ml de insulina humana 1 y antibióticos de 1 % de penicilina/estreptomicina y colocar las células (antes de que se vuelvan 70 % confluentes) en placas de fondo plano de 384 pocillos a una densidad de 4 000 células por pocillos en 20 μ l de volumen en medio DMEM libre de rojo de fenol que contiene FBS al 10 % (despojados de carbón). Incubar las células durante toda la noche en una incubadora de cultivo celular (5 % de CO₂, 95 % de humedad relativa a 37 °C) y permitir que las células se adhieran a la placa. Al día siguiente, dosificar las células con el compuesto de prueba. Usar un dispensador acústico Echo 555 para preparar diluciones en serie del compuesto (1:3) en un intervalo de 6 μ M a 0,0003 μ M. Dosificar las células con la adición del compuesto de prueba (5 μ l) de la placa de dilución en serie a la placa celular, lo que produce una concentración final de DMSO de 0,2 % con una concentración final del compuesto de prueba que oscila entre 2 y 0,0001 μ M. Para el punto máximo, usar medios que contengan DMSO al 0,2 % y, para el punto mínimo, usar fulvestrant diluido en concentraciones finales de 2 μ M en los medios de crecimiento que contengan DMSO al 0,2 %. Después de la dosificación con el

compuesto de prueba, incubar las placas celulares a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. Fijar las células al agregar paraformaldehído al 14 % (10 µl) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar las células una vez con PBS (20 µl) e incubar con PBS (20 µl) que contenga TWEEN® 20 al 0,5 % (v/v) durante 1 hora. Lavar las células dos veces con PBS (20 µl) que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % y bloquear con BSA al 3 % en PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % y TRITON™ X-100 al 0,1 % (20 µl/cavidad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar (20 µl) de anticuerpo primario 1:500 (anticuerpo monoclonal anti-receptor de progesterona humano generado en ratón, clon PgR 636 Dako, M3569) en 1 % de BSA/PBS con TWEEN® 20 al 0,05 por pocillo, sellar las placas e incubar durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, lavar las células con TWEEN® 20 al 0,05 % en PBS (2 x 20 µl) e incubar con un anticuerpo secundario (20 µl/pocillo) (dilución 1:1000, anti-IgM de conejo en cabra ALEXA FLUOR™ 488) en BSA al 1 % en PBS durante 105 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS (2 x 20 µl), agregar RNasa (20 µl de 50 µg/ml) (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por pocillo. Sellar las placas e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la mesa de trabajo (preservada de la luz). Someter las placas a barrido con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser fabricado por TTP LABTECH LTD] para medir el receptor alfa de progesterona. El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células positivas al receptor de progesterona por intensidad media. Usar la intensidad total a 575-640 nm de yoduro de propidio/ADN para identificar células individuales. El resultado del ensayo es el % de células positivas para el receptor de progesterona. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado mediante el uso de GENE DATA™.

Mediante el uso de este ensayo, la IC₅₀ Relativa (µM) del compuesto del Ejemplo 1 es > 2 µM. Los resultados de este ensayo no demuestran una actividad agonista significativa del Ejemplo 1, en células de cáncer de mama MCF7. Estos resultados demuestran, además, que el compuesto del Ejemplo 1 es un antagonista puro de ERα en células de cáncer de mama MCF7.

Ensayo celular de inhibición de PRα (antagonismo funcional de ERα) en células MCF7-ESR1 Y537N 682 CRISPR

El propósito del siguiente ensayo celular de inhibición de PRα (antagonismo funcional de ERα) es determinar la actividad antagonista de un compuesto de prueba contra el receptor ERα mutante Y537N. Se espera que un antagonista en este ensayo bloquee

la función del receptor ER α . PR α (PGR) es una diana transcripcional aguas abajo de ER α y, por lo tanto, se espera que un antagonista de ER α inhiba la expresión de PR α . Cultivar MCF7-ESR1 Y537N-682 (generadas por la edición génica CRISPR/Cas9 del gen ESR1 en células MCF7, clon #682) en medio DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos penicilina/estreptomicina al 1 % y colocar las células (antes de que se vuelvan 70 % confluentes) en placas de fondo plano de 384 pocillos a una densidad de 4 000 células por pocillo en FBS al 10 % en medio DMEM libre de rojo de fenol (20 μ l de volumen) (despojado de carbón). Incubar las células durante toda la noche en una incubadora de cultivo celular (5 % de CO₂, 95 % de humedad relativa y 37 °C) y permitir que las células se adhieran a la placa. Al día siguiente dosificar las células con el compuesto de prueba. Usar un dispensador acústico Echo 555 para preparar diluciones en serie del compuesto (1:3) en un intervalo de 6 μ M a 0,0003 μ M. Dosificar las células con la adición de 5 μ l de la placa de dilución en serie a la placa celular, lo que produce una concentración final de DMSO de 0,2 % con un intervalo de dosis de concentración del compuesto de prueba final que oscila entre 2 y 0,0001 μ M. Para el punto máximo, usar medios que contengan DMSO al 0,2 % y, para el punto mínimo, usar fulvestrant diluido en concentraciones finales de 2 μ M en los medios de crecimiento que contengan DMSO al 0,2 %. Después de la dosificación con el compuesto de prueba, incubar las placas celulares a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas. Fijar las células al agregar paraformaldehído al 4 % (10 μ l) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar las células con PBS (1 x 20 μ l) e incubar con PBS (20 μ l) que contenga TWEEN® 20 al 0,5 % (v/v) durante 1 hora. Lavar las células con TWEEN® 20 al 0,05 % en PBS (2 x 20 μ l) y bloquear con TWEEN® 20 al 0,05 % en 3 % de BSA/PBS y TRITON™ X-100 al 0,1 % (20 μ l/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar (20 μ l) de dilución de anticuerpo primario 1:500 (anticuerpo monoclonal anti-receptor de progesterona humano generado en ratón, clon PgR 636 Dako, M3569) en 1 % de BSA/PBS con TWEEN® 20 al 0,05 por pocillo, sellar las placas e incubar durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, lavar las células con PBS al 0,05 % ® (2 x 20 μ l) e incubar con un anticuerpo secundario (20 μ l/pocillo) (dilución 1:1000, anti-IgM de conejo en cabra ALEXA FLUOR™ 488) en BSA al 1 % en PBS durante 105 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS (2 x 20 μ l), agregar RNasa (20 μ l de 50 μ g/ml) (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por pocillo. Sellar las placas e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la mesa de trabajo (preservada de la luz). Someter las placas a barrido con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de

microplaca de fluorescencia de barrido láser fabricado por TTP LABTECH LTD] para medir el receptor alfa de progesterona. El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células positivas al receptor de progesterona por intensidad media. Usar la intensidad total a 575-640 nm de yoduro de propidio/ADN para identificar células individuales. El resultado del ensayo es el % de células positivas para el receptor de progesterona. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado mediante el uso de GENE DATA™.

Mediante el uso de este ensayo, la IC₅₀ Relativa (nM) del compuesto del Ejemplo 1 es 7,602 ± 4,804 nM (n=14). Estos resultados demuestran una potente inhibición de PRα y antagonismo funcional del Ejemplo 1 en células de cáncer de mama MCF7 (ESR1 Y537N, mutante heterocigoto). Como tal, el compuesto del Ejemplo 1 es un antagonista potente del mutante ERα (Y537N) y un inhibidor potente de la transcripción mediada por ERα. PRα (PGR) también es una diana transcripcional de ERα, y los resultados de este ensayo demuestran una potente inhibición de la transcripción mediada por ERα de PRα.

Ensayo celular de inhibición de PRα (antagonismo funcional de ERα) en células MCF7

El propósito del siguiente ensayo celular de inhibición de PRα (antagonismo funcional de ERα) es determinar la actividad antagonista de un compuesto de prueba contra el receptor ERα. Se espera que un antagonista en este ensayo bloquee la función del receptor ERα. PRα es una diana transcripcional aguas abajo de ERα y, por lo tanto, se espera que un antagonista de ERα inhiba la expresión de PRα.

Llevar a cabo las condiciones del ensayo como se detalla en el ensayo Acumen a base de células de degradación de ERα anterior mediante el uso de la línea celular MCF7, excepto que, antes de dispensar el compuesto de prueba, retirar el medio de la placa celular y tratar previamente todas las pocillos, excepto los pocillos de control negativo (columna 24 de la placa) con medio de ensayo que contiene estradiol 0,47 nM durante 30 minutos. En este ensayo, llevar a cabo la inmunotinción para la detección de PRα y someter las placas a barrido con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser fabricado por TTP LABTECH LTD] para medir el PRα. El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células PRα positivas mediante la intensidad media. Usar la intensidad total a 575-640 de yoduro de propidio/ADN para identificar células individuales. El resultado del ensayo

es el % de células PR α positivas. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado mediante el uso de GENE DATA™.

Mediante el uso de este ensayo, la IC₅₀ Relativa (nM) del compuesto del Ejemplo 1 en este ensayo es $15,75 \pm 9,037$ nM (n=15). Los resultados de este ensayo demuestran una inhibición potente de PR α y antagonismo funcional del Ejemplo 1 en células de cáncer de mama MCF7. Como tal, el compuesto del Ejemplo 1 es un antagonista potente de la proteína de tipo silvestre ER α y un inhibidor potente de la transcripción mediada por ER α . PR α (PGR) también es una diana transcripcional de ER α , y los resultados de este ensayo demuestran una potente inhibición de la transcripción mediada por ER α de PR α .

Ensayo de proliferación celular en MCF7 y MCF7-ESR1 Y537N-682

Por lo general, el propósito de los siguientes ensayos de proliferación celular es detectar si un compuesto de prueba tiene efectos sobre la proliferación celular, la viabilidad celular y la citotoxicidad en respuesta al tratamiento en experimentos de cultivo celular. La proliferación celular se monitorea por el número de células a lo largo del tiempo y el ensayo de yoduro de propidio que se usa permite la medición continua de la viabilidad celular a lo largo del tiempo.

Sembrar células MCF7 (adquiridas a través de ATCC HTB-22) a una densidad de 2,000 células por cavidad en medio DMEM libre de rojo de fenol, FBS al 10 % (20 μ l de volumen) (despojado de carbón) en una placa de cultivo de células de 384 pocillos de fondo transparente. Sembrar en placas MCF7-ESRY537N -682 (generadas por la edición génica CRISPR/Cas9 del gen ESR1 en células MCF7, clon #682) en medio DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos penicilina/estreptomicina al 1 % a una densidad de 1000 células por pocillo. Incubar las placas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente dosificar las células con el compuesto de prueba. Usar un dispensador acústico Echo 555 para preparar diluciones en serie del compuesto de prueba (1:3) en un rango de 60 μ M a 0,003 μ M. Dosificar las células con la adición de 5 μ l de la placa de dilución en serie a la placa celular, lo que produce una concentración final de DMSO de 0,2 % con un intervalo de dosis de concentración del compuesto de prueba final que oscila entre 20 y 0,001 μ M. Para el punto máximo, usar medios que contengan DMSO al 0,2 % y, para el punto mínimo, usar fulvestrant diluido en concentraciones finales de 2 μ M en los medios de crecimiento que contengan DMSO al 0,2 %. Después de la dosificación con el compuesto de prueba, incubar las placas celulares a 37 °C y 5 % de CO₂. Siete días después de la adición del compuesto de

prueba, retirar las placas de la incubadora y agregar etanol frío al 96 % (65 µl) a cada pocillo. Después de 30 minutos, remover el medio y agregar RNasa (20 µl de 50 µg/ml) (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por pocillo. Sellar las placas e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la mesa de trabajo (preservada de la luz). Someter las placas a barrido con ACUMEN EXPLORER™ [citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser fabricado por TTP LABTECH LTD]. La línea celular MCF-7 crece formando agregados, es posible que no pueda usarse como lectura la cantidad de células como cantidad de objetos; por lo tanto, la cantidad de células puede evaluarse a través de la cantidad estimada de células, calculada a través del parámetro de área (relación de área total de la población total de células (un intervalo designado de intensidad pico de FL-1 (PI) y la media de área de la población de células individuales (definida por el perímetro)). Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado mediante el uso de GENE DATA™.

Mediante el uso de este ensayo, la IC₅₀ Relativa (nM) del compuesto del Ejemplo 1 en el tipo silvestre MCF7 ESR1 es $9,243 \pm 1,741$ nM (n=2) y en las células mutantes MCF7-ESR1 Y537N es $7,960 \pm 3,691$ nM (n=6). Estos resultados demuestran una actividad antiproliferativa potente y la inhibición del crecimiento celular por el Ejemplo 1, en células de cáncer de mama MCF7 (ESR1 de tipo silvestre) y MCF7 (ESR1 Y537N mutantes).

Ensayo de inhibición de la diana *in vivo* (IVTI) (ensayo de PGR RT-qPCR) en tumores MCF7

El propósito de este ensayo de IVTI es medir la capacidad de un compuesto de prueba (SERD) para inhibir la expresión del gen PRα (Receptor alfa de progesterona) aguas abajo de ERα en tumores de xenoinjerto implantados en ratones.

Implantar ratones NOD SCID hembras (22-25 g) de Envigo RMS, Inc., Madison, Wisconsin con 5×10^6 células de cáncer de mama MCF7 ER positivas (ATCC, #HTB-22) por vía subcutánea en la región del flanco derecho en solución 1:1 de HBSS + MATRIGEL™ (200 µL). Implantar un gránulo de 17-β estradiol (0,18 mg/gránulo, liberación de 90 días, de Innovative Research) por vía subcutánea 1 día antes de la implantación de la célula tumoral. Medir el crecimiento tumoral y el peso corporal dos veces por semana a partir del séptimo día después de la implantación. Cuando los tamaños tumorales alcanzan 250-350 mm³, aleatorizar los animales y agruparlos en grupos de cinco animales. Dosificar los animales con el compuesto de prueba en un vehículo específico (hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al

0,05 % en agua purificada) o vehículo solo por vía oral durante 3 días y recolectar los tumores y la sangre en los intervalos de tiempo deseados después de la última dosis. Someter a eutanasia a los animales con anestesia de isoflurano más dislocación cervical. Congelar rápidamente los tumores y almacenar a -80 °C hasta el procesamiento para el aislamiento de ARN y el ensayo de RT-qPCR. Recolectar la sangre en tubos EDTA, centrifugar para obtener plasma y congelar a -80 °C en una placa de 96 pocillos. Determinar las exposiciones del compuesto de prueba mediante espectrometría de masas.

Pulverizar los tumores en nitrógeno líquido y lisar en tampón de lisis de ARN 1 x (de kits de aislamiento de ARN) mediante el uso de microesferas Matrix D (MP Biomedical, #6913-500) en una máquina de disruptor celular FASTPREP-24™ (MP Biomedical). Transferir los lisados tumorales a tubos nuevos después de girar a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Aislar el ARN de los lisados tumorales mediante el uso del mini kit de ARN PURELINK® (Invitrogen #12183018A) o el mini kit RNeasy (Qiagen #74104 y #74106). Eliminar los contaminantes de ADN mediante el uso del conjunto de DNasa PURELINK® (Invitrogen #12185010) o el conjunto de DNasa libre de RNasa (Qiagen #79254). Medir la concentración de ARN aislado al diluir muestras en agua libre de RNasa y al medir la absorbancia a 260 nm en un lector de placas (SpectraMax190). Sustraer la medición de absorbancia promedio de 260 nm del blanco (solo agua libre de RNasa) de las mediciones de 260 nm de todas las demás muestras de ARN. Diluir las muestras de ARN a concentraciones iguales en agua libre de RNasa. Sintetizar el cDNA a partir de ARN diluido mediante el sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR (Invitrogen, #18080-051). Para realizar la RT-qPCR, primero diluir el cDNA en agua libre de RNasa. Combinar la mezcla Absolute Blue qPCR ROX 2× (Thermo, #AB-4139/A), el cebador de PGR (Thermo, Hs01556702_m1) y ADNc diluido para cada reacción en una placa de PCR (Applied Biosystems, #4309849). Ampliar el cDNA al incubar las muestras durante 2 minutos a 50 °C seguido de 15 minutos a 95 °C en el termociclador (sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT). Continuar incubando a 95 °C durante 15 segundos, seguido de 50 °C durante 60 segundos para un total de 40 ciclos. Los ciclos se normalizan al gen de mantenimiento y se usan para calcular el % de inhibición de PGR en comparación con el vehículo solo. Analizar cada muestra por duplicado y usar números promedio para los cálculos. Calcular el porcentaje de inhibición de la diana (PGR) mediante el uso de Excel y XL Fit.

Los resultados de este ensayo demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la expresión de PR α (PGR) en el modelo de xenoinjerto tumoral. Además, el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la expresión de PR α (PGR) en 57 % en el modelo de xenoinjerto tumoral durante 24 horas con una dosis de 30 mg/kg cuando se administra por vía oral. Estos resultados demuestran una inhibición significativa y sostenida de la actividad antagonista de ER α y la actividad transcripcional mediada por ER α *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral.

Estudio *in vivo* de inhibición del crecimiento tumoral en tumor de xenoinjerto MCF7 implantado en ratones

El propósito del siguiente ensayo de inhibición de tumores de xenoinjerto es medir la reducción en el volumen tumoral en respuesta a la administración del compuesto de prueba.

Expandir las células de cáncer de mama humano MCF7 (ATCC #HTB-22) en cultivo, recolectar e inyectar 5×10^6 células en solución 1:1 de HBSS+MATRIGEL™ (200 μ L) por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones hembra NOD SCID (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Veinticuatro horas antes de la implantación de las células MCF7, implantar gránulos de estrógeno (0,18 mg/gránulo, 17 β estradiol, liberación de 90 días, Innovative Research) por vía subcutánea. Medir el crecimiento tumoral y el peso corporal dos veces por semana a partir del séptimo día después de la implantación. Cuando los tamaños tumorales alcanzan 250-350 mm³, aleatorizar los animales y agruparlos en grupos de 5 animales. Preparar el compuesto de prueba, en un vehículo apropiado (hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al 0,05 % en agua purificada) y administrar por alimentación por sonda nasogástrica durante 42 días. Determinar la respuesta tumoral mediante la medición del volumen tumoral realizada dos veces por semana durante el transcurso del tratamiento. Tomar el peso corporal como una medición general de la toxicidad cuando se mida el volumen tumoral.

Cuando se usa en este ensayo, se encuentra que el compuesto del Ejemplo 1 tiene valores delta T/C % como se proporciona en la Tabla 6 a continuación. Estos resultados indican que el compuesto del Ejemplo 1 demuestra una buena biodisponibilidad oral en ratones y una actividad antitumoral significativa o regresiones tumorales en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF7.

Estudio *in vivo* de inhibición del crecimiento tumoral en tumor de xenoinjerto MCF7 implantado en ratones

Tabla 6

Modelo de tumor	Dosis (mg/kg)	Cronograma	% de Delta T/C o % de Regresión	valor de p
MCF7 (xenoinjerto de cáncer de mama)	30	QD	-36	<0,001*

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza SpatialPower y Log 10.

*: significativo ($p < 0,05$) en comparación con el control de vehículo.

El % de delta T/C se calcula cuando el volumen tumoral de criterio de valoración en un grupo tratado está en el valor inicial del volumen tumoral o por encima de este. La fórmula es $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$, donde T y C son medias de volúmenes tumorales de criterio de valoración en el grupo tratado o de control, respectivamente. T_0 y C_0 son medias de volúmenes tumorales de valor inicial en esos grupos.

El % de regresión se calcula cuando el volumen de criterio de valoración está por debajo del valor inicial. La fórmula es $100 \cdot (T - T_0) / T_0$, donde T_0 es la media de volumen tumoral de valor inicial para el grupo tratado.

La media grande de todos los grupos del valor inicial (aleatorización) en el día 32 se usa para calcular el % de cambio de T/C.

Ensayo de biodisponibilidad oral en ratas

El propósito del siguiente ensayo es demostrar si un compuesto de prueba es biodisponible por vía oral.

Administrar el compuesto de prueba a ratas Sprague-Dawley IV a 1 mg/kg (mediante el uso de vehículos de: CAPTISOL® al 20 % en amortiguador de fosfato de sodio 25 mM, cantidad suficiente de pH2; o DMA al 25 %, EtOH al 15 %, propilenglicol al 10 %, 2-pirrolidona al 25 % y agua purificada al 25 %) y PO a 10 mg/kg (mediante el uso de un vehículo de hidroxietilcelulosa al 1 %, polisorbato 80 al 0,25 %, antiespumante 1510-US al 0,05 % y cantidad suficiente de agua purificada). Recolectar muestras seriadas de sangre 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 12 horas después de la dosis para el bolo IV y 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 12 horas después de la administración oral. Después del tratamiento con un coagulante EDTA, obtener plasma mediante centrifugación y almacenar a -70 °C hasta el análisis mediante LC-MS/MS. Determinar la concentración

del compuesto de prueba en plasma y cargarla en el sistema LIMS™ de Watson, donde se usa un análisis no compartimental para calcular el área bajo la curva (AUC) para los grupos tanto IV como PO. Calcular la biodisponibilidad oral (% de F) mediante la siguiente ecuación,

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

Mediante el uso de este ensayo, el compuesto del Ejemplo 1 muestra un valor de %F del 27 %. Este ensayo demuestra que el Ejemplo 1 tiene una buena biodisponibilidad oral.