

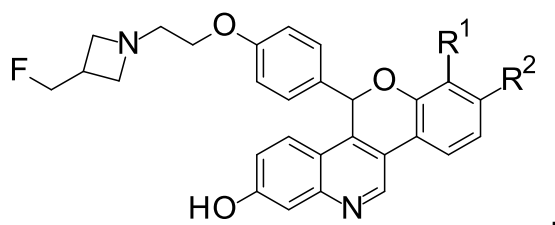
DEGRADADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO

ANTECEDENTES

Los degradadores selectivos del receptor de estrógeno (SERD) se fijan al receptor de estrógeno (ER) y regulan de manera descendente la actividad transcripcional mediada por ER. Esta degradación y regulación descendente 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 (véase, por ejemplo, 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 contra 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.

SÍNTESIS

Se proporcionan en la presente compuestos de la fórmula:



y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos y composiciones farmacéuticas de estos. En esta fórmula, ya sea R¹ o R² se selecciona independientemente de Cl, F, -CF₃, o -CH₃, y el otro es hidrógeno.

También se proporcionan métodos para usar los compuestos como se describen en la presente, sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico 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 aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, a un paciente que lo necesite.

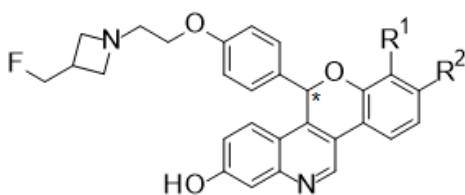
Se proporcionan además el compuesto como se describe en la presente y una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este para su uso en tratamiento. Los compuestos descritos en la presente, y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, pueden usarse en el tratamiento contra el 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, y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón.

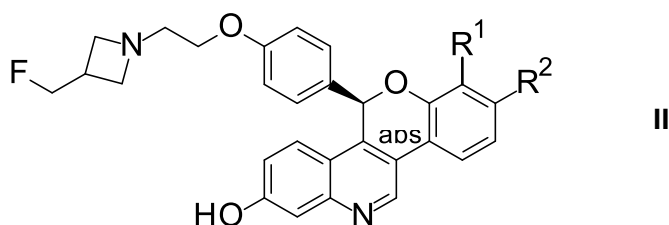
DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se describen novedosos compuestos tetracíclicos y sales farmacéuticas de estos que actúan como SERD. Los SERD recientemente inventados que se describen en la presente proporcionan inhibición de la transcripción mediada por ER que será útil en el tratamiento contra 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. Estos SERD pueden usarse ya sea como agentes únicos o en combinación con otras clases de fármacos, incluso 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 tipos de cáncer receptores hormonales positivos, tales como el cáncer de mama, el cáncer gástrico y/o el cáncer de pulmón.

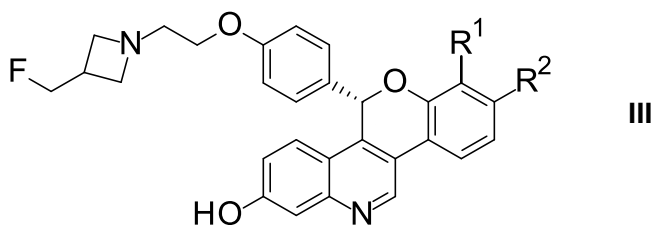
Los novedosos compuestos descritos en la presente están representados por la Fórmula I:



y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, en donde ya sea R^1 o R^2 se selecciona independientemente de Cl, F, $-CF_3$, o $-CH_3$, y el otro es hidrógeno. Una persona del oficio de nivel medio apreciará que los compuestos como los describe la Fórmula I, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, contienen un centro quiral, cuya posición se indica con un * arriba. Una persona del oficio de nivel medio también apreciará que las designaciones (R) o (S) de Cahn-Ingold-Prelog para los centros quirales variarán en función de los patrones de sustitución alrededor de un centro quiral. El centro quiral en el compuesto de la Fórmula I proporciona una forma enantiomérica R mostrada por la Fórmula II:



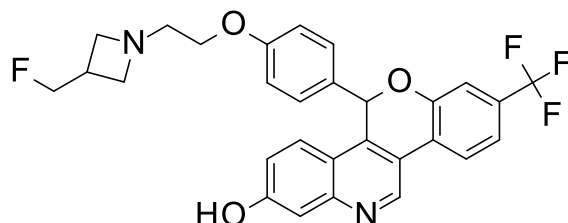
Y una forma enantiomérica S mostrada por la Fórmula III:



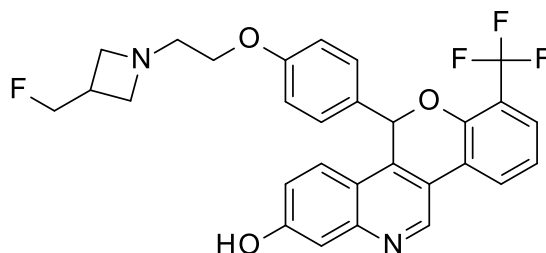
Todos los estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de los compuestos de acuerdo con la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, incluso racematos, se incluyen dentro del alcance de los compuestos descritos en la presente. Los compuestos para su uso farmacéutico que contienen centros quirales se aíslan a menudo como diastereómeros y enantiómeros individuales, y tales compuestos aislados de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III se incluyen dentro del alcance de los compuestos descritos en la presente. Una persona del oficio de nivel medio también apreciará que los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III descritos en la presente, y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, pueden deuterarse (donde un deuterio puede reemplazar un hidrógeno), y se

considera que tales moléculas están incluidas dentro del alcance de los compuestos descritos en la presente.

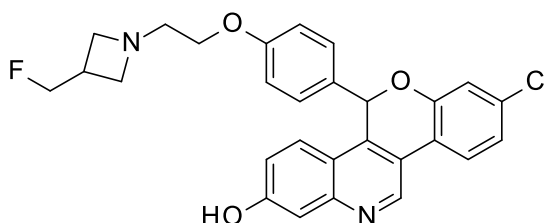
Aquí se muestran ejemplos específicos de los compuestos de la Fórmula I (incluso nombres de nomenclatura IUPAC):



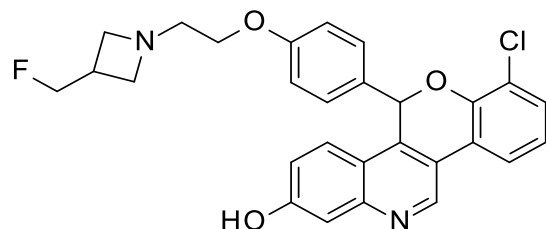
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol;



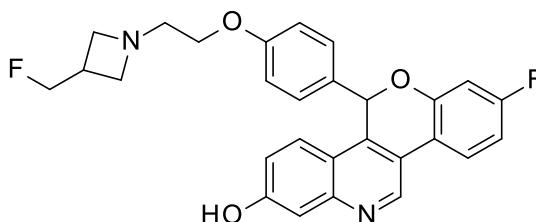
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol;



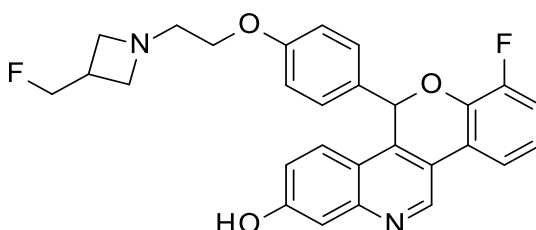
8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol;



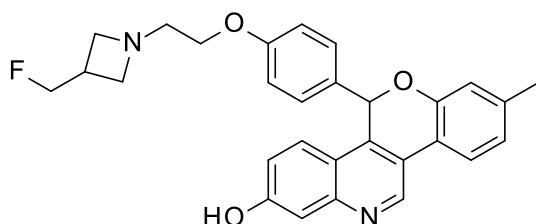
7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol;



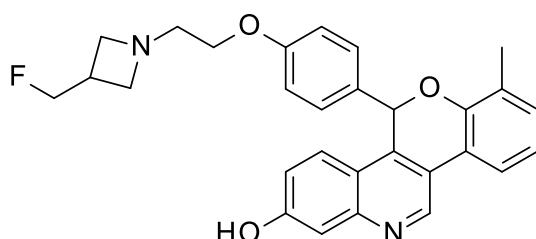
8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol;



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



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

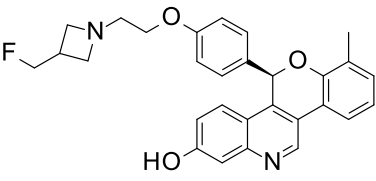
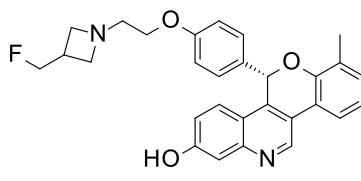


5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol.

Debido al centro quiral señalado anteriormente, cada uno de estos ejemplos específicos de los compuestos de la Fórmula I mostrada anteriormente tienen formas enantioméricas R y S (es decir, compuestos enantioméricos R de la Fórmula II y compuestos enantioméricos S de la Fórmula III) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Formas enantioméricas de los compuestos de la Fórmula I

Nombre químico	Enantiómero R (Fórmula II)	Enantiómero S (Fórmula III)
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol		

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

En la presente también se describen composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, en combinación con un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden prepararse con aditivos aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, el término "aditivos aceptables desde el punto de vista farmacéutico" 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. Los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, descritos en la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de vías, tales como oral o IV. La biodisponibilidad es a menudo un factor en el tratamiento contra el cáncer, y la capacidad de elegir métodos de administración y composiciones farmacéuticas para controlar u optimizar la biodisponibilidad de un ingrediente activo es útil. Por ejemplo, una composición de SERD biodisponible por vía oral sería particularmente útil. Se cree que los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, como se describen en la presente, tienen biodisponibilidad oral. Se pueden encontrar 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 limitativos de portadores, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico 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 de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. Por ejemplo, el método de administración de la cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico 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.

En la presente se describen también compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, para su uso en tratamiento. También se proporcionan en la presente los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, para su uso en el tratamiento contra el 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 de mama puede ser cáncer de mama ER positivo, cáncer gástrico ER positivo o cáncer de pulmón ER positivo. Por ejemplo, el compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, se puede administrar por vía oral.

Adicionalmente, los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra un tipo de cáncer. Por ejemplo, el medicamento se puede administrar 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.

Los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, y sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, pueden tener utilidad clínica como agente único o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes antineoplásicos) 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 usan en combinación con otros agentes terapéuticos (tales como agentes antineoplásicos), los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, se pueden usar de manera simultánea, secuencial o separada con otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de clases de fármacos con los que se pueden combinar los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, incluyen SERM, inhibidores de la aromatasas, inhibidores de CDK4, inhibidores de CDK6, inhibidores de PI3K e inhibidores de mTOR, para tratar el cáncer de mama receptor hormonal positivo. Los ejemplos más específicos de fármacos con los que se pueden combinar los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, incluyen abemaciclib (inhibidor de CDK4/6), everolimus (inhibidor de mTOR), alpelisib (inhibidor de PIK3CA), y 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (inhibidor de PI3K/mTOR).

Como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, que, tras la administración al paciente de la 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. Por lo general, los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos, son eficaces en un amplio rango 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 de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico 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 compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, o sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos. Los productos pueden recuperarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Las personas del oficio de nivel medio pueden acceder con facilidad a los reactivos y materiales de inicio.

Se pretende que los intermediarios y procesos útiles para la síntesis de los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente estén incluidos en esta descripción. Además, ciertos intermediarios descritos en la presente pueden contener uno o más grupos protectores. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso en virtud de las condiciones particulares de reacción y las transformaciones particulares a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son conocidas por la persona del oficio de nivel medio y se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", cuarta edición, por Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Una persona del oficio de nivel medio puede separar o resolver enantiómeros, diastereómeros e isómeros individuales en cualquier momento conveniente de la síntesis de los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describen en la presente, mediante métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véanse, por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Si bien se pueden separar o resolver enantiómeros, diastereómeros e isómeros individuales como se indicó, es posible que aún no se hayan determinado sus designaciones (R) o (S) de Cahn-Ingold-Prelog para centros quirales. Cuando las designaciones (R) o (S) de Cahn-Ingold-Prelog no están disponibles, se utilizan los identificadores "isómero 1" e "isómero 2", los cuales se combinan con el nombre IUPAC sin la designación de estereoquímica Cahn-Ingold-Prelog. Los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III que se identifican como "isómero 1" o "isómero 2" en la presente se aíslan como se define en las descripciones experimentales específicas que figuran más

adelante. Que un isómero sea un "1" o un "2" se refiere al orden en el que los compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III se eluyen de una columna de cromatografía quiral en las condiciones enumeradas, es decir, que un "isómero 1" es el que se eluye primero de la columna en las condiciones indicadas. Si la cromatografía quiral se inicia temprano en la síntesis, la misma designación se aplica a intermediarios y compuestos de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III posteriores.

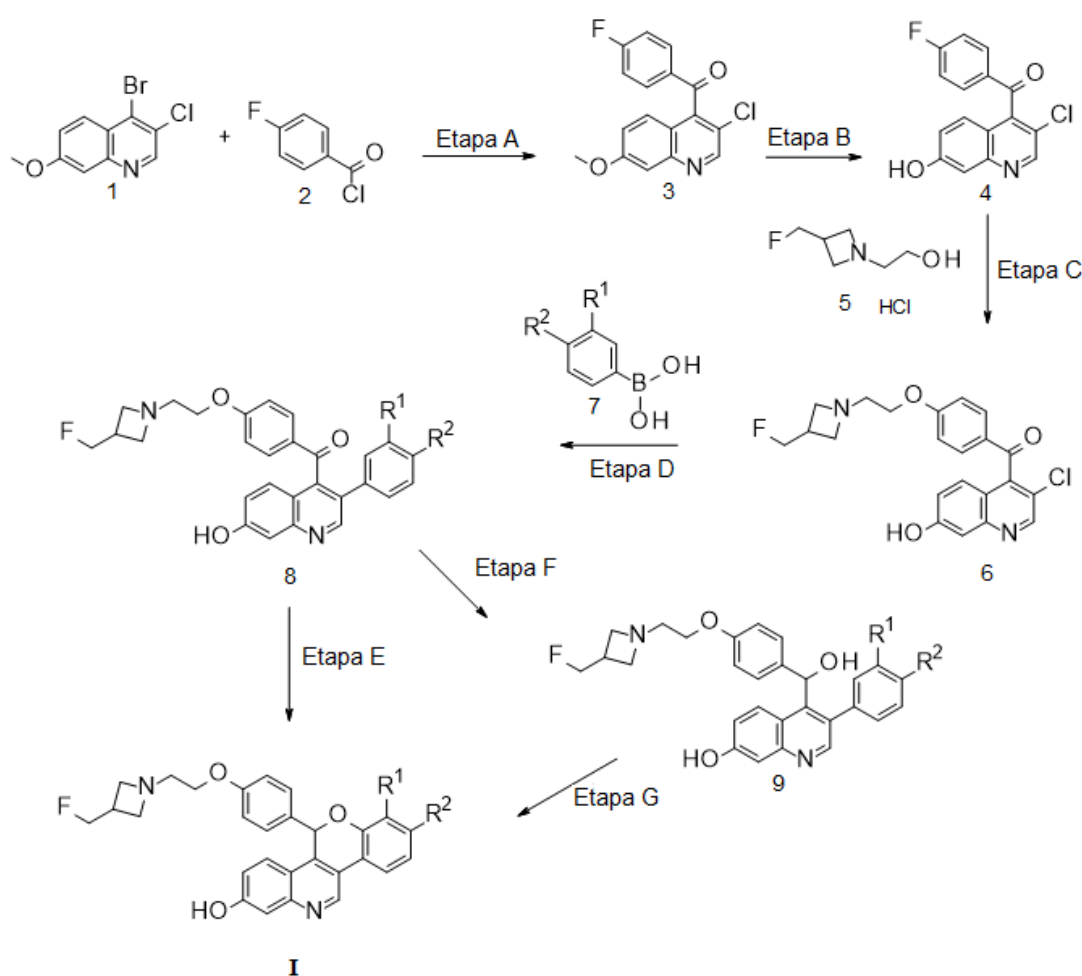
A menos que se indique específicamente, las abreviaturas utilizadas en la presente se definen de acuerdo con *Aldrichimica Acta*, vol. 17, N.º 1, 1984. Otras abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "cataCXium® A Pd G3" se refiere a metansulfonato de [(di(1-adamantil)-butilfosfin)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II); "DCM" se refiere a diclorometano o cloruro de metileno; "DMA" se refiere a dimetilacetamida; "DMEA" se refiere a dimetiletilamina; "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; "cADN" se refiere a ADN complementario; "DNasa" se refiere a desoxirribonucleasa; "DTT" se refiere a ditioneitol; "EC₅₀" se refiere a 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; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "ER α " se refiere a receptor de estrógeno alfa; "ER β " se refiere a receptor de estrógeno beta; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol o alcohol etílico; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "HBSS" se refiere a solución salina equilibrada de Hank; "HEC" se refiere a hidroxietilcelulosa; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico; "HPLC" se refiere a cromatografía de líquidos de alta resolución; "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); "IPA" se refiere a isopropilamina; "iPrOH" se refiere a isopropanol o alcohol isopropílico; "IV" se refiere a administración intravenosa; "K_i" se refiere a constante de inhibición; "MEK" se refiere a metiletilcetona; "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 de progesterona alfa; "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; "SFC" se refiere a cromatografía de fluido supercrítico; "TED₅₀" se refiere a dosis eficaz para lograr 50 % de inhibición de la diana en los tumores; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "t_(R)" se refiere a tiempo de retención; "XantPhos Pd G2" se refiere a cloro[(4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanten)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II); 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

Esquema 1



El Esquema 1 representa la síntesis de los compuestos de la Fórmula I.

En la Etapa A, se logra una reacción de Grignard. Una reacción de Grignard es conocida en la técnica como una reacción para la formación de enlaces carbono-

carbono. La reacción implica una reacción organometálica en la que un haluro de arilmagnesio, el reactivo de Grignard, se agrega a un grupo carbonilo, tal como el cloruro de ácido del compuesto **2** para obtener el compuesto de la Etapa A. Por ejemplo, una quinolona 4-cloro-sustituida, el compuesto **1**, se trata con un reactivo de Grignard, tal como cloruro de isopropilmagnesio para formar un intermediario de Grignard seguido de la adición de un cloruro de ácido, cloruro de 4-fluorobenzilo, el compuesto **2**, en un solvente, tal como THF. Al terminar, la reacción se puede inactivar con agua para obtener el compuesto **3**.

En la Etapa B, el arilmetiléter del compuesto **3** se puede desmetilar en una variedad de condiciones reconocibles por la persona del oficio de nivel medio, tal como tratamiento con tribromuro de boro. Por ejemplo, el compuesto **3** se trata lentamente con tribromuro de boro a una temperatura de alrededor de 0 °C en un solvente tal como DCM. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se inactiva con fosfato de potasio dibásico para obtener el compuesto **4**.

En la Etapa C, el éter de azetidina **6** puede formarse mediante el tratamiento de la correspondiente *p*-fluorofenil cetona **4** y la sal de alcohol de azetidina **5**, o la correspondiente base libre con una base adecuada, por ejemplo, hidruro de sodio, *t*-butóxido de sodio o *t*-butóxido de potasio, en el solvente aprótico polar apropiado, tal como DMF o THF para obtener el compuesto de éter **6**.

El compuesto **6** se alquila luego con el ácido arilborónico sustituido apropiado, el compuesto **7**, en una reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki para obtener el compuesto **8** en la Etapa D. La persona del oficio de nivel medio reconocerá que existe una variedad de condiciones que pueden ser útiles para facilitar tales reacciones de acoplamiento cruzado. Los reactivos de paladio adecuados pueden incluir XantPhos Pd G2, cataCXium® A Pd G3, cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) con triciclohexilfosfina, cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II), tetrakis(trifenilfosfina) paladio o acetato de paladio(II). Las bases adecuadas pueden incluir fluoruro de potasio, carbonato de cesio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, *t*-butóxido de litio o fosfato de potasio tribásico monohidrato. El compuesto **6**, por ejemplo, se puede hacer reaccionar con el ácido borónico apropiado, el compuesto **7**, tal como ácido 2-fluoro-4-(trifluorometil)fenilborónico en un solvente tal como 2-metil-2-butanol con una base tal como carbonato de potasio y un catalizador tal como XPhos Pd G2 y se puede calentar hasta alrededor de 80 °C en condiciones de microondas para obtener el compuesto **8**.

Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que la Etapa D, la reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki, podría completarse antes de la formación de éter de azetidina de la Etapa C.

En la Etapa E, una persona del oficio de nivel medio reconocerá que el compuesto **8** se puede ciclizar mediante la reducción inicial de la cetona. Esto se puede lograr con un agente reductor, tal como trietil borohidruro de litio en solventes tales como 1,4-dioxano y THF y a una temperatura de alrededor de 0 °C a temperatura ambiente para obtener el alcohol secundario correspondiente. Este alcohol intermediario se puede transportar en crudo y se puede desprotonar con una base adecuada tal como carbonato de cesio, hidruro de sodio, *t*-butóxido de sodio o *t*-butóxido de potasio en un solvente tal como THF, DMSO o DMF. El alcóxido resultante puede ciclizarse en el fluoruro de arilo a temperatura ambiente, con calentamiento a reflujo, o a una temperatura de alrededor de 60 °C. El éter cíclico sustituido formado tras el desplazamiento del fluoruro puede obtenerse luego para obtener los compuestos de la Fórmula I.

Alternativamente, la cetona, **8**, puede reducirse al alcohol y purificarse quiralmente en la Etapa F para obtener el alcohol quiral **9**, y luego ciclizarse en la Etapa G como se describió anteriormente para la Etapa E para obtener los compuestos de la Fórmula I.

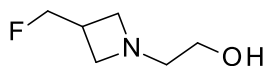
En otra reacción alternativa, la cetona puede reducirse con un reactivo quiral tal como (R)-(+)- α,α -difeníl-2-pirrolidinmetanol junto con borato de trimetilo y borano-dimetilsulfuro para obtener directamente el alcohol quiral deseado, el compuesto **9**, que luego puede ciclizarse en la Etapa G como se describió anteriormente para la Etapa E para obtener los compuestos de la Fórmula I.

En una etapa opcional, una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de un compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente puede formarse por la reacción de una base libre apropiada de un compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente con un ácido aceptable desde el punto de vista farmacéutico apropiado en un solvente 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 aceptables desde el punto de vista farmacéutico es conocida. Véanse, 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). Una persona del oficio de nivel medio apreciará que un compuesto de la Fórmula I, la Fórmula II y la Fórmula III como se describe en la presente se convierte fácilmente en, y puede aislarse como, una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de sales útiles incluyen, entre otras, sales de ácido bencensulfónico y sales de ácido 4-metilbencensulfónico. Las sales de ácido 4-metilbencensulfónico también se conocen como sales de tosilato.

Preparación 1

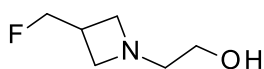
2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etan-1-ol



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 en N₂. Enfriar la reacción hasta 10-15 °C durante un período de 20 minutos, luego calentar hasta 25-30 °C y mantenerla a esta temperatura durante 2 horas. 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 secarse para obtener el compuesto del título (139 g, 82 %) como un aceite amarillo espeso. ES/MS (m/z): 134,1(M+H).

Preparación 2

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



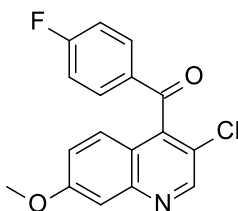
HCl

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 en N₂ durante 8 horas para obtener el compuesto del título (580 g, 86 %) como un sólido blanco. ES/MS (m/z): 134,0 (M+H).

Preparación 3

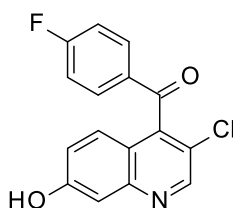
(3-cloro-7-metoxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona



Enfriar una mezcla de 4-bromo-3-cloro-7-metoxiquinolona (70 g, 254 mmol) y THF (1 l) hasta -40 °C en 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-fluorobenzilo (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 NH₄Cl (300 ml) y agua (200 ml) y separar las capas. Lavar la capa orgánica con solución saturada de NH₄Cl (300 ml), secar en MgSO₄, filtrar y concentrar para obtener un residuo oleoso. Filtrar el aceite marrón crudo a través de gel de sílice que se eluyó con una mezcla de MTBE/hexanos (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 la noche. Filtrar para recolectar los sólidos y reservar. Concentrar el filtrado y purificar en gel de sílice que se eluyó con 10-40 % de EtOAc/hexanos, luego tratar el producto con 10 % de metilacetato/heptano (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 la noche para obtener el compuesto del título (31 g, 38 %) como un sólido amarillo. ES/MS (m/z): 316,0 (M+H).

Preparación 4

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

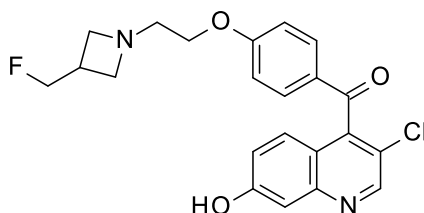


Agregar tribromuro de boro (1 M en DCM, 295 ml, 295 mmol) a una mezcla de (3-cloro-7-metoxiquinolin-4-il)-(4-fluorofenil)metanona (31 g, 98 mmol) en DCM (217

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 solventes orgánicos, filtrar, recolectar el filtrado y secar el filtrado al vacío a 45 °C durante 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 la noche para obtener el compuesto del título (32 g, rendimiento cuantitativo) como un sólido marrón claro. ES/MS (m/z): 302,0 (M+H).

Preparación 5

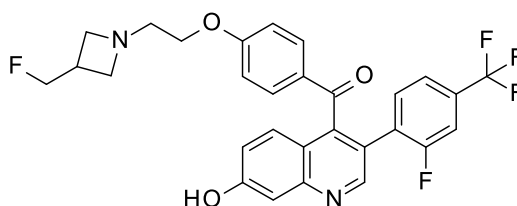
(3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanona



Agregar clorhidrato de 2-[3-(fluorometil)azetidin-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, 3,02 g, 76,8 mmol). Agitar en N₂ y calentar hasta 40 °C durante 45 minutos. Inactivar la solución con agua y concentrar. Dividir el residuo en 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 en 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 eluyó con un gradiente de 5-10 % de NH₃ 7 N en MeOH/DCM para obtener el compuesto del título (5,31 mg, 84 %) como un sólido amarillo. ES/MS (m/z): 415,0 (M+H).

Preparación 6

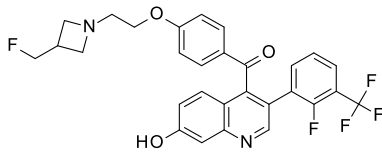
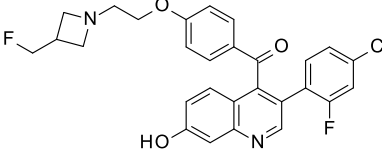
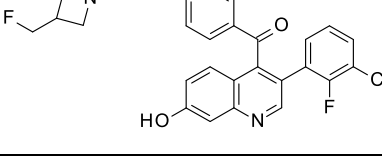
(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il}metanona



Desgasificar con N₂ (5x) una mezcla de (3-cloro-7-hidroxiquinolin-4-il)-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-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 y calentar en el microondas a 80 °C durante 2 horas. Dividir el residuo en MTBE y solución saturada de NH₄Cl. Separar las capas y extraer la capa acuosa con MTBE. Combinar los extractos orgánicos, secar en sulfato de magnesio, filtrar y concentrar el filtrado para obtener un residuo naranja. Purificar el material crudo mediante cromatografía en columna de gel de sílice que se eluyó con 5 % de MeOH/DCM para obtener el compuesto del título (205 mg, 78 %) como un sólido amarillo. ES/MS (m/z): 543,2 (M+H).

Preparar los siguientes compuestos de una manera esencialmente análoga al método de la Preparación 6, con las siguientes variaciones en el procedimiento, tiempos de calentamiento de entre 1-2 horas, extracción con MTBE o EtOAc, y secado de capas orgánicas en sulfato de magnesio o sulfato de sodio. Purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice con hasta 10 % de (MeOH o MeOH con amoníaco 7 M) en DCM (Preparación 10: gradiente de 3-8 % de MeOH con amoníaco 7 M en DCM; Preparaciones 9 y 11: gradiente de 4 a 10 % de MeOH con amoníaco 7 M en DCM) y/o mediante cromatografía de fase inversa de pH alto como se indica.

Tabla 2: Compuestos preparados de acuerdo con la Preparación 6

Prep N.º	Nombre químico	Estructura	ES/MS (m/z) (M+H)
7	(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-3-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il}metanona		543,0
8 ^a	[3-(4-cloro-2-fluorofenil)-7-hidroxiquinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanona		509,0
9 ^b	[3-(3-cloro-2-fluorofenil)-7-hidroxiquinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanona		509,0

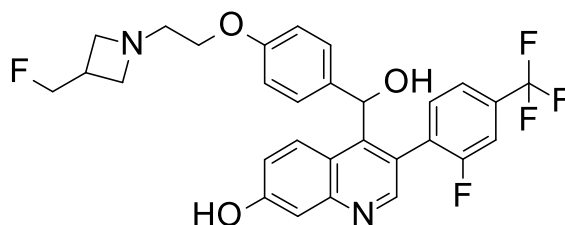
10	[3-(2,4-difluorofenil)-7-hidroxiquinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanona		493,0
11	[3-(2,3-difluorofenil)-7-hidroxiquinolin-4-il](4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)metanona		493,0
12	(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)[3-(2-fluoro-4-metilfenil)-7-hidroxiquinolin-4-il]metanona		489,2
13	(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)[3-(2-fluoro-3-metilfenil)-7-hidroxiquinolin-4-il]metanona		489,2

^aPurificar mediante cromatografía flash de fase inversa de pH alto (columna RediSep Rf GOLD® High Performance C18, que se eluyó con 35-45 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

^bDespués de la purificación en sílice, eluir con 4-10 % de MeOH con amoníaco 7 M en DCM, purificar adicionalmente mediante cromatografía flash de fase inversa de pH alto (columna RediSep Rf GOLD® High Performance C18, que se eluyó con 30-44 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

Preparación 14

4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]quinolin-7-ol racémico

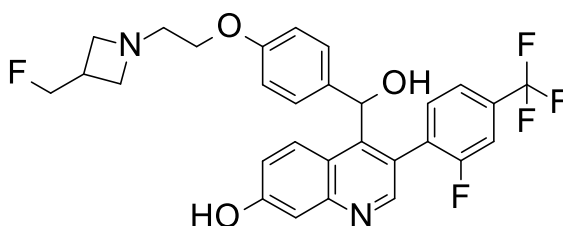


Agregar (4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil){3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il]metanona (305 g, 562,2 mmol) y THF (1,5 l) conjuntamente en N₂ y enfriar la solución hasta 0-5 °C. Agregar trietilborohidruro de litio (1 M en THF, 1,5 l, 1,5 mol) por goteo. Agitar la mezcla a 0-5 °C durante 1 hora. Agregar agua (300 ml) por goteo y NH₄Cl saturado (1 l). Calentar la mezcla hasta

temperatura ambiente. Agregar EtOAc (2 l) y recolectar la capa orgánica. Lavar la capa orgánica con salmuera (500 ml), secar en MgSO_4 , filtrar y concentrar hasta secarse. Disolver el residuo en una mezcla 95:5 de acetona y amoníaco 2 M en MeOH y se filtra a través de gel de sílice para obtener el compuesto del título (264 g, 86,2 %) como un sólido naranja. ES/MS (m/z): 545,2 ($M+H$).

Preparación 15

4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]quinolin-7-ol, Isómero 1



Purificar 4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]quinolin-7-ol racémico (354 g, 0,62 mol) mediante cromatografía quiral en las siguientes condiciones: Columna Chiralpak AD-H, 150 x 50 mm, velocidad de flujo de 300 g/minuto, UV 350 nm, fase móvil 35 % de iPrOH con 0,5 % de DMEA/ CO_2 , temperatura de columna 40 °C para obtener el compuesto del título (171,4 g, 48 %) del primer isómero que se eluye. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >98 % de ee, $t_{(R)}$ = 0,79 minutos, columna: Chiralpak AD-H de 4,6 x 150 mm, que se eluyó con una fase móvil de 35 % de iPrOH con 0,5 % de DMEA en CO_2 , velocidad de flujo de 0,6 ml/minuto, detección UV de 350 nm.

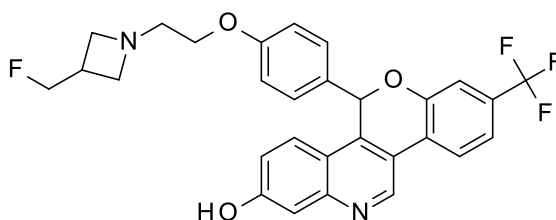
Preparación 15 alternativa

Agregar borato de trimetilo (65 mg, 0,62 mmol) a una solución de (R)-(+)- α,α -difetil-2-pirrolidinmetanol (132 mg, 0,52 mmol) en THF (20 ml). Agitar la mezcla en N_2 a temperatura ambiente durante 1 hora. Agregar borano-dimetilsulfuro (2,0 M en THF, 2,6 ml, 5,2 mmol) seguido de 4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil{3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]-7-hidroxiquinolin-4-il}metanona (1,0 g, 1,73 mmol). Calentar la reacción durante la noche a 45 °C. Agregar más borano-dimetilsulfuro (2,0 M en THF, 2,6 ml, 5,2 mmol) y agitar durante 5 horas a 45 °C. Agregar lentamente la solución saturada de NH_4Cl (25 ml) y aislar la fase orgánica. Volver a extraer el extracto acuoso con 20 % de iPrOH/ CHCl_3 . Combinar los extractos orgánicos, secar en Na_2SO_4 , filtrar y evaporar para obtener un intermediario de complejo de borano (1,2 g). Disolver un tercio del intermediario de complejo de borano (0,4 g, 0,6 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml)

y etanolamina (0,3 ml, 5 mmol) y calentar la reacción hasta 70 °C durante 3 horas. Inactivar la reacción con solución saturada de NH₄Cl (25 ml) y aislar la fase orgánica. Volver a extraer el extracto acuoso con 20 % de iPrOH/CHCl₃ (4 x 25 ml). Combinar los extractos orgánicos, secar en Na₂SO₄, filtrar, y concentrar hasta secarse para obtener el compuesto del título como un sólido naranja (0,33 g, 0,57 mmol, 100 % de rendimiento). LC/MS (m/z): [M+H]⁺ 545. Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, 96 % de ee, t_R) = 0,79 minutos, columna: Chiralpak AD-H de 4,6 × 150 mm, que se eluyó con una fase móvil de 35 % de iPrOH con 0,5 % de DMEA en CO₂, velocidad de flujo de 0,6 ml/minuto, detección UV de 350 nm.

EJEMPLO 1

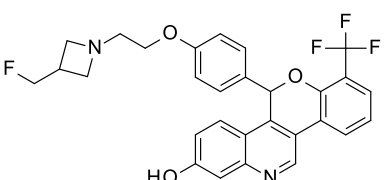
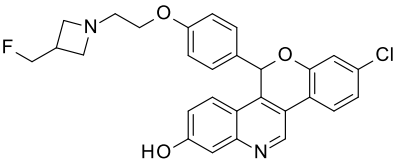
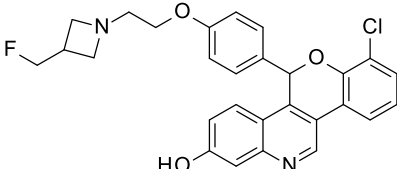
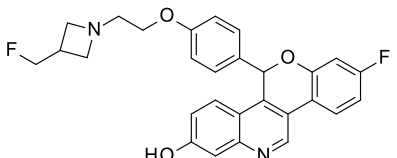
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico



Enfriar una solución de (4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-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 en 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 eluyó 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).

Preparar los siguientes compuestos de una manera esencialmente análoga al método del Ejemplo 1, con las siguientes variaciones en el procedimiento. Para la reducción, usar de 3 a 5 equivalentes de trietilborohidruro de litio con tiempos de reacción de 30 minutos a una hora y secado de las capas orgánicas en sulfato de magnesio o sulfato de sodio. Usar el residuo crudo directamente o purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice que se eluyó con un gradiente de 0-5-7,5-10 % de MeOH en DCM antes de la ciclización. Completar la ciclización mediante reflujo en THF durante hasta 16 horas, o en DMF, de 2 horas a temperatura ambiente para el Ejemplo 2, a 2 horas a 85 °C para el Ejemplo 8. Extraer con DCM o EtOAc y secar las capas orgánicas en sulfato de magnesio o sulfato de sodio. Purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice con hasta 10 % de (MeOH o MeOH con amoníaco 7 M) en DCM (Ejemplo 2: gradiente de 0-10 % de MeOH en DCM; Ejemplo 5: gradiente de 4-10 % de MeOH con amoníaco 7 M en DCM; Ejemplo 8: gradiente de 5-7,5 % de MeOH con amoníaco 7 M en DCM) o mediante HPLC de fase inversa de pH alto como se indica.

Tabla 3: Compuestos de ejemplo preparados de acuerdo con el Ejemplo 1

Ej. N.º	Nombre químico	Estructura	ES/MS (m/z) (M+H)
2	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		525,2
3 ^a	8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		491,0
4 ^b	7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		491,0
5 ^c	8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		475,0

6 ^d	7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		475,0
7 ^e	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		471,2
8	5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol racémico		471,2

^aPurificar mediante HPLC de fase inversa de pH alto (KINETEX® C18, 5 µm, columna de 30 × 250 mm, que se eluyó con 35-50 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

^bPurificar mediante HPLC de fase inversa de pH alto (KINETEX® C18, 5 µm, columna de 30 × 250 mm, que se eluyó con 35-43 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

^aDespués de la purificación en sílice que se eluyó con 4-10 % de MeOH con amoníaco 7M en DCM, purificar adicionalmente mediante HPLC de fase inversa de pH alto (KINETEX® C18, 5 µm, columna de 30 × 250 mm, que se eluyó con 30-44 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

^dPurificar mediante HPLC de fase inversa de pH alto (XBRIDGE® C18 5 µm OBD, columna de 30 × 75 mm, que se eluyó con 10-75 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

^ePurificar mediante HPLC de fase inversa de pH alto (XBRIDGE® C18 5 µm OBD, columna de 30 × 75 mm, que se eluyó con 10-60 % de ACN en bicarbonato de amonio acuoso 10 mM con 5 % de MeOH).

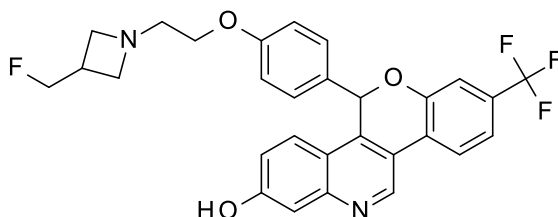
EJEMPLO 1A

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

y

EJEMPLO 1B

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



Separar los dos enantiómeros de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: LUX® Cellulose-1, 5 × 25 cm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (con 0,5 % de DMEA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 300 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 270 nm para obtener el Ejemplo 1A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 1,30 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 1B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, 98 % de ee, *t*_(R): 2,03 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

EJEMPLO 1B de preparación alternativa

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

Agitar 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, ácido 4-metilbencensulfónico, Isómero 2 (23,8 g, 0,034 mol) en agua (250 ml) a 1000 rpm. Agregar NaOH (76 µl) y agitar la solución durante 2 horas. Agregar DCM (600 ml). Separar la mezcla, secar el extracto de DCM con sulfato de magnesio, filtrar el material a través de un filtro de jeringa (0,45 µm) y concentrar hasta secarse. Dejar el material reposar en una corriente de N₂ durante un fin de semana. Agregar 1:1 EtOH/agua (80 ml) y agitar la mezcla con ultrasonido. Recolectar un sólido de color tostado mediante filtración en una membrana de nylon para obtener el compuesto del título (10,47 g, 0,02 mol, 59 %).

Difracción de rayos X de polvo (XRD)

Los patrones de XRD de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de rayos X de polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente $\text{CuK}\alpha$ y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se sometió a barrido entre 4 y 40 $2\theta^\circ$, con un tamaño de etapa de 0,008 $2\theta^\circ$ y una velocidad de barrido de 0,5 segundos/etapa, y con divergencia de 1,0 mm, antidispersión fija de 6,6 mm y ranuras de detección de 11,3 mm. El polvo seco se envasa en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa al utilizar un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de forma cristalina se recolectan a temperatura ambiente y humedad relativa. Las posiciones de los picos de cristal se determinan en MDI-Jade después de un cambio de patrón completo en función de un estándar interno NIST 675 con picos de 8,853 y 26,774 $2\theta^\circ$. En la técnica de la cristalografía se sabe que, para cualquier forma cristalina determinada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como el hábito y la morfología de los cristales. Cuando los efectos de la orientación preferida están presentes, las intensidades de los picos se alteran, pero las posiciones características de los picos del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos N.º 23, Formulario Nacional N.º 18, páginas 1843-1844, 1995. Además, en la técnica de la cristalografía se sabe también que, para cualquier forma cristalina determinada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura en la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, se presume que una variabilidad de posición de pico de $\pm 0,2\ 2\theta^\circ$ tendrá en cuenta estas potenciales variaciones sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer en función de cualquier combinación única de picos distintivos.

Caracterizar una muestra preparada de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol cristalino, Isómero 2 con un patrón de XRD mediante el uso de radiación $\text{CuK}\alpha$ que tiene picos de difracción (valores 2θ) como se describe en la Tabla 3 que figura más adelante, y en particular que tiene picos de 19,8 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 6,8, 16,0 y 22,1; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 4: Picos de difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 1B cristalino

Pico	Ángulo (°2-Zeta) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	6,8	29,40
2	15,3	8,30
3	16,0	20,10
4	17,4	7,60
5	18,1	16,00
6	19,8	100,00
7	21,1	14,60
8	22,1	28,90
9	24,9	16,40
10	25,4	21,90

EJEMPLO 1B de preparación alternativa

Disolver 4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil(hidroxi)metil]-3-[2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]quinolin-7-ol, Isómero 1 (63,05 g, 104,7 mmol) en DMSO (1,3 l) en N₂ a temperatura ambiente. Agregar en porciones carbonato de cesio (108 g, 331 mmol) durante 5 minutos. Calentar la mezcla hasta 60 °C durante 15 horas. Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y diluir con agua (2,1 l) y EtOAc (1,3 l). Agitar la mezcla durante 5 minutos y separar. Volver a extraer el material acuoso con EtOAc (1,3 l) y agitar durante 5 minutos. Separar y combinar los extractos orgánicos, lavar con salmuera, agua y EtOAc. Secar los extractos orgánicos con MgSO₄, concentrar y secar al alto vacío durante la noche a temperatura ambiente para obtener el compuesto del título como un sólido marrón (52,69 g, 95,9 %). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Ejemplo 1B mediante SFC analítica quiral, 98,1 % de ee, *t*_(R): 2,03 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

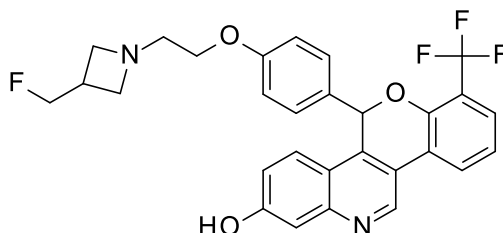
EJEMPLO 2A

5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 1

y

EJEMPLO 2B

5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2



Separar los dos enantiómeros de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALPAK® IC, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 70 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm para obtener el Ejemplo 2A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 525,1 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 1,56 minutos; columna: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 2B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 525,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, 98 % de ee, *t*_(R): 2,33 minutos; columna: CHIRALPAK® IC, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

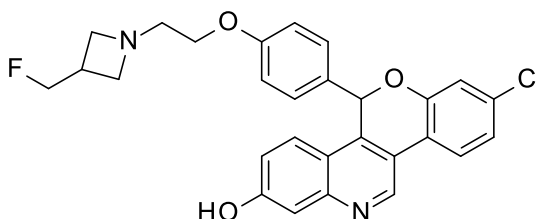
EJEMPLO 3A

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

y

EJEMPLO 3B

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



Separar los dos enantiómeros de 8-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-

il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 80 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm para obtener el Ejemplo 3A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 1,55 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 3B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 2,26 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

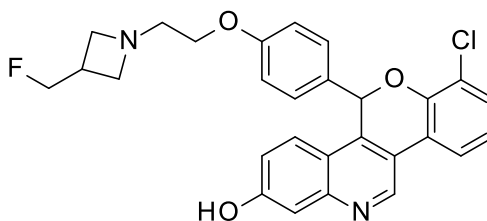
EJEMPLO 4A

7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 1

y

EJEMPLO 4B

7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2



Separar los dos enantiómeros de 7-cloro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 80 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm para obtener el Ejemplo 4A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico

del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 1,71 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 4B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 491,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 2,38 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

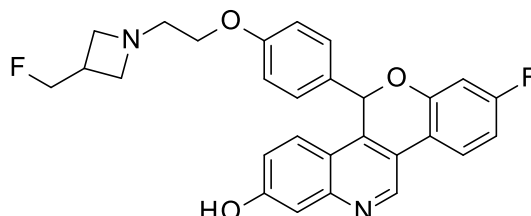
EJEMPLO 5A

8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 1

y

EJEMPLO 5B

8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2



Separar los dos enantiómeros de 8-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 80 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm para obtener el Ejemplo 5A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 1,56 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 5B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero

2 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 2,29 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

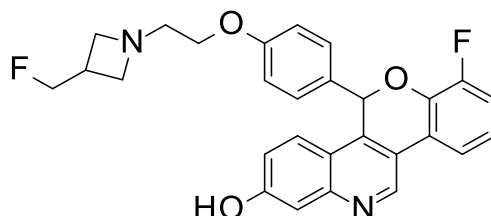
EJEMPLO 6A

7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 1

y

EJEMPLO 6B

7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2



Separar los dos enantiómeros de 7-fluoro-5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 80 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm para obtener el Ejemplo 6A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 1,32 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 6B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 475,0 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, $t_{(R)}$: 1,95 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 35 % de MeOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

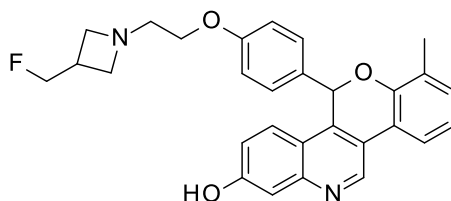
EJEMPLO 8A

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

y

EJEMPLO 8B

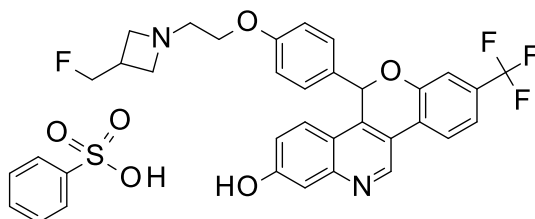
5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2



Separar los dos enantiómeros de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-7-metil-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol mediante SFC quiral con las siguientes condiciones: Columna: CHIRALCEL® OD-H, 21 × 250 cm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (con 0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 80 g/minuto; longitud de onda de detección UV: 265 nm para obtener el Ejemplo 8A como el enantiómero que se eluyó en primer lugar (Isómero 1). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 1 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 1,47 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm. Aislar el compuesto del título del Ejemplo 8B para obtener el enantiómero que se eluyó en segundo lugar (Isómero 2). ES/MS (m/z): 471,2 (M+H). Confirmar el enriquecimiento enantiomérico del Isómero 2 mediante SFC analítica quiral, >99 % de ee, *t*_(R): 2,05 minutos; columna: CHIRALCEL® OD-H, 4,6 × 150 mm; que se eluyó con una fase móvil de 30 % de iPrOH (0,2 % de IPA) en CO₂; temperatura de columna: 40 °C; velocidad de flujo: 5 ml/minuto; longitud de onda de detección UV: 225 nm.

EJEMPLO 9

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



Calentar una suspensión de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2 (Ejemplo 1B) (100 mg, 0,19 mmol) en ACN (3 ml) a 50 °C. Agregar una solución de ácido bencensulfónico monohidrato (40 mg, 0,23 mmol) en ACN (1 ml). Calentar la solución amarilla transparente durante 10 minutos a 50 °C. Detener el calentamiento, dejar que la mezcla de reacción se enfríe hasta temperatura ambiente, y agitar la mezcla durante la noche. Agregar tolueno (2 ml) y agitar la mezcla de reacción durante 2 horas. Filtrar la solución, recolectar el sólido resultante y lavar el sólido con ACN (1 ml). Secar el sólido al vacío para obtener el compuesto del título (74 mg, 55 %).

EJEMPLO 9 de preparación alternativa

Calentar una suspensión de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2 (Ejemplo 1B) (124,1 mg, 0,24 mmol) en MEK (4 ml) a 50 °C. Agregar una solución de ácido bencensulfónico monohidrato (50 mg, 0,28 mmol) disuelto en MEK (1 ml). Detener el calentamiento, dejar que la mezcla de reacción se enfríe hasta temperatura ambiente, y agitar la mezcla durante un fin de semana. Concentrar en una corriente de N₂. Agregar MEK (1 ml) y suspender para obtener un sólido cristalino amarillo. Recolectar el sólido, lavar con MEK, y secar al vacío a temperatura ambiente para obtener el compuesto del título (78,8 mg, 48%).

XRD, Ejemplo 9

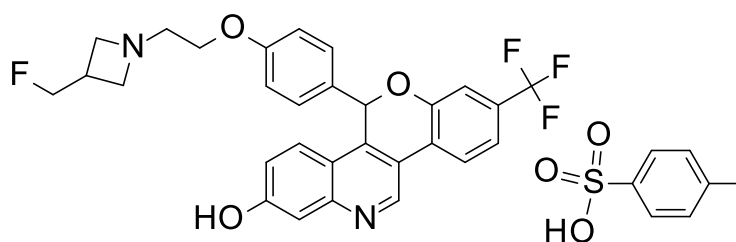
Completar XRD como se describe para el Ejemplo 1B. Caracterizar una muestra preparada de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2, ácido bencensulfónico con un patrón de XRD mediante el uso de radiación CuKα que tiene picos de difracción (valores 2-θ) como se describe en la Tabla 4 que figura más adelante, y en particular que tiene picos de 20,5 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 12,3, 22,2 y 23,1; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 5: Picos de difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 9 cristalino

Pico	Ángulo (°2-Zeta) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	7,6	27,10
2	10,6	34,50
3	12,3	42,10
4	12,6	32,30
5	17,7	32,80
6	19,2	26,70
7	20,5	100,00
8	22,2	45,50
9	23,1	36,30
10	24,2	29,80

EJEMPLO 10

5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol cristalino, ácido 4-metilbencensulfónico, Isómero 2



Agregar en conjunto 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidín-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, Isómero 2 (Ejemplo 1B) (204,2 g, 389 mmol) y EtOAc (5 l), agitar a 60 °C y luego agregar MeOH (200 ml) a 60 °C para obtener una solución marrón transparente. Agregar el producto del título (11,48 g) para sembrar la solución, luego agregar una solución premezclada de ácido 4-metilbencensulfónico; hidratar (81,4 g, 428 mmol) en EtOAc (800 ml) para obtener una suspensión amarilla. Agitar la suspensión durante 30 minutos a 50 °C. Concentrar la suspensión hasta ½ volumen. Enfriar la solución a temperatura ambiente durante 1 hora, filtrar, recolectar el sólido y lavar el sólido con EtOAc. Secar el sólido al vacío a 30 °C durante un fin de semana para obtener el compuesto del título (239 g, 343 mmol). Para purificar más el material, agregar el compuesto del título (229 g, 328,7 mmol) y 2-propanol (4,6 L) en conjunto y calentar hasta 60 °C durante 2 horas. Enfriar hasta temperatura ambiente durante 30 minutos. Filtrar el sólido y lavar con iPrOH (100 ml). Secar el sólido en una corriente de N₂ durante la noche para obtener el compuesto del título (174,4 g, 76,2 %). Combinar diversos lotes del compuesto del título preparado esencialmente de la misma manera y agregar heptano (2 l). Agitar la

suspensión durante 30 minutos, filtrar el sólido y lavar con heptano (300 ml). Secar el sólido recolectado en una corriente de N₂ durante la noche para obtener el compuesto del título (199,7 g, 99,5 %).

XRD, Ejemplo 10

Completar la XRD como se describe para el Ejemplo 1B. Una muestra preparada de 5-(4-{2-[3-(fluorometil)azetidin-1-il]etoxi}fenil)-8-(trifluorometil)-5H-[1]benzopirano[4,3-c]quinolin-2-ol, ácido 4-metilbencensulfónico, Isómero 2 (Ejemplo 10) se caracteriza por un patrón de XRD mediante el uso de radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2-zeta) como se describe en la Tabla 5 que figura más adelante, y en particular que tiene picos de 20,1 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 12,8, 19,5 y 22,8; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 6: Picos de difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 10 cristalino

Pico	Ángulo (°2-Zeta) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	7,6	25,70
2	12,4	27,90
3	12,8	36,80
4	18,9	26,50
5	19,5	56,90
6	20,1	100,00
7	20,9	41,50
8	21,8	40,90
9	22,8	39,40
10	25,4	29,70

Ensayos biológicos

La evidencia de una relación entre la expresión de ER y ciertos tipos de cáncer se conoce en la técnica.

Los resultados de los siguientes ensayos demuestran que los compuestos de la Fórmula I, Fórmula II y Fórmula III de los ejemplos son SERD activos y están concebidos para ser útiles en el tratamiento contra el cáncer.

Ensayo de fijación competitiva a ER α (tipo silvestre), ER α (mutante Y537S) y ER β

El fin de los siguientes ensayos de fijación competitiva a ER es determinar la afinidad de un compuesto de prueba contra ER α (tipo silvestre), ER α (mutante Y537S) y ER β .

Ejecutar el ensayo de fijación competitiva en un amortiguador 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 cavidad de ³H-estradiol

(118 Ci/mmol, 1 mCi/ml), 7,2 ng/cavidad de ER α (tipo silvestre), o 7,2 ng/cavidad de ER α (mutante Y537S) o 7,7 ng/cavidad de receptor ER β . 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 cavidades (Costar) y agregar fluido de centelleo Perkin Elmer Optiphase Supermix (175 μ l) a cada cavidad. 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 los Ejemplos 1, 1A y 1B (y otros) se fijan a ER α recombinante de tipo silvestre y ER α mutante (Y537S) como se muestra en la Tabla 7 a continuación, y también se determinó que el Ejemplo 1B se fija a ER β con una K_i (nM) competitiva a ER β de 0,11 $\pm$ 0,07, n=3.

Tabla 7: Resultados de fijación competitiva a ER α (tipo silvestre), ER α (mutante Y537S) y ER β

Ejemplo N.º	K _i (nM) a ER α (tipo silvestre)	K _i (nM) a ER α (mutante Y537S)
1	0,87	5,80
1A	12,45 $\pm$ 9,32, n=3	57,18 $\pm$ 39,13, n=3
1B	0,31 $\pm$ 0,38, n=5	2,79 $\pm$ 3,00, n=5
2	2,17	6,78
2A	0,65	7,92
2B	60,4	293,6
3	2,36	6,69
3A	8,11	27,23
3B	0,59	2,79
4	0,64	12,11
4A	16,78	54,97
4B	0,34	2,34
5	2,82	19,47
5A	12,54	81,15
5B	1,30	6,56
6	4,14	15,77
6A	8,53	45,99
6B	1,13	5,71
7	1,55	8,55
8	3,20	11,4
8A	9,33	66,94
8B	0,94	5,44

De los compuestos ejemplificados evaluados, la K_i para ER α de tipo silvestre osciló de alrededor de 0,300 nM a alrededor de 65 nM. La K_i para el ER α mutante Y537S osciló de alrededor de 2 nM a 300 nM. Los resultados de este ensayo demuestran la afinidad y potencia de fijación de los compuestos ejemplificados contra proteínas de ER α de tipo silvestre, mutantes (ESR1 Y537S) y de ER β .

Ensayo de degradación de ER α en células MCF7

El fin 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 cavidades a una densidad de 4.000 células por cavidad en medio DMEM libre de rojo de fenol (20 μ l) que contiene FBS al 10 % despojado de carbón. Incubar las células durante 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 rango 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 rango 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/cavidad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar 1:500 de dilución de anticuerpo primario (20 μ l) (anticuerpo monoclonal contra ER α de conejo (Clon SP1) N.º RM-9101-S, Thermo Scientific) en BSA al 1 % en PBS que contenga TWEEN® 20 al 0,05 % por cavidad, sellar las placas e incubar durante 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 µl/cavidad) (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 µl), agregar RNasa (Sigma) (20 µl de 50 µg/ml) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por cavidad (20 µl). 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 ERα. El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células ER positivas mediante la media de 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 ER positivas. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado con GENE DATA™. Los resultados de este ensayo demuestran una potente degradación de ERα inducida por los compuestos de la Fórmula I, Fórmula II y Fórmula III como se describen en la presente en células de cáncer de mama MCF7. Los valores de IC₅₀ relativa para los Ejemplos 1, 1A y 1B se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Ensayo de degradación de ERα en células MCF7

Ejemplo N.º	IC₅₀ relativa (µM)
1	0,003405 + 0,001086, n=3
1A	0,3940 + 0,1941, n=4
1B	0,003088 + 0,001523, n=19
2	0,05220 + 0,006508, n=2
2A	0,05125 + 0,01626, n=2
2B	>2
3	0,03347 + 0,007830, n=3
3A	0,3905
3B	0,008664
4	0,02241 + 0,0003553, n=3
4A	0,4998
4B	0,006892
5	0,03653 + 0,03738, n=2
5A	0,5221
5B	0,009493 + 0,001103, n=2
6	0,05086 + 0,006889, n=3
6A	0,1753
6B	0,009132
7	0,07879 + 0,007379, n=2
8	0,01738 + 0,008752, n=2
8A	0,2341
8B	0,009617 + 0,005198, n=2
10	0,004216 + 0,001619, n=5

Específicamente, los resultados en la Tabla 7 muestran una potente degradación de ER α por parte del compuesto del Ejemplo 1 en células de cáncer de mama MCF7. De los compuestos ejemplificados evaluados, la IC₅₀ relativa osciló de 0,003 a >2 μ M, lo que indica que todos, a excepción del Ejemplo 2B, mostraron actividad a la concentración evaluada. 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.

Ensayo de inducción de PR α en células MCF7

El fin 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 cavidades a una densidad de 4.000 células por cavidad en 20 μ l de volumen en medio DMEM libre de rojo de fenol que contiene FBS al 10 % (despojado de carbón). Incubar las células durante 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 rango 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 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 dos veces con PBS (20 μ l) 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 μ l/cavidad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar 1:500 de dilución de anticuerpo primario (20 μ l) (anticuerpo monoclonal anti-PR humano de ratón, clon PgR

636 Dako, M3569) en 1 % de BSA/PBS con TWEEN® 20 al 0,05 por cavidad, sellar las placas e incubar durante 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/cavidad) (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 cavidad. 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 PRα. El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células PR positivas mediante la media de 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 PR positivas. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado con GENE DATA™. Los resultados de este ensayo no demuestran una actividad agonista significativa de los Ejemplos 1, 1A y 1B en células de cáncer de mama MCF7. Para los compuestos evaluados, las IC₅₀ relativas en este ensayo son > 2 µM. Los resultados de este ensayo no demuestran una actividad agonista significativa de los compuestos ejemplificados en células de cáncer de mama MCF7. Estos resultados también demuestran que los compuestos ejemplificados evaluados son antagonistas de ERα en células de cáncer de mama MCF7 (es decir, tienen actividad de SERD).

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

El fin 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 ERα. PRα es una diana transcripcional corriente abajo de ERα y, por lo tanto, se espera que un antagonista de ERα inhiba la expresión de PRα.

Cultivar MCF7-ESR1 Y537N-682 (generadas por la edición génica CRISPR/Cas9 del gen ESR1 en células MCF7, clon N.º 682) en medio DMEM complementado con FBS al 10 % 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 cavidades a una densidad de 4.000 células por cavidad en FBS al 10 %

en medio DMEM libre de rojo de fenol (20 μ l de volumen) (despojado de carbón). Incubar las células durante 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 rango 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 rango 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 14 % (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 PBS (2 x 20 μ l), TWEEN® 20 al 0,05 %, y bloquear con TWEEN® 20 al 0,05 % en 3 % de BSA/PBS y TRITON™ X-100 al 0,1 % (20 μ l/cavidad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agregar 1:500 de dilución de anticuerpo primario (20 μ l) (anticuerpo monoclonal anti-PR humano de ratón, clon PgR 636 Dako, M3569) en 1 % de BSA/PBS con TWEEN® 20 al 0,05 por cavidad, sellar las placas e incubar durante 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/cavidad) (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 cavidad. 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 PR α . El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células PR positivas mediante la media de 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 PR positivas. Determinar la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para cada resultado con GENE DATA™.

Los resultados de este ensayo demuestran una potente inhibición de PR α y el antagonismo funcional de los Ejemplos 1, 1A y 1B en células de cáncer de mama MCF7 (ESR1 Y537N, mutante heterocigota). Las IC₅₀ relativas de los Ejemplos 1, 1A y 1B (y otros) en este ensayo se muestran en la Tabla 9 a continuación. Las IC₅₀ relativas de los compuestos ejemplificados evaluados oscilan de alrededor de 0,0118 a > 1,6 μ M, lo que indica que los compuestos ejemplificados son antagonistas potentes de ER α mutante (Y537N) e inhibidores potentes de la transcripción mediada por ER α , a excepción del Ejemplo 2B (1,6 μ M). 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 .

Tabla 9: Ensayo celular de inhibición de PR α (antagonismo funcional de ER α) en células MCF7 Y537N 682 CRISPR

Ejemplo N.º	IC₅₀ relativa (μM)
1	0,01679 $\pm$ 0,00003, n=2
1A	1,20 $\pm$ 0,29, n=2
1B	0,0130 $\pm$ 0,0059, n=14
2	0,01451 $\pm$ 0,002619, n=2
2A	0,02494 $\pm$ 0,007386, n=3
2B	1,639 $\pm$ 0,2228, n=3
3	0,07717 $\pm$ 0,01154, n =2
3A	0,6117
3B	0,016
4	0,03854 $\pm$ 0,003865, n=2
4A	0,5052
4B	0,01181
5	0,06614 $\pm$ 0,01551, n=2
5A	0,3945
5B	0,01822 $\pm$ 0,009815, n=2
6	0,06319 $\pm$ 0,01609, n=2
6A	0,2364
6B	0,0136
7	0,1271
8	0,04124 $\pm$ 0,006572, n=2
8A	0,4335 $\pm$ 0,1946, n=3
8B	0,008926 $\pm$ 0,003828, n=3
10	0,007936 $\pm$ 0,003163, n=3

Ensayo celular de inhibición de PR α (antagonismo funcional de ER α) en células MCF7

El fin del siguiente ensayo celular de inhibición de PR α (antagonismo funcional de ER α) es determinar la actividad antagonista de un compuesto de prueba contra el receptor ER α . Se espera que un antagonista en este ensayo bloquee la función del

receptor ER α . PR α es una diana transcripcional corriente abajo de ER α y, por lo tanto, se espera que un antagonista de ER α inhiba la expresión de PR α .

Llevar a cabo las condiciones del ensayo como se detalla en el ensayo Acumen a base de células de degradación de ER α 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 cavidades, excepto las cavidades 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 PR α 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 PR α . El análisis de imágenes es en función de las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Identificar las células PR α positivas mediante la media de intensidad. 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 con GENE DATA™. Los resultados de este ensayo demuestran una potente inhibición de PR α y el antagonismo funcional de los Ejemplos 1, 1A y 1B en células de cáncer de mama MCF7. La IC₅₀ relativa de los Ejemplos 1, 1A y 1B en este ensayo se muestra en la Tabla 10 a continuación. La IC₅₀ relativa de los compuestos ejemplificados oscilan de alrededor de 0,029 a > 2 μ M, lo que indica que todos los compuestos ejemplificados evaluados, a excepción de los Ejemplos 1A y 2B, son potentes antagonistas de la proteína ER α de tipo silvestre y un potente inhibidor 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 de PR α mediada por ER α a la concentración evaluada.

Tabla 10: Ensayo celular de inhibición de PR α (antagonismo funcional de ER α) en células MCF7

Ejemplo N.º	IC₅₀ relativa (μM)
1	0,1283 $\pm$ 0,0226, n=3
1A	>2,000
1B	0,04129 $\pm$ 0,03370, n=16
2	0,1634
2A	0,1215 $\pm$ 0,05368, n=2
2B	>2,000
3	0,07666 $\pm$ 0,02101, n=3
3A	0,9274
3B	0,03435
4	0,07626 $\pm$ 0,1676, n=3
4A	0,8465
4B	0,02866
5	0,1180 $\pm$ 0,01230, n=2
5A	0,6002
5B	0,03203 $\pm$ 0,005306, n=2
6	0,08258 $\pm$ 0,005682, n=3
6A	0,2528
6B	0,02835
7	0,1134 $\pm$ 0,02087, n=2
8	0,06835 $\pm$ 0,02273, n=2
8A	0,2058
8B	0,04848 $\pm$ 0,02944, n=2
10	0,02633 $\pm$ 0,004459, n=3

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

Por lo general, el fin de los siguientes ensayos de proliferación celular es detectar si un compuesto de prueba tiene efectos sobre la proliferación celular.

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 cavidades de fondo transparente. Colocar en placas MCF7-ESRY537N -682 (generadas por la edición génica CRISPR/Cas9 del gen ESR1 en células MCF7, clon N.º 682) en medio DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos de 1 % de penicilina/estreptomicina a una densidad de 1000 células por cavidad. 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 rango 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 EtOH frío al 96 % (65 μ l) a cada cavidad. Después de 30 minutos, remover el medio y agregar RNasa (20 μ l de 50 μ g/ml) (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por cavidad. 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 se puede evaluar 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 rango 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 con GENE DATA™. La IC₅₀ relativa de los Ejemplos 1, 1A, y 1B (y otros) en células MCF7 ESR1 de tipo silvestre y MCF7-ESR1 Y537N mutante se muestran en la Tabla 10 a continuación. Los resultados de este ensayo demuestran una potente actividad antiproliferativa y la inhibición del crecimiento celular mediante los Ejemplos 1, 1A y 1B (y otros) en células de cáncer de mama MCF7 (ESR1 de tipo silvestre) y MCF7 (mutante ESR1 Y537N). La IC₅₀ relativa de los compuestos ejemplificados oscila de alrededor de 0,0035 a 1,176 μ M en células de cáncer de mama MCF7 ESR1 de tipo silvestre y de 0,014 a 1,86 μ M en células de cáncer de mama MCF7 (mutante ESR1 Y537N), lo que indica que todos los compuestos ejemplificados evaluados demuestran una potente actividad antiproliferativa e inhibición del crecimiento celular en células de cáncer de mama MCF7 (ESR1 de tipo silvestre) y MCF7 (mutante ESR1 Y537N).

Tabla 11: Ensayo de proliferación celular en MCF7 y MCF7-ESR1Y537N-682

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

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

El fin de este ensayo de IVTI es medir la capacidad de un compuesto de prueba (SERD) para inhibir la expresión del gen PRα (transcripción) corriente abajo de ERα en tumores de xenoinjerto implantados en ratones.

Implantar ratones NOD SCID hembra (22-25 g) de Envigo RMS, Inc., Madison, Wisconsin con 5×10^6 de células de cáncer de mama MCF7 ER positivas (ATCC, N.º HTB-22) por vía subcutánea en la región del flanco derecho en solución 1:1 de HBSS + MATRIGEL™ (200 µl). Implantar un pélet de 17-β estradiol (0,18 mg/pélet, 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 animales con el compuesto de prueba en dosis múltiples en un vehículo específico del compuesto de prueba (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 cavidades. Determinar las exposiciones del compuesto de prueba mediante espectrometría de masas.

Pulverizar los tumores en nitrógeno líquido y lisar en amortiguador de lisis de ARN 1 x (de kits de aislamiento de ARN) mediante el uso de microesferas Matrix D (MP Biomedical, N.º 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 con el mini kit de ARN PURELINK® (Invitrogen N.º 12183018A) o el mini kit RNeasy (Qiagen N.º 74104 y N.º 74106). Eliminar los contaminantes de ADN con el conjunto de DNasa PURELINK® (Invitrogen N.º 12185010) o el conjunto de DNasa libre de RNasa (Qiagen N.º 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 cADN a partir de ARN diluido mediante el sistema de síntesis de la primera cadena para RT-PCR (Invitrogen, N.º 18080-051). Para realizar la RT-qPCR, primero diluir el cADN en agua libre de RNasa. Combinar la mezcla Absolute Blue qPCR ROX 2× (Thermo, N.º AB-4139/A), el cebador de PGR (Thermo, Hs01556702_m1) y cADN diluido para cada reacción en una placa de PCR (Applied Biosystems, N.º 4309849). Ampliar el cADN 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) con Excel y XL Fit.

Los resultados de este ensayo demuestran que el Ejemplo 1B inhibe la expresión de PR α (PGR) en el modelo de xenoinjerto tumoral. El Ejemplo 1B inhibe la expresión de PR α (PGR) en ~78 % 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 de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de tumores de xenoinjerto de cáncer de mama ER positivo (ESR1 de tipo silvestre) implantados en ratones

El fin 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 N.º HTB-22) y HCC1428 (ATCC N.º CRL-2327) 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 NOD SCID hembra (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Veinticuatro horas antes de la implantación de las células, implantar pelets de estrógeno (0,18 mg/pélet, 17 β estradiol, liberación de 90 días, Innovative Research) por vía subcutánea. Expandir las células de cáncer de mama humano T47D (ATCC N.º 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 NOD SCID hembra (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Veinticuatro horas antes de la implantación de las células, implantar pelets de estrógeno (0,38 mg/pélet, 17 β estradiol, liberación de 90 días, Innovative Research) por vía subcutánea. Expandir las células de cáncer de mama humano ZR-75-1 (ATCC N.º CRL-1500) 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 NOD SCID hembra (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Veinticuatro horas antes de la implantación de las células, a los animales se les administran 50 μ l de valerato de estradiol (Delestrogen®) por inyección intramuscular (10 mg/ml), y luego una vez cada 14 días durante la duración del estudio. 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, Ejemplo 1B en un vehículo apropiado (hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al 0,05 % en agua purificada) y administrar por gavaje oral durante 28 días, QD. 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.

Se descubrió que el compuesto del Ejemplo 1B tiene los valores de % de delta T/C que se proporcionan en la Tabla 12 a continuación. Estos resultados indican que el compuesto del Ejemplo 1B demuestra una buena biodisponibilidad oral en ratones y una actividad antitumoral significativa o regresiones tumorales en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama humano ER positivo (ESR1 de tipo silvestre).

Tabla 12: Estudio de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de tumores de xenoinjerto de cáncer de mama ER positivo implantados en ratones

Modelo de tumor	Dosis (mg/kg)	% de delta T/C o % de regresión	valor p
MCF7 (xenoinjerto de cáncer de mama)	3	-26	0,001*
	10	-46	<0,001*
	30	-36	<0,001*
T47D (xenoinjerto de cáncer de mama)	3	30	0,008*
	10	-11	<0,001*
	30	-28	<0,001*
ZR-75-1 (xenoinjerto de cáncer de mama)	3	4	<0,001*
	10	0	<0,001*
	30	19	<0,001*
HCC1428 (xenoinjerto de cáncer de mama)	10	-45	<0,001*
	30	-22	<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 $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$, 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 $100 \times (T - T_0) / T_0$, 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.

Estudio de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en modelo de tumor PDX de cáncer de mama ESR1 mutante (Y537S) (ST941/HI) implantado en ratones

El fin 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 en un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) de cáncer de mama ESR1 mutante e independiente de la hormona (HI).

El modelo ST941/HI PDX se derivó y se ejecutó en South Texas Accelerated Research Therapeutics (San Antonio, TX). Los fragmentos tumorales se recolectaron de animales huésped y se implantaron en ratones inmunodeficientes (The Jackson Laboratory), y el estudio comenzó en una media de volumen tumoral de aproximadamente 125-250 mm³. Preparar el compuesto de prueba, Ejemplo 1B en un vehículo apropiado (hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al 0,05 % en agua purificada) y administrar por gavaje oral durante 28 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.

Se descubrió que el compuesto del Ejemplo 1B tiene los valores de % de delta T/C que se proporcionan en la Tabla 13 a continuación. Estos resultados indican que el compuesto del Ejemplo 1B demuestra una buena biodisponibilidad oral en ratones y una actividad antitumoral significativa o regresiones tumorales en un modelo PDX de cáncer de mama humano ESR1 mutante (Y537S).

Tabla 13: Estudio de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en modelo de tumor PDX de cáncer de mama ESR1 mutante implantado en ratones

Modelo de tumor	Dosis (mg/kg)	Cronograma	% de delta T/C o % de regresión	valor p
ST941C/HI (modelo PDX de cáncer de mama ESR1 mutante)	3	QD	66	0,213
	10	QD	15	<0,001*
	30	QD	6	<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 $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$, 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 $100 \times (T - T_0) / T_0$, 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.

Estudios combinados

Debido a la heterogeneidad tumoral y la resistencia adquirida a los tratamientos endocrinos, el tratamiento conjunto se ha vuelto esencial en el tratamiento del cáncer de mama avanzado/metastásico ER positivo para un tratamiento eficaz o para superar la resistencia adquirida. Se ha evaluado el efecto combinado del Ejemplo 1B con abemaciclib inhibidor de CDK4/6, everolimus inhibidor de mTOR, alpelisib inhibidor de PIK3CA y 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona ("Compuesto A") inhibidor de PI3K/mTOR en cinco líneas celulares de cáncer de mama ER positivo *in vitro*.

Ensayo de viabilidad celular para estudios combinados

Sembrar células a la densidad mostrada en la Tabla 14 a continuación en 20 μ l de volumen del medio descrito en la tabla en una placa de cultivo celular de 384 cavidades de fondo transparente.

Tabla 14: Información de la línea celular del ensayo de viabilidad celular

Línea celular	Densidad de siembra	Referencia comercial	Medio de cultivo	Tiempo de fijación (horas)
T-47D	1000	ATCC HTB-133	RMPI al 10 %, FBS al 1 % P/S, 0,008 mg/ml de insulina bovina	72
MCF-7	1000	ATCC HTB-22	DMEM al 10 %, FBS al 1 % P/S, 0,01 mg/ml de insulina humana	96
EFM-19	3000	ACC 231	RMPI al 10 %, FBS al 1 % P/S	144
ZR-75-1	1000	ATCC CRL-1500	RMPI al 10 %, FBS al 1 % P/S	144
BT-474	1000	ATCC HTB-20	HYBRI-CARE (1 l de H ₂ O, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, FBS al 10 %, P/S al 1 %)	144
ZR-75-30	1000	ATCC CRL-1504	RMPI al 10 %, FBS al 1 % P/S	240

Incubar las placas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente dosificar las células

con el compuesto de prueba, Ejemplo 1B.

Preparar los compuestos como soluciones de reserva de DMSO 10 mM y usarlos para un estudio de respuesta a la dosis con una concentración máxima a partir de 10 o 1 μ M, dos compuestos evaluados juntos en una relación fija, y luego diluciones en serie 1:3 preparadas, así como compuestos solos para la determinación de la IC₅₀ con una concentración inicial de 20 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 rango de dosis de concentración del compuesto de prueba final que oscila entre 20 y 0,001 μ M para un tratamiento único o un rango más bajo para las combinaciones. Para el punto máximo, usar medios que contengan DMSO al 0,2 % y, para el punto mínimo, usar estaurosporina diluida 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. Después de dos veces de incubación con los compuestos, retirar las placas de la incubadora y agregar EtOH frío al 96 % (65 μ l) a cada cavidad. Después de 30 minutos, remover el medio y agregar RNasa (20 μ l de 50 μ g/ml) (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS por cavidad. Sellar las placas e incubar 1 hora a temperatura ambiente (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]. A medida que algunas líneas celulares crecen formando agregados, es posible que no pueda usarse como lectura la cantidad de células como cantidad de objetos; por lo tanto, la población total de células (un rango designado de intensidad pico de FL-1 (PI)) o la intensidad total de PI se usan para evaluar la cantidad de células.

Los datos de combinación *in vitro* sugieren una sinergia (como se define a continuación) con la combinación del Ejemplo 1B con abemaciclib o everolimus en 5 de las 5 líneas celulares de cáncer de mama ER positivo como se muestra en la Tabla 15. Combinación del Ejemplo 1B con el Compuesto A sinérgico en 4 de las 4 líneas celulares de cáncer de mama ER positivo evaluadas. El efecto combinado del Ejemplo 1B con alpelisib es aditivo en 2 de las 4 líneas celulares de cáncer de mama ER positivo y sinérgico en 2 de las 4 líneas celulares de cáncer de mama ER positivo.

Tabla 15: Combinación *in vitro* del Ejemplo 1B con otros agentes diana en líneas celulares de cáncer de mama ER positivo

Línea celular de cáncer de mama	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Índice de combinación (CI50)	Interpretación estadística	Interpretación biológica
MCF7	Ejemplo 1B	Abemaciclib	0,2675	Sinérgica	Aditiva
		Everolimus	0,0389	Sinérgica	Sinérgica
T47D	Ejemplo 1B	Abemaciclib	0,2693	Sinérgica	Sinérgica
		Everolimus	0,0609	Sinérgica	Sinérgica
		alpelisib	0,0818	Sinérgica	Sinérgica
		Compuesto A	0,2401	Sinérgica	Sinérgica
ZR-75-1	Ejemplo 1B	Abemaciclib	0,2067	Sinérgica	Sinérgica
		Everolimus	0,1853	Sinérgica	Sinérgica
		alpelisib	1,3717	Aditiva	Aditiva
		Compuesto A	0,3768	Sinérgica	Sinérgica
ZR-75-30	Ejemplo 1B	Abemaciclib	0,3960	Sinérgica	Sinérgica
		Everolimus	0,1248	Sinérgica	Sinérgica
		alpelisib	0,4149	Aditiva	Aditiva
		Compuesto A	0,7098	Sinérgica	Sinérgica
EFM-19	Ejemplo 1B	Abemaciclib	0,3455	Sinérgica	Sinérgica
		Everolimus	0,5033	Sinérgica	Aditiva
		alpelisib	0,2963	Sinérgica	Sinérgica
		Compuesto A	0,4326	Sinérgica	Sinérgica

Análisis de datos e interpretación del efecto combinado

Utilizar los métodos que se publican en la bibliografía para calcular el efecto combinado *in vitro* (L. Zhao, *et al*, Front Biosci, 2010, 2:241-249 y L. Zhao, *et al*, Clin Cancer Res, 2004, 10(23):7994-8004). Para identificar interacciones sinérgicas o antagónicas entre dos fármacos, se realizó un análisis de desplazamiento de la curva mediante el uso de una plantilla XL a medida con complementos XLFit 5. Las curvas de agente único se ajustan con 4 parámetros de regresión logística. Los criterios y las restricciones utilizados para el ajuste son (i) inferiores < (-20) fijados a 0 y (ii) superiores > 120 fijados a 100. Si todas las observaciones son menores que un umbral establecido por el usuario, entonces se realiza un ajuste constante con pendiente = 0, y la IC₅₀ se considera mayor que la concentración máxima incluida. Una vez que se ha obtenido la IC₅₀ absoluta de cada agente único, se calcula la concentración equivalente al 50 % de actividad para los agentes únicos y la combinación. Mediante el uso de estas concentraciones equivalentes junto con las actividades medidas, se volvió a calcular una IC₅₀ absoluta; la curva para agentes únicos alcanzará un 50 % de

actividad a valores de concentraciones equivalentes iguales a 1, mientras que las combinaciones sinérgicas alcanzarán el 50 % a valores más bajos, lo que dará como resultado en un desplazamiento hacia la izquierda, y la combinación antagónica mostrará un desplazamiento hacia la derecha. Las concentraciones equivalentes también se utilizan para calcular el CI_{50} (Índice de combinación al 50 % de actividad), donde el CI_{50} es igual a la IC_{50} absoluta de la curva de combinación. Junto con el CI_{50} , se pueden calcular otros CI (Índices de combinación) a diferentes porcentajes de actividad (CI_{10} , CI_{20} , CI_{30} , CI_{40} , CI_{60} , CI_{70} , CI_{80} , CI_{90}). Para calcular C_{Inn} , se calculan concentraciones equivalentes a diferentes porcentajes de actividad. Para cada porcentaje de actividad, se calcula el margen de error que es el intervalo de confianza al 95 % y, mediante el uso de este intervalo de confianza, se calculará el límite superior como la adición del margen de error al CI y el límite inferior como la sustracción del margen de error con respecto al CI. Límite superior = CI + intervalo de confianza al 95 % y límite inferior = CI - intervalo de confianza al 95 %. Estos límites se utilizan luego para interpretar los resultados.

La interpretación estadística en cada porcentaje de actividad es la siguiente:

Límite inferior <1 y límite superior >1	Aditiva
Límite superior <1	Sinergia
Límite inferior >1	Antagonista

La interpretación biológica en cada porcentaje de actividad es la siguiente:

$C_{Inn} < 0,5$	Sinergia
$C_{Inn} > 0,5$ y $C_{Inn} < 2$	Aditiva
$C_{Inn} > 2$	Antagonista

Estudios combinados *in vivo*

Debido a la heterogeneidad tumoral y la resistencia adquirida a los tratamientos endocrinos, el tratamiento conjunto se ha vuelto esencial en el tratamiento del cáncer de mama avanzado/metastásico ER positivo para un tratamiento eficaz o para superar la resistencia adquirida. Se plantea la hipótesis de que una combinación de tratamientos dirigidos tiene el potencial de ser más eficaz para ralentizar o incluso detener el progreso de los tipos de cáncer de mama ER positivos. La combinación de inhibidores de CDK4/6 y fulvestrant ha sido aprobada para el tratamiento del cáncer de mama metastásico ER positivo, pero un alto porcentaje de pacientes desarrolla resistencia debido a mutaciones adquiridas en ESR1 o PIK3CA. Como un potente degradador y antagonista de $ER\alpha$, el SERD oral, tal como el Ejemplo 1B, tiene el potencial de ser más eficaz para ralentizar o detener el progreso de los tipos de cáncer

de mama ESR1 mutantes o PIK3CA como un agente único o en combinación con inhibidor de CDK4/6, tal como abemaciclib, o inhibidor de PI3K/mTOR, tal como el Compuesto A. En ese contexto, el compuesto del Ejemplo 1B se evalúa para determinar la inhibición del crecimiento tumoral en combinación con abemaciclib (referencia de patente) o el Compuesto A (referencia de patente). Más específicamente, el compuesto del Ejemplo 1B se evalúa en combinación con abemaciclib o el Compuesto A en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MCF7 ESR1 de tipo silvestre y PIK3Ca mutante.

Expandir las células de cáncer de mama humano MCF7 (ATCC N.º HTB-22) en cultivo, recolectar e inyectar 5×10^6 células en solución 1:1 de HBSS + MATRIGEL™ (200 µl) por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones NOD SCID hembra (22-25 g, Envigo RMS, Inc). Veinticuatro horas antes de la implantación de las células, implantar pelets de estrógeno (0,18 mg/pélet, 17β 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, Ejemplo 1B en un vehículo apropiado (hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al 0,05 % en agua purificada) y administrar por gavaje oral durante 42 días. El inhibidor de CDK4/6 (abemaciclib) se formula en HEC al 1 % en un amortiguador de fosfato de sodio 25 mM, pH 2,0. El inhibidor de PI3K/mTOR (Compuesto A) se formuló en hidroxietilcelulosa al 1 %/TWEEN® 80 al 0,25 %/antiespumante al 0,05 % en agua purificada. 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. El volumen tumoral se estima mediante la fórmula $v = l \times w^2 \times 0,535$ donde l = mayor del diámetro medido y w = menor del diámetro perpendicular.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de volumen tumoral comienza con una transformación de los datos a una escala logarítmica para igualar la varianza a lo largo del tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos de volumen logarítmicos se analizan con un análisis de mediciones repetidas de dos factores de varianza por tiempo y tratamiento con los procedimientos MIXED en el software SAS (versión 9.3). El modelo de correlación para las mediciones repetidas es Spatial Power. Los grupos tratados se

comparan con el grupo de control en cada punto de tiempo. El procedimiento MIXED también se usa por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores estándar en cada punto temporal. Ambos análisis explican la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos que se produce cuando los animales con tumores grandes se retiran del estudio temprano. Las medias ajustadas y los errores estándar (s.e.) se representan al respecto de cada grupo de tratamiento en función del tiempo. El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y $\log_{10}$. El valor p es en función de la comparación entre dos grupos específicos.

Método de análisis de combinación (independencia Bliss para los estudios de IVEF)

Primero, el modelo de mediciones repetidas habitual se ajusta al volumen logarítmico en función del grupo y el tiempo. Luego, las declaraciones de contraste se utilizan para evaluar un efecto de interacción en cada punto temporal mediante el uso de los 2 tratamientos específicos que se combinan. Esto es equivalente al método de independencia Bliss y supone que los volúmenes tumorales pueden, en teoría, llegar a cero, es decir, regresión completa. La respuesta aditiva esperada (EAR) para la combinación se calcula en la escala de volumen tumoral como: respuesta (EAR) volumen $EAR = V1 * V2/V0$, donde $V0$, $V1$ y $V2$ son las medias estimadas de volúmenes tumorales para el control de vehículo, el tratamiento 1 solo y el tratamiento 2 solo, respectivamente. Si la prueba de interacción es significativa, el efecto combinado se declara estadísticamente más que aditivo o menos que aditivo, en función de si la media de volumen combinada observada es menor o mayor que el volumen de EAR, respectivamente. De lo contrario, la conclusión estadística es aditiva. Además, un rango de aditividad biológicamente relevante se puede definir como X % por encima y por debajo del volumen de EAR. Por lo general, X sería de 25 a 40 %. Luego, se puede llegar a una conclusión biológica para la combinación como más que aditiva, aditiva o menos que aditiva si la media de volumen combinada observada está por debajo, en o por encima del intervalo de aditividad.

Pueden existir casos en los que la mejor respuesta esperada es la estasis. En esos casos, el método Bliss se puede aplicar directamente a los valores de % de delta T/C para obtener una respuesta EAR porcentual: $EAR \% \text{ delta T/C} = Y1 * Y2/100$, donde $Y1$ e $Y2$ son los valores de porcentaje de delta T/C para los tratamientos con agente único. Actualmente, no existe una prueba estadística para comparar el % de delta T/C observado en el grupo de combinación con la EAR, pero se puede aplicar el criterio biológico descrito anteriormente.

Como se muestra en la Tabla 15 y 16, el tratamiento con el Ejemplo 1B o abemaciclib solo como un agente único dio como resultado un 32 % (% de delta T/C = -32) y un 52 % (% de delta T/C = -52) de regresiones tumorales, respectivamente, y ambos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) en comparación con el control de vehículo. La eficacia combinada del Ejemplo 1B con abemaciclib fue "menos que aditiva", pero la eficacia combinada del Ejemplo 1B más abemaciclib fue significativamente mejor que el Ejemplo 1B solo ($p < 0,001$). Sin embargo, la eficacia de un agente único abemaciclib no fue estadísticamente significativa en comparación con la combinación ($P=0,055$). La combinación es tolerada en los animales sin pérdida significativa de peso corporal.

Tabla 15: Eficacia combinada del Ejemplo 1B con abemaciclib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Diferencia ^b	SE	valor p
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	0,628	0,0658	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,479	0,0658	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,756	0,0658	<0,001*
Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,128	0,0658	0,055
Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,278	0,0658	<0,001*

^b Diferencia = Tratamiento 1 - Tratamiento 2; *valor p: significativo ($p < 0,05$)

SE - Error estándar

Tabla 16: Eficacia combinada del Ejemplo 1B con abemaciclib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento	% de delta T/C o % de regresión	valor p	Efecto combinado	Peso corporal
Vehículo	NA	NA		
Ejemplo 1B	-32	<0,001*		
Abemaciclib	-52	<0,001*		
Ejemplo 1B / Abemaciclib / (Combinación)	-64	<0,001*	Menos que aditivo	Sin cambio significativo

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y Log₁₀.

*valor p: significativo (p <0,05); NA: no aplicable

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; y el % de regresión se calcula para el volumen tumoral por debajo del valor inicial. 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. T₀ y C₀ son medias de volúmenes tumorales de valor inicial en esos grupos.

Como se muestra en las Tablas 17 y 18, el tratamiento con el Ejemplo 1B o el Compuesto A solo como un agente único dio como resultado un 32 % (% de delta T/C = -32) y un 36 % (% de delta T/C = -36) de regresiones tumorales, respectivamente, y ambos son estadísticamente significativos (p <0,001) en comparación con el control de vehículo. La eficacia combinada del Ejemplo 1B con el Compuesto A fue "menos que aditiva", pero la eficacia combinada del Ejemplo 1B más el Compuesto A fue significativamente mejor que el Ejemplo 1B solo (p <0,001) o el Compuesto A solo (p=0,002*). La combinación es tolerada en los animales sin pérdida significativa de peso corporal.

Tabla 17: Eficacia combinada del Ejemplo 1B con el Compuesto A en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Diferencia ^b	SE	valor p
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	0,479	0,0759	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Compuesto A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,504	0,0759	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Compuesto A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,761	0,0791	<0,001*
Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Compuesto A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,282	0,0791	<0,001*
Compuesto A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	Ejemplo 1B, 10 mpk, QD x 42, PO / Compuesto A, 7,5 mpk, BID x 42, PO	0,257	0,0791	0,002*

^b Diferencia = Tratamiento 1 - Tratamiento 2; *valor p: significativo (p <0,05)

SE - Error estándar

Tabla 18: Eficacia combinada del Ejemplo 1B con abemaciclib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento	% de delta T/C o % de regresión	valor p	Efecto combinado	Peso corporal
Vehículo	NA	NA		
Ejemplo 1B	-32	<0,001*		
Compuesto A	-36	<0,001*		
Ejemplo 1B / Compuesto A / (Combinación)	-65	<0,001*	Menos que aditivo	Sin cambio significativo

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y Log₁₀.

*valor p: significativo (p <0,05); NA: no aplicable

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; y el % de regresión se calcula para el volumen tumoral por debajo del valor inicial. La fórmula es $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$, donde T y C son medias de volúmenes tumorales de criterio de valoración en el grupo tratado o de control, respectivamente. T₀ y C₀ son medias de

volúmenes tumorales de valor inicial en esos grupos.

Como se muestra en las Tablas 19 y 20, el tratamiento con el Ejemplo 10 o abemaciclib solo como un agente único dio como resultado un 51 % (% de delta T/C = -51) y un 70 % (% de delta T/C = -70) de regresiones tumorales, respectivamente, y ambos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) en comparación con el control de vehículo. La eficacia combinada del Ejemplo 10 con abemaciclib fue "menos que aditiva", pero la eficacia combinada del Ejemplo 10 más abemaciclib fue significativamente mejor que el Ejemplo 10 solo ($p = 0,039$). Sin embargo, la eficacia combinada del Ejemplo 10 más abemaciclib no fue significativamente diferente del abemaciclib solo ($p = 0,905$). La combinación es tolerada en los animales sin pérdida significativa de peso corporal.

Tabla 19: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con abemaciclib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Diferencia ^b	SE	valor p
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,659	0,113	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Abemaciclib 50 mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1054	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,672	0,1054	<0,001*
Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,013	0,1103	0,905
Abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / abemaciclib, 50 mpk, QD x 42, PO	0,227	0,1054	0,039*

^b Diferencia = Tratamiento 1 - Tratamiento 2; *valor p: significativo ($p < 0,05$)

SE - Error estándar

Tabla 20: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con abemaciclib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento	% de delta T/C o % de regresión	valor p	Efecto combinado	Peso corporal
Vehículo	NA	NA		
Ejemplo 10	-51	<0,001*		
Abemaciclib	-70	<0,001*		
Ejemplo 10 / Abemaciclib / (Combinación)	-71	<0,001*	Menos que aditivo	Sin cambio significativo

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y Log₁₀.

*valor p: significativo (p <0,05); NA: no aplicable

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; y el % de regresión se calcula para el volumen tumoral por debajo del valor inicial. La fórmula es $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$, donde T y C son medias de volúmenes tumorales de criterio de valoración en el grupo tratado o de control, respectivamente. T₀ y C₀ son medias de volúmenes tumorales de valor inicial en esos grupos.

Como se muestra en la Tabla 21 y 22, el tratamiento con el Ejemplo 10 o alpelisib solo como un agente único dio como resultado un 51 % (% de delta T/C = -51) y un 21 % (% de delta T/C = -21) de regresiones tumorales, respectivamente, y ambos son estadísticamente significativos (p <0,001 y p = 0,013) en comparación con el control de vehículo. La eficacia combinada del Ejemplo 10 con alpelisib fue "aditiva", y la eficacia combinada del Ejemplo 10 más alpelisib fue significativamente mejor que el Ejemplo 10 solo (p = 0,009). La eficacia combinada del Ejemplo 10 más alpelisib también fue significativamente mejor que el alpelisib solo (p = <0,001). La combinación es tolerada en los animales sin pérdida significativa de peso corporal.

Tabla 21: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con alpelisib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Diferencia ^b	SE	valor p
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,241	0,1121	<0,039*
Vehículo, QD x 42, PO	alpelisib 15 mpk (d1-d7), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,445	0,1121	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,755	0,1121	<0,001*
Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,514	0,1121	<0,001
alpelisib 15 mpk (d1-d7), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / alpelisib 15 mpk (d1-d7,), 10 mpk (d8-42), mpk, QD x 42, PO	0,310	0,1121	0,009*

^b Diferencia = Tratamiento 1 - Tratamiento 2; *valor p: significativo (p <0,05)

SE - Error estándar

Tabla 22: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con alpelisib en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento	% de delta T/C o % de regresión	valor p	Efecto combinado	Peso corporal
Vehículo	NA	NA		
Ejemplo 10	-51	<0,001*		
alpelisib	-21	<0,013*		
Ejemplo 10 / alpelisib (Combinación)	-76	<0,001*	Aditivo	Sin cambio significativo

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y Log₁₀.

*valor p: significativo (p <0,05); NA: no aplicable

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; y el % de regresión se calcula para el volumen tumoral por debajo del valor inicial. 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.

Como se muestra en la Tabla 23 y 24, el tratamiento con el Ejemplo 10 o everolimus solo como un agente único dio como resultado un 51 % (% de delta T/C = -51) y un 50 % (% de delta T/C = -50) de regresiones tumorales, respectivamente, y ambos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$ y $p < 0,001$) en comparación con el control de vehículo. La eficacia combinada del Ejemplo 10 con everolimus fue "aditiva", y la eficacia combinada del Ejemplo 10 más everolimus fue significativamente mejor que el Ejemplo 10 solo ($p = 0,004$). La eficacia combinada del Ejemplo 10 más alpelisib también fue significativamente mejor que el everolimus solo ($p = 0,04$). La combinación es tolerada en los animales sin pérdida significativa de peso corporal.

Tabla 23: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con everolimus en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Diferencia ^b	SE	valor p
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	0,445	0,0999	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,433	0,1038	<0,001*
Vehículo, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,748	0,0999	<0,001*
Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,303	0,0999	0,004*
Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	Ejemplo 10, 15 mpk, QD x 42, PO / Everolimus, 5 mpk, QD x 42, PO	0,315	0,138	0,004*

^b Diferencia = Tratamiento 1 - Tratamiento 2; *valor p: significativo ($p < 0,05$)

SE - Error estándar

Tabla 24: Eficacia combinada del Ejemplo 10 con everolimus en el modelo de cáncer de mama MCF7 ER positivo

Tratamiento	% de delta T/C o % de regresión	valor p	Efecto combinado	Peso corporal
Vehículo	NA	NA		
Ejemplo 10	-51	<0,001*		
Everolimus	-50	<0,001*		
Ejemplo 10 / Everolimus (Combinación)	-76	<0,001*	Aditivo	Sin cambio significativo

El análisis del volumen tumoral es en función de la estructura de covarianza Spatial Power y Log₁₀.

*valor p: significativo (p <0,05); NA: no aplicable

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; y el % de regresión se calcula para el volumen tumoral por debajo del valor inicial. La fórmula es $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$, donde T y C son medias de volúmenes tumorales de criterio de valoración en el grupo tratado o de control, respectivamente. T₀ y C₀ son medias de volúmenes tumorales de valor inicial en esos grupos.

Ensayo de biodisponibilidad oral en ratas

El fin 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 de sangre en serie 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 12 horas después la dosis al respecto del 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,

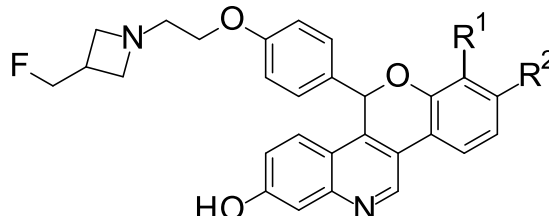
$$\%F = (AUC_{PO} \times Dosis_{IV}) / (AUC_{IV} \times Dosis_{PO}) \times 100.$$

X21755

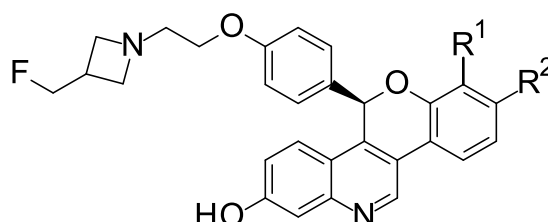
Los compuestos del Ejemplo 1B muestran un valor de % F de ~50 % en el ensayo mencionado anteriormente. Este ensayo demuestra que el Ejemplo 1B tiene una buena biodisponibilidad oral.

REIVINDICACIONES

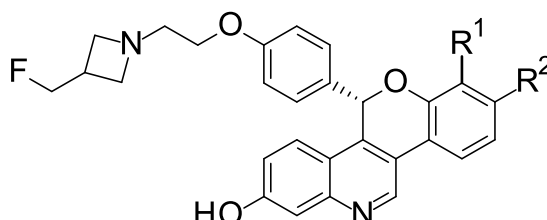
1. Un compuesto de la fórmula:



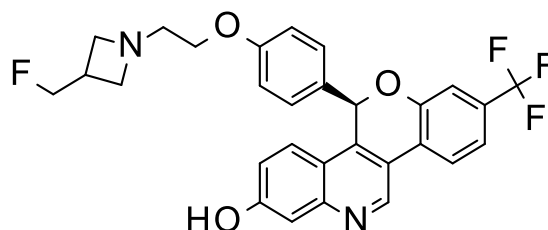
- en donde ya sea R^1 o R^2 se selecciona independientemente de Cl, F, $-CF_3$, o $-CH_3$, y el otro es hidrógeno,
o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es



- o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es



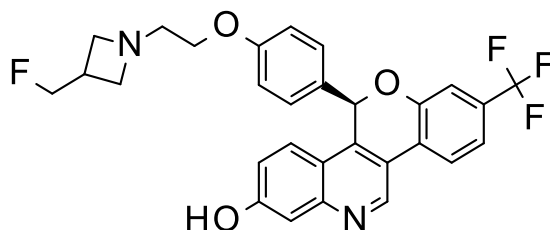
- o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el compuesto es



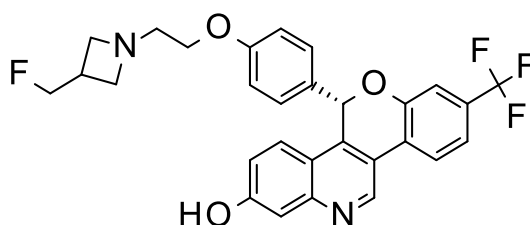
- o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico es una sal de ácido bencensulfónico.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la sal aceptable

desde el punto de vista farmacéutico es una sal de ácido 4-metilbencensulfónico

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el compuesto es

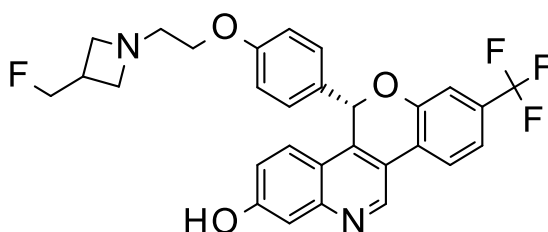


8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el compuesto es



o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico es una sal de ácido bencensulfónico.
10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico es una sal de ácido 4-metilbencensulfónico.
11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el compuesto es



12. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en combinación con un excipiente, portador o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende uno o más de otros agentes terapéuticos.
14. Un método para tratar cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón, que comprende administrar a un paciente que necesite tal tratamiento una cantidad

eficaz de un compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer de mama es cáncer de mama ER positivo.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer gástrico es cáncer gástrico ER positivo.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón ER positivo.

18. Un compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en tratamiento.

19. Un compuesto o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento contra el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer gástrico o cáncer de pulmón.

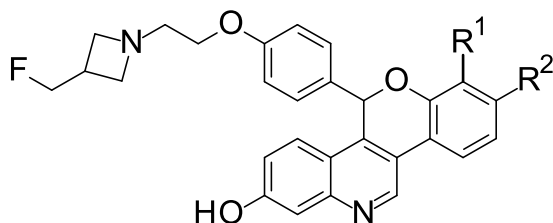
20. El compuesto o la sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en el tratamiento contra el cáncer de mama ER positivo.

21. El compuesto o la sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en el tratamiento contra el cáncer gástrico ER positivo.

22. El compuesto o la sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en el tratamiento contra el cáncer de pulmón ER positivo.

RESUMEN

Se proporcionan novedosos degradadores selectivos del receptor de estrógeno (SERD) de acuerdo con la fórmula:



sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos y composiciones farmacéuticas de estos, en donde ya sea R¹ o R² se selecciona independientemente de Cl, F, -CF₃, o -CH₃, y el otro es hidrógeno, y métodos para su uso.