



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115093429 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 30

(21) 申请号 202210696425.5

(22) 申请日 2018.04.03

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 115093429 A

(43) 申请公布日 2022.09.23

(30) 优先权数据  
62/482,030 2017.04.05 US  
62/526,677 2017.06.29 US  
15/814,105 2017.11.15 US  
62/586,416 2017.11.15 US

(62) 分案原申请数据  
201880033165.5 2018.04.03

(73) 专利权人 哈佛大学的校长及成员们  
地址 美国马萨诸塞州  
专利权人 卫材研究发展管理有限公司

(72) 发明人 Y.岸 吉良和信 伊藤宪  
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105  
专利代理师 何伟

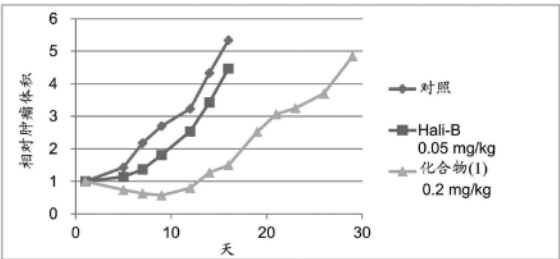
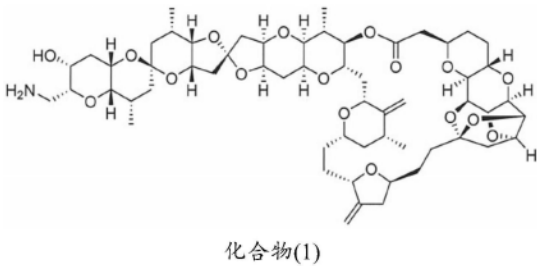
(51) Int.Cl.  
C07D 493/22 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/04 (2006.01)  
A61K 31/357 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 104854112 A, 2015.08.19  
US 2006104984 A1, 2006.05.18  
审查员 徐建国

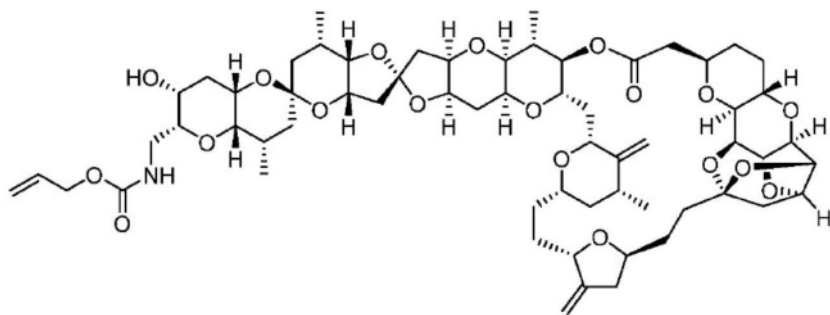
权利要求书2页 说明书53页 附图16页

(54) 发明名称  
大环化合物及其用途

(57) 摘要  
本发明提供具有肿瘤血管重塑效应和/或抗CAF (癌症相关成纤维细胞) 活性的新颖化合物 (1) 或其药学上可接受的盐, 其任选在药学上可接受的载体中; 及其医学用途。



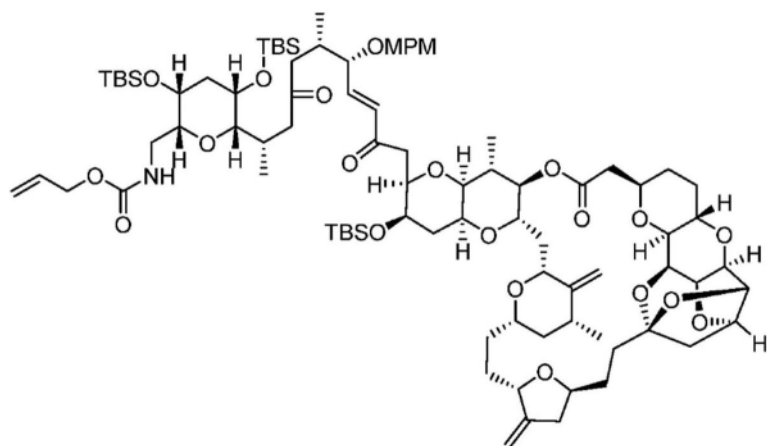
1. 下式的化合物:



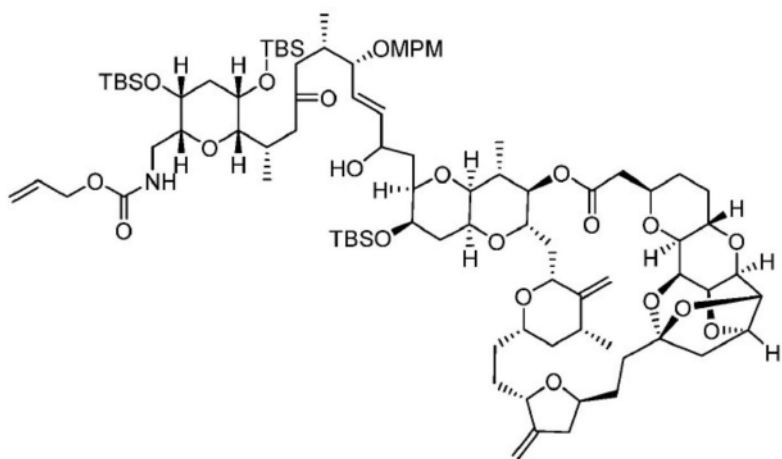
(D-6),

或其盐。

2. 化合物, 其选自:



(D-5),



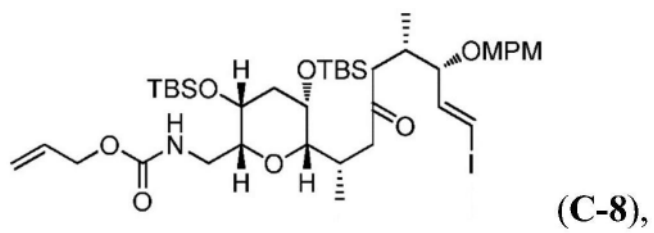
(D-4),

及其盐。

3. 权利要求2所述的化合物, 其中所述化合物为式 (D-5), 或其盐。

4. 权利要求2所述的化合物, 其中所述化合物为式 (D-4), 或其盐。

5. 化合物, 其为下式:



或其盐。

## 大环化合物及其用途

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请日:2018年4月3日;申请号:201880033165.5、发明名称:大环化合物及其用途)的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 主张于2017年4月5日提交的美国临时专利申请案U.S.S.N.62/482,030、于2017年6月29日提交的美国临时专利申请案U.S.S.N.62/526,677 及于2017年11月15日提交的美国临时专利申请案U.S.S.N.62/586,416且根据35U.S.C. §120主张于2017年11月15日提交的美国专利申请案U.S.S.N.15/814,105的优先权,其每一篇的全部内容均以引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0004] 本发明提供具有肿瘤血管重塑效应及抗CAF(癌症相关成纤维细胞)活性的新颖大环化合物。该化合物可用于治疗癌症或抑制受试者中的肿瘤生长。

### 现有技术

[0005] 软海绵素(Halichondrin)(例如软海绵素B)是最初自海洋海绵黑色软海绵(Halichondria okadai)分离出的抗癌剂(例如,参见D.Uemura等人,“Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge”J.Am.Chem.Soc.,107,4796(1985)),且随后在小轴海绵属(Axinella sp.)、棕扁海绵(Phakellia carteri)及扁矛海绵属(Lissondendryx sp.)中发现。软海绵素B的全合成发表于1992年(例如,参见Y.Kishi等人,“Total Synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin B”J.Am.Chem.Soc.,114,3162(1992))。已证明,软海绵素B在体外抑制微管蛋白聚合、微管组装、 $\beta 5$ -微管蛋白交联、GTP及长春碱结合至微管蛋白和微管蛋白依赖性GTP水解,且已显示体外及体内的抗癌性质(例如,参见Y.Hirata等人,“Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge”Pure Appl.Chem.,58,701(1986);Fodstad等人,“Comparative antitumor activities of halichondrins and vinblastine against human tumor xenografts”J.of Experimental Therapeutics Oncology 1996;1:119,125)。

[0006] 基于软海绵素B开发的甲磺酸埃雷布尔(eribulin mesylate, Halaven<sup>TM</sup>) (例如,参见于1999年12月23日公开的国际公开案第W0 1999/065894号;于2005年12月15日公开的国际公开案第W0 2005/118565号;及W.Zheng等人,“Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B”Bioorganic Medicinal Chemistry Letters 14,5551-5554(2004))目前在许多国家临床使用以用于治疗(例如)转移性乳腺癌及晚期脂肪肉瘤。

[0007] 其它阐述软海绵素的专利公开案包括1995年7月25日颁予Kishi等人的美国专利第5,436,238号;1994年8月16日颁予Kishi等人的美国专利第5,338,865号;及由Kishi等人提交的W0 2016/003975,所有专利均转让给哈佛学院的校长与教职员(President and Fellows of Harvard College)。

[0008] 也参见(例如)美国专利第5,786,492号;美国专利第8,598,373号;美国专利第9,

206,194号;美国专利第9,469,651号;WO/2009/124237A1;WO/1993/017690A1;WO/2012/147900A1;美国专利第7,982,060号;美国专利第8,618,313号;美国专利第9,303,050号;美国专利第8,093,410号;美国专利第8,350,067号;美国专利第8,975,422号;美国专利第8,987,479号;美国专利第8,203,010号;美国专利第8,445,701号;美国专利第8,884,031号;美国专利第RE45,324号;美国专利第8,927,597号;美国专利第9,382,262号;美国专利第9,303,039号;WO/2009/046308A1;WO/2006/076100A3;WO/2006/076100A2;WO/2015/085193A1;WO/2016/176560A1;美国专利第9,278,979号;美国专利第9,029,573号;WO/2011/094339A1;WO/2016/179607A1;WO/2009/064029A1;WO/2013/142999A1;WO/2015/066729A1;WO/2016/038624A1;及WO/2015/000070A1。

[0009] 在多种实体肿瘤中广泛发现的癌症相关成纤维细胞(CAF)是基质细胞。众所周知,CAF在血管发生、侵袭及转移方面起重要作用。据报导,在(例如)侵袭性乳腺癌(例如,参见M.Yamashita等人,“Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome”Breast Cancer 19,170,2012)及食管腺癌(例如,参见T.J.Underwood等人,“Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in esophageal adenocarcinoma”Journal of Pathol., 235,466,2015)中,CAF的量与临床预后之间存在紧密关联。也已报导,CAF在诸如乳腺癌(例如,参见P.Farmer等人,“A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer”Nature Medicine.,15(1),68,2009)及头颈癌(例如,参见S.Schmitz等人,“Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer”Oncotarget,6(33),34288,2015;Y.Matsuoka等人,“The tumor stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma”APMIS 123(3),205,2015)等多种肿瘤中与抗性相关联。

[0010] 已由此观察到肿瘤血管重塑效应及抗CAF活性使得癌症微环境改良,此有助于肿瘤治疗。血管对于肿瘤的生长至关重要。肿瘤中的重构血管除了减轻低氧以外,也可将抗癌剂递送至肿瘤。据报导,埃雷布尔诱导的异常肿瘤血管系统重塑产生更具功能性的微环境,其可通过消除内部肿瘤低氧而降低肿瘤的侵犯性。由于异常肿瘤微环境增强抗药性及转移两者,因此埃雷布尔明显逆转这些侵袭性特征的能力可有助于其临床益处(例如,参见Y.Funahashi等人,“Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models”Cancer Sci.105(2014),1334-1342)。时至今日,尚未报导具有肿瘤血管重塑效应及抗CAF活性的抗癌药物。

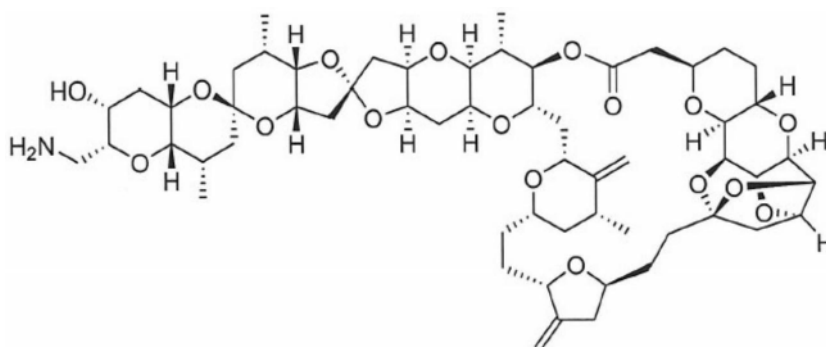
[0011] 尽管已取得进展,但仍需要其它化合物来促进对肿瘤及癌症的研究及医疗护理。

## 发明内容

[0012] 本发明涉及具有肿瘤血管重塑效应及抗CAF活性的大环化合物(例如化合物(1))及其药学上可接受的盐及其经同位素标记的衍生物以及其药物组合物。

[0013] 本发明也包括使用化合物(1)治疗癌症的方法、可逆或不可逆地抑制细胞有丝分裂的方法及在体外、体内或受试者中抑制肿瘤生长的方法。在另一方面中,本发明提供试剂盒,其包含化合物(1)或其药学上可接受的盐或其药物组合物。

[0014] 在一方面中,本发明的特征在于为化合物(1)的化合物:



[0015]

### 化合物(1),

[0016] 及其药学上可接受的盐;及其经同位素标记的衍生物。

[0017] 在一方面中,本发明提供药物组合物,其包含化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物。所述药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。所述药物组合物可进一步包含一种或多种呈组合、交替或其它种类的同步疗法形式的额外治疗剂以得到治疗的期望目标。

[0018] 本发明的特征也在于制备化合物(1)或其中间体的方法。在本文中也提供合成中间体作为本发明的一部分。

[0019] 已发现,化合物(1)对肿瘤血管重塑具有有利的效应且具有抗CAF活性,如附图及实施例中所展示。因此,化合物(1)在癌症(例如头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck,SCCHN)、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、小肠癌、膀胱癌、肉瘤、罕见癌症)的治疗中具有潜在用途。

[0020] 在另一方面中,本发明提供利用化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物抑制受试者(通常为人类)的对具有肿瘤血管重塑效应和/或抗CAF活性的化合物有反应的任何肿瘤生长或癌症的方法。

[0021] 化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其组合物可与为患者提供有益结果的任何其它活性剂组合给予。在某些实施方案中,化合物(1)与抗体(例如单克隆抗体)组合使用。在一个实施方案中,化合物(1)与免疫疗法以组合、交替或其它同步疗法方式使用,该免疫疗法为例如抗EGFR(表皮生长因子受体)抗体、抗HER2(人类表皮生长因子受体)抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体,如下文中更详细地阐述。

[0022] 举例而言,提供治疗有需要的受试者(通常人类)的头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)的方法,其包含向该受试者给予与抗EGFR(表皮生长因子受体)单克隆抗体(mAb)疗法组合的有效量的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其组合物。在某些实施方案中,所述抗EGFR(表皮生长因子受体)mAb是西妥昔单抗(cetuximab)。

[0023] 作为另一实例,提供治疗有需要的受试者(通常人类)的乳腺癌的方法,其包含向该受试者给予与HER2(人类表皮生长因子受体)mAb疗法组合的有效量的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其组合物。在某些实施方案中,HER2(人类表皮

生长因子受体)mAb是曲妥珠单抗(trastuzumab)。在其它实施方案中,化合物(1)可与传统化学疗法(例如阿霉素(adriamycin)、环磷酰胺、紫杉醇等)或抗雌激素(例如选择性雌激素调节剂(SERM)、选择性雌激素降解剂(SERD)、部分或全部雌激素抑制剂(例如氟维司群(fulvestrant)))或CDK 4/6抑制剂(例如帕博西尼(palbociclib)(Pfizer))组合用于治疗乳腺癌。

[0024] 本发明的另一方面提供在试剂盒(可为剂型包装物形式)中的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,其可呈水合物、溶剂合物、多晶型物或其组合物的形式。本文所阐述的试剂盒可包括单一剂量或多个剂量的所述化合物或其药物组合物。本发明的试剂盒可包括使用所提供的治疗性剂型的说明书(例如包括于该试剂盒中的使用所述化合物或药物组合物的说明书)。

[0025] 因此,本发明至少包括以下特征:

[0026] (i) 化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式;

[0027] (ii) 治疗方法,其包括向受试者(例如人类)给予有效量的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式)以治疗头颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、腺样囊性癌)、乳腺癌(例如HER2阴性乳腺癌、三阴性乳腺癌)、食管癌(例如食管腺癌)、子宫癌(例如子宫肉瘤)、卵巢癌、结肠直肠癌、肉瘤(例如滑膜肉瘤、血管肉瘤、软组织肉瘤、纤维肉瘤、子宫肉瘤)、膀胱癌(例如泌尿道上皮癌)、胃癌、小肠癌(例如小肠腺癌)、子宫内膜癌或罕见癌症;

[0028] (iii) 治疗方法,其包括向受试者(例如人类)给予有效量的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式)以用于治疗对血管重塑效应和/或抗CAF活性有反应的医学病症(例如癌症或肿瘤);

[0029] (iv) 化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式),其用于治疗头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、胃癌、小肠癌、子宫内膜癌或罕见癌症;

[0030] (v) 化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式),其用于治疗对血管重塑效应和/或抗CAF活性有反应的医学病症(例如癌症或肿瘤);

[0031] (vi) 化合物(1)的氘化衍生物;

[0032] (vii) 制备药物的方法,所述药物意欲用于治疗或预防对血管重塑效应和/或抗CAF活性有反应的病症(例如癌症或肿瘤)的治疗性用途,其特征在于在制备中使用上文所阐述的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式,或活性化合物的实施方案;

[0033] (viii) 呈实质上纯(例如至少90%或95%)形式的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物;

[0034] (ix) 于药学上可接受的载体或赋形剂中的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式)的药学上可接受的组合物;

[0035] (x) 任选在药学上可接受的载体或赋形剂中的化合物(1)或其药学上可接受的盐

或经同位素标记的衍生物(其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式)的药学上可接受的剂型;

[0036] (xi) 治疗本文所阐述病症的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,其中其借助除血管重塑效应和/或抗CAF作用活性以外的机制起作用;及

[0037] (xii) 制备本文所阐述的化合物的方法及合成中的中间体。

## 附图说明

[0038] 并入本说明书中并构成本说明书的一部分的附图说明本发明的若干实施方案,并与该说明一起提供本发明的非限制性实例。

[0039] 图1显示化合物(1)作为如药理学测试实施例4中所阐述的单一疗法在小鼠中的FaDu皮下异种移植模型(头颈癌)中的抗肿瘤效应。

[0040] 图2显示化合物(1)作为如药理学测试实施例5中所阐述的单一疗法针对小鼠中的OSC-19皮下异种移植模型(头颈癌)的抗肿瘤活性。

[0041] 图3显示化合物(1)作为如药理学测试实施例6中所阐述的单一疗法针对小鼠中的HCC-1806皮下异种移植模型(乳腺癌)模型的抗肿瘤活性。

[0042] 图4显示化合物(1)如药理学测试实施例7中所阐述与西妥昔单抗组合在小鼠中的FaDu皮下异种移植模型中的抗肿瘤效应。

[0043] 图5显示化合物(1)如药理学测试实施例8中所阐述与曲妥珠单抗组合在小鼠中的KPL-4皮下异种移植模型(乳腺癌)中的抗肿瘤活性。

[0044] 图6A-6B显示化合物(1)在HSC-2正位移植小鼠模型中的抗肿瘤效应。图6A.在裸小鼠舌中植入荧光素酶转导的HSC-2( $1 \times 10^6$ 个细胞/点)。使用体内成像系统(IVIS)分析荧光素酶转导的HSC-2的量。数据显示每一小鼠舌中的生物发光水平。图6B.16只小鼠的代表性生物发光影像。CDDP、CTX、CDDP+CTX是用作比较物,它们目前用于SCCHN癌症患者治疗的治疗中。CDDP=顺铂,CTX=西妥昔单抗。

[0045] 图7A-7B显示化合物(1)与西妥昔单抗组合在HSC-2正位移植小鼠模型中的存活优点。图7A.在裸小鼠舌中植入荧光素酶转导的HSC-2( $1 \times 10^6$ 个细胞/点)。数据显示直至药物治疗后第100天的存活曲线( $n=16$ )。\* $P<0.0001$ ,相对于单独的化合物(1)或CTX(时序(Mantel-Cox)检验)。图7B.使用体内成像系统(IVIS)分析荧光素酶转导的HSC-2的量。在第100天化合物(1)+CTX组合组的10只存活小鼠的生物发光影像。RBW=相对体重。CDDP=顺铂,CTX=西妥昔单抗。

[0046] 图8A-8B显示化合物(1)与放射疗法组合在FaDu小鼠异种移植模型中的抗肿瘤效应。图8A.在裸小鼠右大腿中皮下植入荧光素酶转导的FaDu( $5 \times 10^6$ 个细胞/点)。接种后13天,将小鼠随机分配( $n=6$ ),且在第1天及第8天以 $90\mu\text{g/kg}$ 静脉内注射化合物(1),且在第4天及第11天有或没有18Gy的RT。使用体内成像系统(IVIS)分析荧光素酶转导的FaDu的量。数据显示相对于第1天的平均生物发光水平及SEM( $n=6$ )。SEM=平均值的标准误差。\* $P<0.05$ ,在第29天相对于未经治疗(不成对t-检验)。图8B.在第29天每一群组6只小鼠的代表性生物发光影像。RT=放射疗法。

[0047] 图9显示化合物(1)与抗mPD-1抗体组合的抗肿瘤活性。将CT26 s.c.同基因小鼠模型(结肠癌)用化合物(1)及抗mPD-1抗体分别以Q7D时间表及一周两次时间表治疗3周。结果



显示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )的平均值 $\pm$ SEM( $n=8$ )。

[0048] 图10A显示无细胞微管蛋白聚合分析。化合物(1)对微管蛋白聚合具有抑制活性。图10B显示微管动力学分析。化合物(1)对微管动力学也具有抑制活性。

[0049] 图11显示化合物(1)在食管癌(OE21、OE33及TE-8)及子宫癌(MES-SA、MES-SA/Dx5-Rx1)细胞系中是强效抗增殖剂。

[0050] 图12显示化合物(1)作为单一疗法在乳腺癌及卵巢癌(分别为KPL-4及COLO-704)的皮下异种移植模型中具有强效抗肿瘤活性。

[0051] 图13显示化合物(1)对肿瘤微环境的效应。如图所示,化合物(1)增加微血管密度。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.0001$ ,相对于未经治疗(邓尼特(Dunnett)多重比较检验)。

[0052] 图14显示化合物(1)对肿瘤微环境的效应。如图所示,化合物(1)降低 $\alpha$ -SMA阳性CAF。

[0053] 图15显示化合物(1)在FaDu皮下异种移植模型中减少来自CAF的ECM蛋白。在第1天单次给予化合物(1)180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +西妥昔单抗之后,在第6天收集FaDu异种移植肿瘤。

[0054] 图16显示化合物(1)在FaDu皮下异种移植模型中展现与西妥昔单抗的剂量依赖性组合效应。单一剂量, $n=6$ 。在第1天在FaDu异种移植模型中给予化合物(1)及西妥昔单抗(CTX)。

[0055] 图17显示作为单一疗法在小鼠中的软组织肉瘤异种移植模型中的抗肿瘤效应。显示MES-SA(人类子宫肉瘤)、HT-1080(人类纤维肉瘤)及CTG-2041(人类血管肉瘤)。

[0056] 图18显示作为单一疗法在小鼠中的子宫内膜癌异种移植模型中的抗肿瘤效应。显示HEC-108及AN3CA(子宫内膜癌)。

[0057] 定义

[0058] 如本文所使用,术语“盐”是指任何及所有盐,且涵盖药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”意指在合理医学判断范围内适用于接触人类及较低等动物组织而无过度毒性、刺激、过敏性反应及诸如此类且与合理益处/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐为业内所熟知。举例而言,Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences,1977,66,1-19(其是以引用的方式并入本文中)中详细阐述药学上可接受的盐。本发明化合物的药学上可接受的盐包括衍生自适宜无机及有机酸及无机及有机碱的那些。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸及过氯酸)或与有机酸(例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)或通过使用业内已知的其它方法(例如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天门冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐及诸如此类。衍生自适当碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐及 $\text{N}^+(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐及诸如此类。在适当时,其它药学上可接受的盐包括无毒铵、季铵及胺阳离子,其是

使用诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根及芳基磺酸根等抗衡离子来形成。也提供化合物(1)且可作为游离碱给予。

[0059] 也应理解,具有相同分子式但其原子的键结的性质或顺序不同或其原子空间排列不同的化合物称为“异构体”。原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。

[0060] 术语“组合物”与“制剂”可互换使用。

[0061] 预期给予的“受试者”是指人类(即,任何年龄组的男性或女性,例如小儿受试者(例如婴儿、儿童或青少年)或成年受试者(例如年轻人、中年人或老年人))或非人类动物。在某些实施方案中,非人类动物是哺乳动物(例如灵长类动物(例如食蟹猴(cynomolgus monkey)或罗猴(rhesus monkey))、商业有关哺乳动物(例如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫或狗)或禽类(例如商业有关禽类,例如鸡、鸭、鹅或火鸡))。在某些实施方案中,非人类动物是鱼类、爬行动物或两栖动物。非人类动物可是处于任何发育阶段的雄性或雌性。非人类动物可是转基因动物或经遗传改造动物。术语“患者”是指需要治疗疾病的人类受试者。

[0062] 术语“给予(administer、administering或administration)”是指将本文所阐述的化合物或其组合物植入、吸收、摄取、注射、吸入或以其它方式引入至受试者中或受试者上。

[0063] 术语“治疗(treatment、treat及treating)”是指逆转、减轻、延迟本文所阐述疾病的发作或抑制其进展。在一些实施方案中,治疗可在已出现或已观察到疾病的一种或多种迹象或症状之后给予。在其它实施方案中,治疗可在不存在疾病的迹象或症状下给予。举例而言,治疗可在症状发作之前给予易感受试者。也可在症状已缓解后继续治疗以(例如)延迟或阻止复发。

[0064] 本文所阐述化合物的“有效量”是指足以引发期望生物学反应的量。本文所阐述化合物的有效量可取决于诸如以下等因素而有所变化:期望的生物学终点、化合物的药代动力学、所治疗的病症、给予模式及受试者的年龄及健康状况。在某些实施方案中,有效量是治疗有效量。或者,在单独的方法或用途中,在经指示且有效的情形下,本发明可用作预防性治疗。在某些实施方案中,有效量是本文所阐述的化合物于单一剂量中的量。在某些实施方案中,有效量是本文所阐述的化合物于多个剂量中的组合量。

[0065] 本文所阐述化合物的“治疗有效量”是足以在病症的治疗中提供治疗益处或足以延迟或使与该病症相关的一种或多种症状最小化的量。化合物的治疗有效量意指治疗剂单独或与其它疗法组合在病症的治疗中提供治疗益处的量。术语“治疗有效量”可涵盖改良总体疗法、降低或避免病症的症状、迹象或病因和/或增强另一治疗剂的治疗效力的量。在某些实施方案中,治疗有效量是足以治疗所阐述的任何疾病或病症的量。

[0066] 如本文所使用,“抑制(inhibition、inhibiting、inhibit)”及“抑制剂”及诸如此类是指化合物降低、减缓、停止或阻止生物过程(例如肿瘤生长)的活性的能力。在某些实施方案中,抑制是约45%至50%。在某些实施方案中,抑制是约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%或100%。

[0067] 术语“新生物”及“肿瘤”在本文中可互换使用且是指异常组织团块,其中该团块的生长超过正常组织的生长且与正常组织的生长不协调。新生物或肿瘤可是“良性”或“恶性”的,此取决于以下特征:细胞分化的程度(包括形态学及功能性)、生长速率、局部侵袭及转

移。“良性新生物”通常分化良好,具有在特性上慢于恶性新生物的生长且保持局限于起源部位。另外,良性新生物不具有浸润、侵袭或转移至远处部位的能力。相比之下,“恶性新生物”通常分化不良(退行发育)且在特性上具有伴随进行性浸润、侵袭及破坏周围组织的快速生长。此外,恶性新生物通常具有转移至远处部分的能力。术语“转移(metastasis、metastatic或metastasisize)”是指癌细胞自原发性或原始肿瘤扩散或迁移至另一器官或组织,且通常可通过原发性或原始肿瘤的组织类型的“继发性肿瘤”或“继发性细胞团块”的存在而非该继发性(转移)肿瘤所在的器官或组织来鉴别。

[0068] 术语“癌症”是指一类特征在于不受控制地增殖且具有浸润及破坏正常身体组织的能力的异常细胞发育的疾病。

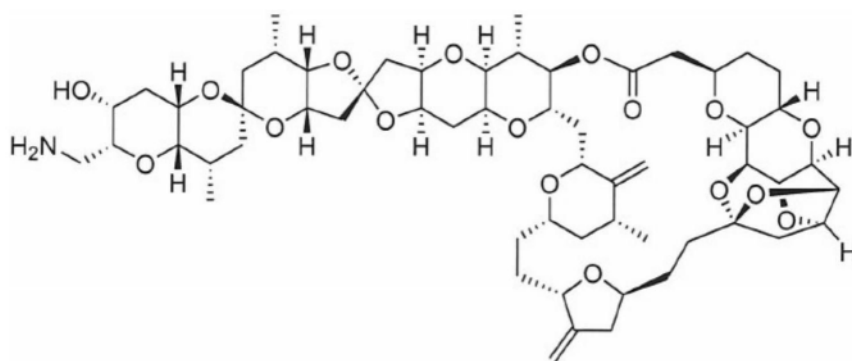
[0069] 术语“罕见癌症”是指在相对较少数量的患者中发生的癌症。罕见癌症包括(但不限于)肉瘤(例如软组织肉瘤、脂肪肉瘤、子宫肉瘤、平滑肌肉瘤、粘液性纤维肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、滑膜肉瘤、横纹肌肉瘤)、恶性淋巴瘤、胸腺癌(例如胸腺瘤)、间皮瘤、胃肠基质瘤(GIST)、神经内分泌癌、眼癌、脑瘤、骨软组织瘤、皮肤癌及生殖细胞瘤。

[0070] 术语“抗癌剂”是指可用于治疗受试者的癌症(例如抑制受试者的癌症或肿瘤生长)的任何治疗剂。抗癌剂涵盖生物治疗抗癌剂以及化学治疗剂。

## 具体实施方式

[0071] 下文将参照本发明的实施方案及诸如此类来详细地阐述本发明。本发明提供化合物(例如化合物(1)),及其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,及其药物组合物。本发明也提供抑制受试者中的肿瘤生长和/或治疗癌症的方法,其包含向该受试者给予有效量的本文中所提供的化合物或组合物。该化合物或组合物可作为单一疗法或与另一疗法组合给予,如本文所阐述。在另一方面中,本发明提供制备化合物(1)的方法及可用于该目的的合成中间体。

[0072] 本发明包括以下结构的化合物:



[0073]

化合物(1),

[0074] 或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,其可任选呈水合物、溶剂合物或多晶型物的形式,其任选于药学上可接受的载体或赋形剂中。

[0075] 化合物(1)可作为晶体多晶型物存在,且本发明的化合物可呈单一晶形式或两种或更多种晶体形式的混合物中的任一个。化合物(1)可呈非晶型,或可是无水合物或溶剂合物,例如水合物。

[0076] 本发明包括化合物(1)及其药学上可接受的盐的经同位素标记的衍生物。经同位素标记的化合物等效于化合物(1),除了一个或多个原子被具有与自然界中所通常发现的那些原子不同的原子质量或质量数的原子替代。可并入至本发明化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、碘、溴及氯的同位素,例如<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>35</sup>S、<sup>123</sup>I及<sup>125</sup>I。

[0077] 经同位素标记的化合物(例如并入诸如<sup>3</sup>H和/或<sup>14</sup>C等放射性同位素的化合物)可用于药物和/或基质的组织分布分析。同位素<sup>3</sup>H及<sup>14</sup>C视为可用的,这是因为所述同位素可易于制备并检测。同位素<sup>11</sup>C及<sup>18</sup>F可用于PET(正电子发射断层摄影术)中。同位素<sup>125</sup>I视为可用于SPECT(单光子发射计算机断层摄影)中,且可用于脑成像中。由较重同位素(例如<sup>2</sup>H)替代因其较高的代谢稳定性而在治疗(例如,延长体内半衰期或降低必需剂量)方面产生一些优点,且因此在给定情况下视为是可用的。经同位素标记的化合物可通过使用容易获得的经同位素标记的试剂而非未经同位素标记的试剂并通过实施下文中所阐述方案和/或实施例中所披露的过程类似地制备。

[0078] 化合物(1)可作用于捕获具生物活性的低分子量化合物的靶蛋白的化学探针。具体而言,本发明的化合物可通过J.Mass Spectrum.Soc.Jpn.第51卷,第5,2003期,第492-498页、W02007/139149或诸如此类中所阐述的方法,通过将标记基团、连接体或诸如此类引入至除化合物的活性表达所必需的结构部位以外的部分中而转变成亲和色谱法探针、光亲和性探针或诸如此类。

[0079] 所述化学探针中所使用的标记基团、连接体或诸如此类的实例包括属以下群组(1)至(5)的基团。(1)蛋白质标记基团,例如光亲和性标记基团(例如苯甲酰基、二苯甲酮基团、叠氮基团、羰基叠氮基团、二氮杂环丙烷基团、烯酮基团、重氮基团及硝基)及化学亲和性基团(例如其中 $\alpha$ 碳原子由卤素原子取代的酮基、氨甲酰基、酯基、烷硫基、 $\alpha,\beta$ -不饱和酮、酯或诸如此类的迈克尔(Michael)受体及环氧乙烷基团);(2)可裂解的连接体,例如S-S、O-Si-O、单糖(例如葡萄糖基或半乳糖基)及二糖(例如乳糖)以及可由酶反应裂解的寡肽连接体;(3)采捕标记(fishing tag)基团,例如生物素及3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮杂-4-硼-对称-引达省-3-基)丙酰基(3-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indacene-3-yl)propionyl group);(4)放射性标记基团,例如<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H及<sup>14</sup>C;荧光标记基团,例如荧光素、玫瑰红、丹磺酰(dansyl)、伞形酮、7-硝基呋咱基及3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮杂-4-硼-对称-引达省-3-基)丙酰基;化学发光基团,例如萤光素及鲁米诺;及能够检测重金属离子(例如镧系金属离子及镉离子)的标记物;及(5)键结至诸如玻璃珠粒、玻璃床、微升板、琼脂糖珠粒、琼脂糖床、聚苯乙烯珠粒、聚苯乙烯床、尼龙珠粒及尼龙床等固相载体的基团。

[0080] 通过上文所提及的文献或诸如此类中的任一个中所阐述的方法,通过将选自上文所述群组(1)至(5)的标记基团或诸如此类引入至本发明的化合物中所制备的探针可用作化学探针,用于鉴别可用于研究新颖潜在药物靶标的标记物蛋白。

[0081] 本文中所使用“盐”的实例包括与无机酸的盐、与有机酸的盐及与酸性氨基酸的盐,且尤其优选药学上可接受的盐。此外,本发明的化合物的盐囊括其药学上可接受的盐的无水合物及药学上可接受的盐的溶剂合物(例如水合物)。与无机酸的盐的优选实例包括与盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及诸如此类的盐,且与有机酸的盐的优选实例包括与乙酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、硬脂酸、苯甲酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对

甲苯磺酸及诸如此类的盐。与酸性氨基酸的盐的优选实例包括与天冬氨酸及谷氨酸及诸如此类的盐。

[0082] 在其中本发明的化合物(1)是作为化合物(1)的盐或化合物(1)的水合物形式获得的情形下,该盐及该水合物可通过惯用方法转化成化合物(1)的游离体。

[0083] 药物组合物、试剂盒及给药

[0084] 本发明提供药物组合物,其包含化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物,及药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,本文所阐述的化合物或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物是以有效量提供于药物组合物中(例如治疗有效量)。

[0085] 本文所阐述的药物组合物可通过药学所已知的任何方法来制备。一般而言,这些制备方法包括使化合物(1)(即,“活性成分”)与载体或赋形剂和/或一种或多种其它辅助性成分缔合,且然后若需要和/或期望,则将产品成型和/或包装成期望的单一剂量或多剂量单元。本发明的药物组合物可根据已知方法来制备,例如日本药典(Japanese Pharmacopoeia)第16版、美国药典(United States Pharmacopoeia)及欧洲药典(European Pharmacopoeia)第9版的制备一般规则中所阐述的方法。取决于剂型而定,本发明的药物组合物可适当地给予患者。

[0086] 药物组合物可以散装、作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量来制备、包装和/或出售。“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于向受试者给予的活性成分的剂量和/或所述剂量的便捷分率(例如所述剂量的二分之一或三分之一)。

[0087] 本文所阐述药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其它成分的相对量将根据所治疗受试者的属性(identity)、体型和/或状况且进一步根据组合物的给予途径而有所变化。组合物可包含介于0.1%与100%(w/w)之间的活性成分。

[0088] 所提供药物组合物的制备中所使用的药学上可接受的赋形剂包括惰性稀释剂、分散剂和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。组合物中也可存在赋形剂(例如可可脂及栓剂蜡)、着色剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂及芳香剂。

[0089] 本文中所提供的化合物通常配制为剂量单位形式以便于给药及统一剂量。然而,应理解,本文所阐述组合物的总日用量将由医师在合理的医学判断范围内确定。任何特定受试者或生物体的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的疾病及病症的严重程度;所用特定活性成分的活性;所用特定组合物;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别及饮食;所用特定活性成分的给药时间、给药途径及排泄速度;治疗的持续时间;与所用特定活性成分组合或同时使用的药物;以及医学领域所熟知的类似因素。

[0090] 本文中所提供的本发明的化合物(化合物(1))及其组合物可通过任何途径给予,包括经肠(例如口服)、肠胃外、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、室内、经皮、皮肤内(interdermal)、经直肠、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉末、软膏剂、乳霜剂和/或滴剂)、经粘膜、经鼻、含服、舌下;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;和/或作为口服喷雾剂、经鼻喷雾剂和/或气溶胶。具体涵盖的途径是口服给药、静脉内给药(例如,全身性静脉内注射)、经由血液和/或淋巴供应的局部给药和/或直接给药至受影响部位。一般而言,最适当

的给药途径将取决于多种因素,包括药剂的性质(例如,其在胃肠道环境中的稳定性)和/或受试者的状况(例如,受试者是否能够耐受口服给药)。

[0091] 得到有效量所需的化合物(1)的准确量将在受试者之间有所不同,此取决于(例如)受试者的物种、年龄及一般状况、副作用或病症的严重程度、具体化合物的属性、给药模式及诸如此类。有效量可包括于单一剂量(例如单一口服剂量)或多个剂量(例如多个口服剂量)中。在某些实施方案中,当将多个剂量给予受试者或施加至组织或细胞时,该多个剂量中的任两个剂量包括不同或实质上相同量的本文所阐述的化合物。在某些实施方案中,当将多个剂量给予受试者或施加至组织或细胞时,在非限制性实例中,向受试者给予多个剂量或将多个剂量施加至组织或细胞的频率可是一天三剂、一天两剂、一天一剂、每隔一天一剂、每隔两天一剂、每周一剂、每两周一剂、每三周一剂或每四周一剂或甚至使用药物递送装置在选定时间段内缓慢剂量控制递送。在某些实施方案中,向受试者给予多个剂量或将多个剂量施加至组织或细胞的频率是每天一剂。在某些实施方案中,向受试者给予多个剂量或将多个剂量施加至组织或细胞的频率是每天两剂。在某些实施方案中,向受试者给予多个剂量或将多个剂量施加至组织或细胞的频率是每天三剂。在某些实施方案中,当将多个剂量给予受试者或施加至组织或细胞时,该多个剂量的第一剂与最后一剂之间的持续时间是约或至少一天、两天、四天、一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、六个月、九个月、一年、两年、三年、四年、五年、七年、十年、十五年、二十年或受试者、组织或细胞的整个生命阶段。在某些实施方案中,该多个剂量的第一剂与最后一剂之间的持续时间是约或至少三个月、六个月或一年。在某些实施方案中,该多个剂量的第一剂与最后一剂之间的持续时间是受试者、组织或细胞的整个生命阶段。在某些实施方案中,本文所阐述的剂量(例如单一剂量或多个剂量的任何剂量)独立地包括介于0.001mg/kg与0.01mg/kg之间、介于0.01mg/kg与0.1mg/kg之间或介于0.1mg/kg与1mg/kg之间的化合物(1)(包括端值)。实例是在剂型中具有至少约0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1mg、1.5mg、2mg、2.5mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg或50mg的活性化合物或其盐的剂型。

[0092] 如本文所阐述的剂量范围为向成人给予所提供的药物组合物提供指导。欲给予(例如)儿童或青少年的量可由执业医师或本领域技术人员确定,且可低于给予成人的量或与给予成人的量相同。

[0093] 本披露内容也涵盖试剂盒(例如药物包装)。所提供的试剂盒可包含药物组合物或化合物(1)及容器(例如小瓶、安瓿、瓶、注射器和/或分配器包装或其它适宜容器)。在一些实施方案中,所提供的试剂盒可任选进一步包括第二容器,其包含用于稀释或悬浮药物组合物或化合物(1)的药物赋形剂。在一些实施方案中,将第一容器及第二容器中所提供的药物组合物或化合物(1)组合以形成一个单位剂型。本文所阐述的试剂盒可包括一种或多种本文所阐述的额外药剂作为单独的组合物。

[0094] 治疗方法及用途

[0095] 如本文所示,化合物(1)具有显著的肿瘤血管重塑效应及抗CAF活性,且因此,其具有用于治疗癌症和/或抑制肿瘤生长的潜在用途。

[0096] 本文中提供治疗受试者的癌症的方法,该方法包含向该受试者给予有效量的化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物。本发明也提供化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物,其用于治疗受

试者的癌症。本发明也提供化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物的用途,其用于制备用于治疗癌症的药剂。

[0097] 本文中也提供抑制受试者中肿瘤生长的方法,该方法包含向该受试者给予化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物。本文中也提供化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物,其用于抑制受试者中的肿瘤生长。本发明也提供化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物的用途,其用于制备用于抑制肿瘤生长的药剂。

[0098] 在本文中所提供的方法及用途的某些实施方案中,癌症是头颈癌、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、小肠癌、膀胱癌或肉瘤。

[0099] 在本文中所提供的方法及用途的某些实施方案中,癌症是头颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌、口腔癌、喉癌、唾液腺癌、舌癌、腺样囊性癌)。在某些实施方案中,癌症是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)。在某些实施方案中,癌症是腺样囊性癌。在某些实施方案中,癌症是乳腺癌(例如HER2阳性乳腺癌、三阴性乳腺癌)。在某些实施方案中,癌症是HER2阳性乳腺癌。在某些实施方案中,癌症是三阴性乳腺癌。在某些实施方案中,癌症是结肠直肠癌(例如结肠癌)。在某些实施方案中,癌症是结肠癌。在某些实施方案中,癌症是食管癌(例如食管腺癌)。在某些实施方案中,癌症是食管腺癌。在某些实施方案中,癌症是子宫癌(例如子宫肉瘤)。在某些实施方案中,癌症是子宫肉瘤。在某些实施方案中,癌症是卵巢癌。在某些实施方案中,癌症是肉瘤(例如子宫肉瘤、纤维肉瘤、血管肉瘤、滑膜肉瘤、软组织癌)。在某些实施方案中,癌症是纤维肉瘤。在某些实施方案中,癌症是血管肉瘤。在某些实施方案中,癌症是滑膜肉瘤。在某些实施方案中,癌症是软组织癌。在某些实施方案中,癌症是胃癌。在某些实施方案中,癌症是肠癌(例如小肠癌、小肠腺癌)。在某些实施方案中,癌症是小肠癌。在某些实施方案中,癌症是小肠腺癌。在某些实施方案中,癌症是膀胱癌(例如泌尿道上皮癌)。在某些实施方案中,癌症是泌尿道上皮癌。在某些实施方案中,癌症是子宫内膜癌。在某些实施方案中,癌症是罕见癌症。

[0100] 组合疗法

[0101] 除作为单一疗法给药以外,化合物(1)可与其它治疗剂或治疗方式组合给药。在某些实施方案中,额外治疗剂是抗体。在某些实施方案中,额外治疗剂是单克隆抗体。本发明的化合物可与另一治疗剂组合给予,该另一治疗剂是例如抗EGFR疗法、抗HER2疗法、抗PD-1疗法、抗PD-L1疗法或辐照疗法。

[0102] 在某些实施方案中,化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物是与抗EGFR疗法(例如抗EGFR单克隆抗体(mAb),例如西妥昔单抗)组合给予。在某些实施方案中,抗EGFR疗法是抗EGFR抗体。举例而言,本文中提供治疗受试者的头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)的方法,其包括向该受试者给予化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物与抗EGFR(表皮生长因子受体)mAb疗法的组合。在某些实施方案中,抗EGFR mAb是西妥昔单抗(CTX)。

[0103] 在某些实施方案中,化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物是与抗HER2疗法(例如抗HER2单克隆抗体(mAb),例如曲妥珠单抗)组合给予。在某些实施方案中,抗HER2疗法是抗HER2抗体。举例而言,本文中提供治疗有需要的受试者的乳腺癌的方法,其包括向该受试者给予化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位

素标记的衍生物或其组合物与HER2(人类表皮生长因子受体)mAb疗法的组合。在某些实施方案中,抗HER2 mAb是曲妥珠单抗。

[0104] 在某些实施方案中,化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物是与抗PD-1或抗PD-L1疗法(例如抗PD-1或抗PD-L1单克隆抗体)组合给予。在某些实施方案中,抗PD-1或抗PD-L1疗法是抗体。举例而言,本文中提供治疗有需要的受试者的结肠直肠癌的方法,其包括向该受试者给予化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其组合物与抗PD-1或抗PD-L1疗法(例如mAb疗法)的组合。

[0105] 在某些实施方案中,化合物(1)或其药学上可接受的盐或经同位素标记的衍生物或其药物组合物是与放射疗法(RT)组合使用。在某些实施方案中,化合物是与手术组合给予。

[0106] 实施例

[0107] 化合物(1)的合成

[0108] 一般程序及方法

[0109] 根据本发明的化合物可通过下文实施例中所述的方法来产生。然而,所述实施例仅是出于说明性目的,且根据本发明的化合物并不以任何方式限于下文所提及的具体实施例。

[0110] 在实施例中,除非另有明确提及,否则通过使用硅胶柱色谱法进行纯化的硅胶是Hi-Flash™柱(硅胶,30μm 60 Å或40μm 60 Å, Yamazen Corporation),通过使用NH硅胶柱色谱法进行纯化的硅胶是Chromatorex NH硅胶(Fuji Silysia Chemical LTD)。分析型薄层色谱法(TLC)是以TLC硅胶60F<sub>254</sub>,层厚度0.25mm(Merck KGaA)或Chromatorex TLC NH硅胶F<sub>254</sub>,层厚度0.25mm(Fuji Silysia Chemical LTD)来实施。通过利用对甲氧基苯甲醛染色剂、磷钼酸染色剂或Hanessian染色剂染色来使TLC板可视化。

[0111] 所有湿度敏感性反应均是在惰性氛围下进行。除非另有注明,否则试剂及溶剂为市售等级且原样使用。

[0112] NMR光谱是在JEOL ECZ500R(500MHz)、JEOL ECZ400S(400MHz)、Varian Inova 500(500MHz)、Varian Mercury 400(400MHz)或Bruker Avance(600MHz)光谱仪上记录。化学位移是以百万分率(ppm)报告。对于<sup>1</sup>H NMR光谱(CDCl<sub>3</sub>、C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>和/或CD<sub>3</sub>OD),残余溶剂峰用作内部参考(于CDCl<sub>3</sub>中7.27ppm;于C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>中7.16ppm;于CD<sub>3</sub>OD中3.31ppm)。

[0113] 分析型质谱(MS)结果是使用配备有单一四极检测器(SQ检测器2)或LTQ Orbitrap XL™(ThermoScientific)的Waters Acquity UPLC获得。

[0114] 高效液相色谱法(HPLC)是利用Shimadzu LC-10AD在UV分光亮度检测器(200nm, Shimadzu SPD-10A)上实施。

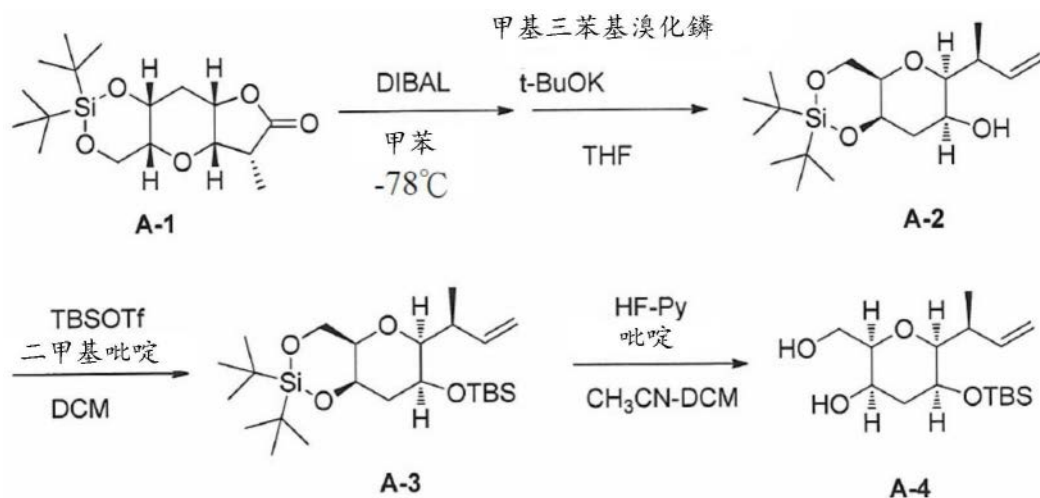
[0115] 本文中所使用的缩写如下:AIBN:2,2'-偶氮二(异丁腈);9-BBN:9-硼杂双环[3.3.1]壬烷;Bu<sub>3</sub>SnH:三正丁基锡氢化物;(+) -CSA:(1S) - (+) -10-樟脑磺酸;DMAP:4-二甲氨基吡啶;DCM:二氯甲烷;DDQ:2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌;DIBAL:二异丁基氢化铝;DMF:N,N-二甲基甲酰胺;DMSO:二甲亚砜;Et<sub>3</sub>N:三乙胺;EtOAc:乙酸乙酯;HF-吡啶:氟化氢吡啶;HPLC:高效液相色谱法;IPA:异丙醇;MeCN:乙腈;MeOH:甲醇;MPM:对甲氧基苄基;PPh<sub>3</sub>:三苯基膦;t-BuOH:叔丁基醇;tBuLi:叔丁基锂;TBME:甲基叔丁基醚;TBAF:四丁基氟化铵;TBS:叔丁基二甲基甲硅烷基;THF:四氢呋喃;TMS:三甲基甲硅烷基;Ts:对甲苯磺酰



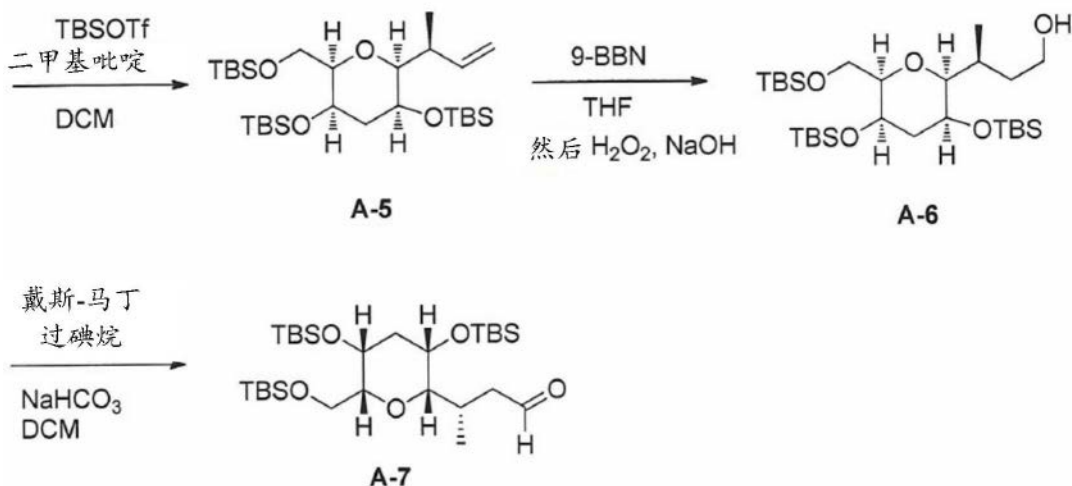
基。

[0116] 本文中所披露的合成中间体视为本发明的一部分。

[0117] 方案A;化合物A-7的制备

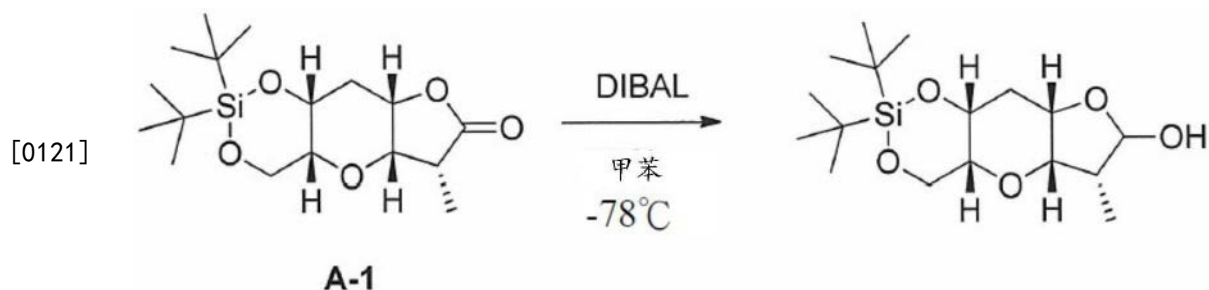


[0118]



[0119] 实施例1

[0120] (4aR,5aS,6R,8aS,9aR) -2,2-二-叔丁基-6-甲基八氢呋喃并[2',3':5,6]吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯(dioxasilin) -7-醇

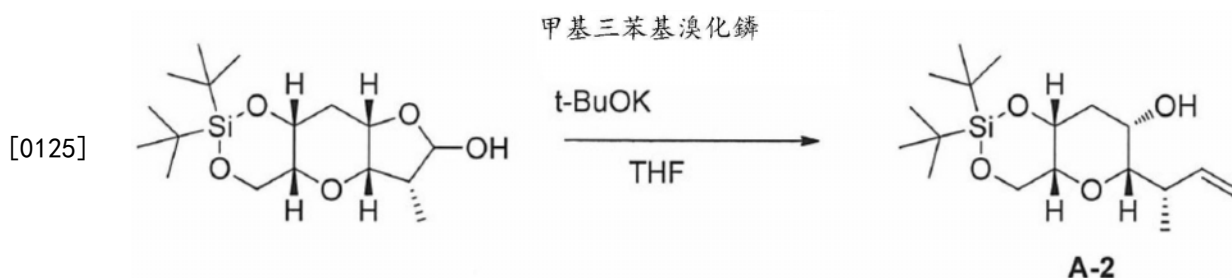


[0122] 在氮气环境中,在 $-78^{\circ}\text{C}$ 经30min向通过Organic Letters (2009),11 (2),409-412中所写的方法获得的化合物A-1: (4aR,5aS,6R,8aS,9aR) -2,2-二-叔丁基-6-甲基六氢呋喃并[2',3':5,6]吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-7 (8aH) -酮(A-1 18.5g, 54.0mmol) (CAS编号;1095280-04-8) 于甲苯(275mL)中的溶液添加DIBAL (70.2mL,

70.2mmol, 1.0M甲苯溶液)。然后将反应混合物在-78℃搅拌。90min后,在-78℃小心地用MeOH(4.37mL)使反应淬灭,然后移除冷却浴。将饱和四水合酒石酸钾钠溶液(300mL)添加至反应混合物,在室温继续搅拌2小时。将反应混合物倾倒入分液漏斗中,然后分离各层。用EtOAc(300mL)萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水(300mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。粗制内半缩醛不经纯化即用于下一反应。

[0123] 实施例2

[0124] (4aR,6S,7S,8aR) -6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-叔丁基六氢吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-7-醇(化合物A-2)

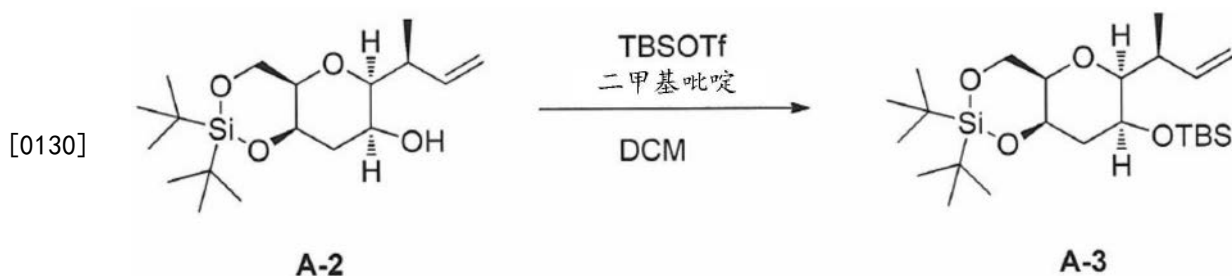


[0126] 在氮气环境中,在-5℃经10min向甲基三苯基溴化磷(73.30g, 205.2mmol)于THF(200mL)中的悬浮液添加叔丁醇钾(17.27g, 153.9mmol),然后在-5℃搅拌60min。在-5℃经10min将于THF(40mL)中的实施例1中所阐述的粗制内半缩醛溶液转移至反应混合物,然后在-5℃搅拌1小时,在室温搅拌1小时。用冰水(400mL)使反应混合物淬灭,然后用TBME(400mL)稀释且然后分离各层。用TBME(400mL)萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水(400mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。将残余物用庚烷/EtOAc=1/1(100mL)悬浮。将所得悬浮液过滤,用庚烷/EtOAc=1/1(100mL)冲洗以去除源自三苯基磷的物质。然后将滤液在减压下浓缩。使用0%至20%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶(400g, 硅胶60, 球形, 40-50μm, Kanto Chemical)上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-2, 16.7g, 90%产率)。

[0127] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 1.03(d, J=6.8Hz, 3H) 1.05(s, 9H) 1.07(s, 9H) 1.75(dt, J=14.5, 3.0Hz, 1H) 2.37(dt, J=14.5, 2.9Hz, 1H) 2.65-2.76(m, 1H) 3.03(dd, J=9.8, 1.0Hz, 1H) 3.31(m, 1H) 3.69(d, J=15.0Hz, 1H) 3.75-3.79(m, 1H) 4.16-4.31(m, 2H) 4.41(t, J=2.9Hz, 1H) 4.95-5.09(m, 2H) 6.02(ddd, J=17.3, 10.5, 6.3Hz, 1H)。

[0128] 实施例3

[0129] (4aR,6S,7S,8aR) -6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-叔丁基-7-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)六氢吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯(化合物A-3)



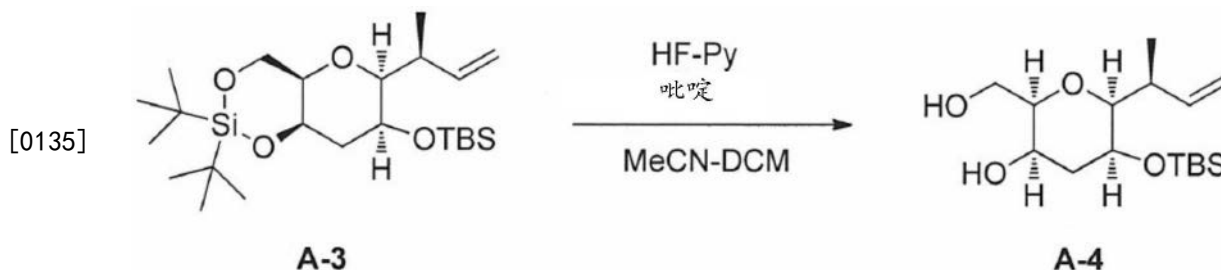
[0131] 在氮气环境中,在0℃向实施例2中所阐述的化合物A-2: (4aR,6S,7S,8aR) -6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-叔丁基六氢吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯-7-

醇(9.85g, 28.8mmol)于DCM(150mL)中的溶液添加2,6-二甲基吡啶(6.68mL, 57.5mmol)及三氟甲磺酸叔丁基二甲基甲硅烷基酯(9.25mL, 40.3mmol)。将反应混合物在0℃搅拌30min,然后在室温搅拌2小时。将反应混合物用二乙醚稀释。将有机层先后用0.5N HCl水溶液、饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液和盐水洗涤。使合并的有机层经MgSO<sub>4</sub>干燥、过滤(少量的SiO<sub>2</sub>)且在减压下浓缩。使用0%至15%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-3, 12.0g, 91%产率)。

[0132] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.10 (s, 3H) 0.19 (s, 3H) 0.91 (s, 9H) 0.96 (d, J=6.3Hz, 3H) 1.02 (s, 9H) 1.06 (s, 9H) 1.73 (dt, J=15.0, 4.0Hz, 1H) 2.26 (dt, J=15.0, 2.5Hz, 1H) 2.66-2.74 (m, 1H) 2.95 (dd, J=9.5, 2.2Hz, 1H) 3.17 (m, 1H) 3.81-3.84 (m, 1H) 4.12-4.22 (m, 2H) 4.24 (t, J=2.7Hz, 1H) 4.93-5.06 (m, 2H) 6.08 (ddd, J=17.3, 10.5, 6.3Hz, 1H)。

[0133] 实施例4

[0134] (2R, 3R, 5S, 6S) -6-((S)-丁-3-烯-2-基)-5-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-3-醇(化合物A-4)

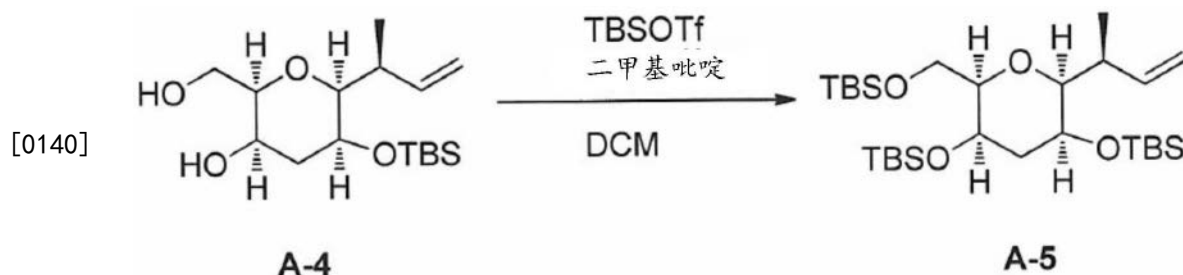


[0136] 在氮气环境中,在-10℃向实施例3中所阐述的化合物A-3:(4aR, 6S, 7S, 8aR) -6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二叔丁基-7-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)六氢吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧杂硅杂环己三烯(12g, 26.3mmol)于MeCN(120mL)及DCM(40mL)中的溶液添加HF-吡啶(4.0mL)及吡啶(20mL)于20mL MeCN中的预混合溶液。将反应混合物在-10℃搅拌15min,然后在室温搅拌1小时。在0℃用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液使反应混合物淬灭且用DCM稀释,然后分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤。使合并的有机层经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,且在减压下浓缩。使用15%至60%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-4, 8.4g, 定量产率)。

[0137] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.13 (s, 3H) 0.19 (s, 3H) 0.94 (s, 9H) 0.96 (d, J=6.8Hz, 3H) 1.72 (dt, J=14.6, 2.9Hz, 1H) 2.15 (dd, J=9.8, 2.4Hz, 1H) 2.23 (dt, J=14.6, 2.9Hz, 1H) 2.55-2.65 (m, 1H) 3.03 (d, J=9.8Hz, 1H) 3.41-3.46 (m, 1H) 3.49 (d, J=11.7Hz, 1H) 3.62-3.72 (m, 2H) 3.92 (ddd, J=11.7, 8.3, 2.4Hz, 1H) 4.02 (t, J=2.7Hz, 1H) 5.01-5.12 (m, 2H) 5.93 (ddd, J=17.4, 10.4, 7.3Hz, 1H)。

[0138] 实施例5

[0139] (((2S, 3S, 5R, 6R) -2-((S)-丁-3-烯-2-基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-3,5-二基)二(氧基))二(叔丁基二甲基甲硅烷)(化合物A-5)

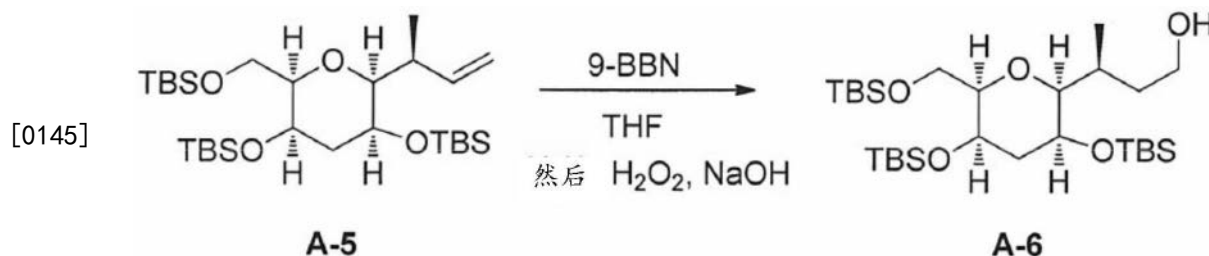


[0141] 在氮气环境中,在5℃向实施例4中所阐述的化合物A-4:(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-5-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-2-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-3-醇(997mg,3.15mmol)于DCM(10mL)中的溶液添加2,6-二甲基吡啶(1.83mL,15.8mmol)及三氟甲磺酸叔丁基二甲基甲硅烷基酯(2.17mL,9.45mmol)。将反应混合物在室温搅拌5小时。将反应混合物用二乙醚稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液淬灭,然后分离各层。相继用0.5NHCl水溶液、饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液且然后盐水洗涤合并的有机萃取物。使有机层经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至5%EtOAc/庚烷(含有1%Et<sub>3</sub>N)使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-5,1.69g,98%产率)。

[0142] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.02-0.08 (m, 15H) 0.11 (s, 3H) 0.89 (s, 9H) 0.90-0.92 (m, 18H) 0.94 (d, J=6.8Hz, 3H) 1.82 (dt, J=14.9, 4.8Hz, 1H) 2.00 (dt, J=14.9, 2.9Hz, 1H) 2.62-2.72 (m, 1H) 2.93 (dd, J=9.3, 2.0Hz, 1H) 3.27-3.34 (m, 1H) 3.66-3.79 (m, 3H) 3.83-3.87 (m, 1H) 4.91-5.07 (m, 2H) 6.11 (ddd, J=17.3, 10.7, 6.1Hz, 1H)。

[0143] 实施例6

[0144] (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)丁-1-醇(化合物A-6)



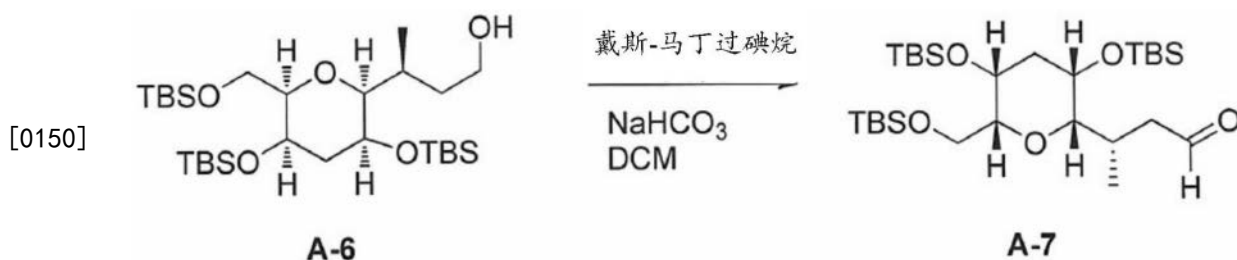
[0146] 在0℃向实施例5中所阐述的化合物A-5:(((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-丁-3-烯-2-基)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-3,5-二基)二(氧基))二(叔丁基二甲基甲硅烷基)(1.32g,2.42mmol)于THF(10mL)中的溶液添加9-BBN(9.69mL,0.5M THF溶液,4.84mmol)。将反应混合物在0℃搅拌1小时且在室温搅拌1.5小时。在0℃将3.0M NaOH水溶液(3mL,9.00mmol)及过氧化氢(于水中35%,3mL)添加至反应混合物。将反应混合物在0℃搅拌30min,然后在室温搅拌1小时。用饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>水溶液使反应混合物淬灭且然后分离各层。用EtOAc萃取水层(3次)。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至20%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-6,1.36g,100%产率)。

[0147] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.03 (s, 3H) 0.05-0.08 (m, 12H) 0.10 (s, 3H) 0.88 (d, J=6.8Hz, 3H) 0.89-0.93 (m, 27H) 1.55-1.65 (m, 1H) 1.82 (dt, J=15.4, 4.4Hz, 1H) 1.87-1.96 (m, 1H) 1.97-2.03 (m, 1H) 2.17-2.26 (m, 1H) 2.67 (dd, J=7.8, 3.9Hz, 1H) 2.98-3.10 (m, 1H)

3.34-3.40 (m, 1H) 3.59-3.86 (m, 6H)。ESI-MS (m/z): 563.64 [M+H]<sup>+</sup>, 585.62 [M+Na]<sup>+</sup>

[0148] 实施例7

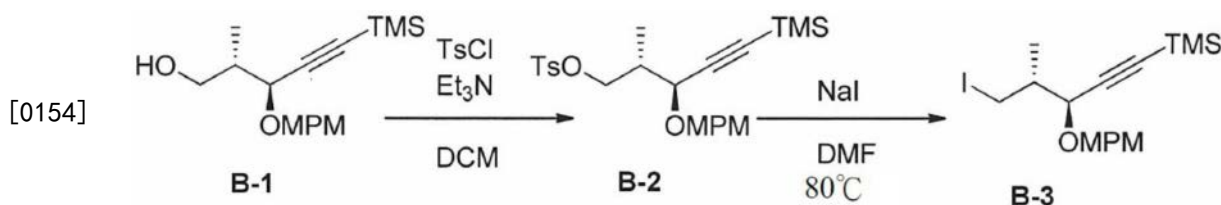
[0149] (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)丁醛(化合物A-7)



[0151] 在氮气环境中,在5℃向实施例6中所阐述的化合物A-6:(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)丁-1-醇(1100mg,1.954mmol)于DCM(30mL)中的溶液添加NaHCO<sub>3</sub>(41.0mg,0.49mmol)及戴斯-马丁过碘烷(1077mg,2.54mmol)。将反应混合物在室温搅拌。3小时后,将反应混合物用DCM稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液及饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>水溶液淬灭,然后分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至25%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物A-7,950mg,87%产率)。

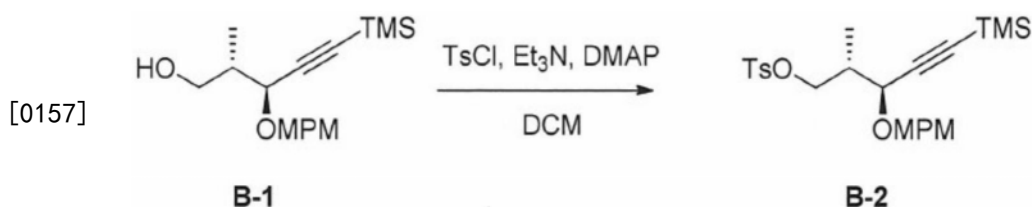
[0152] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d)δppm 0.00(s,3H)0.03-0.08(m,12H)0.11(s,3H)0.88(s,9H)0.91-0.92(m,21H)1.82(dt,J=15.0,4.5Hz,1H)2.01(dt,J=15.0,2.5Hz,1H)2.28(ddd,J=16.0,7.3,2.4Hz,1H)2.53-2.58(m,1H)2.74(ddd,J=16.0,5.5,2.0Hz,1H)2.94(dd,J=9.0,1.7Hz,1H)3.29(td,J=5.9,2.0Hz,1H)3.68(d,J=5.9Hz,2H)3.75-3.82(m,1H)3.82-3.90(m,1H)9.73(t,J=2.4Hz,1H)。

[0153] 方案B;化合物B-3的制备



[0155] 实施例8

[0156] (2S,3S)-4-甲基苯磺酸3-((4-甲氧基苄基)氧基)-2-甲基-5-(三甲基甲硅烷基)戊-4-炔-1-基酯(化合物B-2)



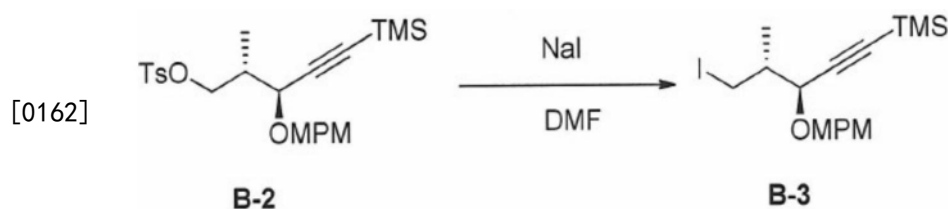
[0158] 在氮气环境中,在室温向通过W0 9317690 A1/US 5436238 A中所写的方法获得的化合物B-1:(2S,3S)-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-2-甲基-5-(三甲基甲硅烷基)戊-4-炔-1-醇(11.08g,36.15mmol)(CAS编号;157323-41-6)于DCM(330mL)中的溶液添加Et<sub>3</sub>N(12.6mL,

90.4mmol) 及对甲苯磺酰氯 (8.27g, 43.4mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜。将该混合物用饱和NaHCO<sub>3</sub>及盐水洗涤, 经MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 然后在减压下浓缩。使用0%至10%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法(硅胶60, 球形, 40-50μm, Kanto Chemical), 得到标题化合物(化合物B-2, 17.7g, 93%产率)。

[0159] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.17 (s, 9H) 1.02 (d, J=6.8Hz, 3H) 2.10-2.18 (m, 1H) 2.44 (s, 3H) 3.82 (s, 3H) 3.99 (d, J=6.8Hz, 1H) 4.04-4.07 (m, 2H) 4.33 (d, J=11.2Hz, 1H) 4.66 (d, J=11.2Hz, 1H) 6.87 (d, J=8.3Hz, 2H) 7.21 (d, J=8.3Hz, 2H) 7.33 (d, J=8.8Hz, 2H) 7.77 (d, J=8.8Hz, 2H)。

[0160] 实施例9

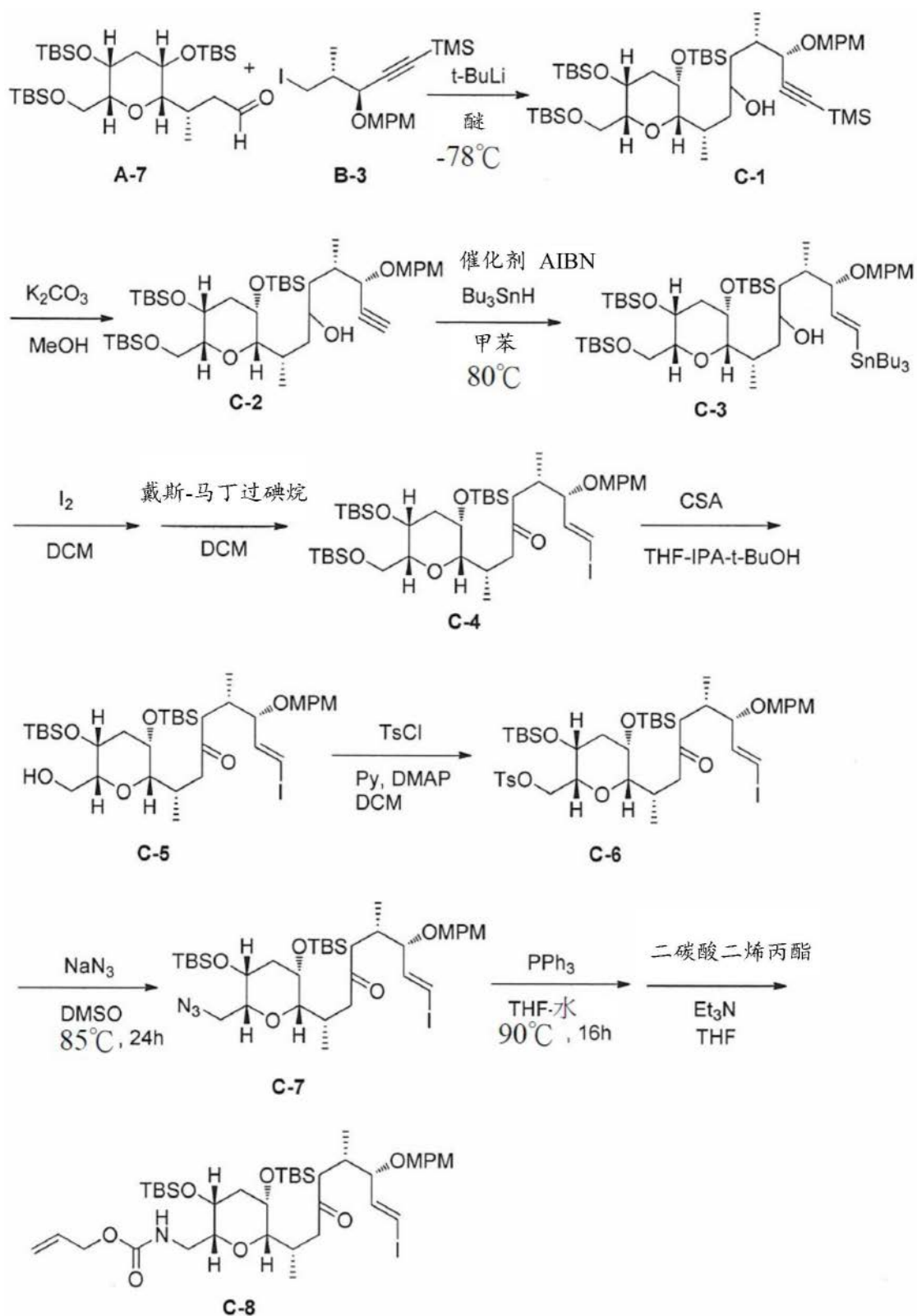
[0161] ((3S, 4R) -5-碘-3-((4-甲氧基苄基) 氧基) -4-甲基戊-1-炔-1-基) 三甲基甲硅烷(化合物B-3)



[0163] 在氮气环境中, 在室温向实施例8中所阐述的化合物B-2: (2S, 3S) -4-甲基苯磺酸3-((4-甲氧基苄基) 氧基) -2-甲基-5-(三甲基甲硅烷基) 戊-4-炔-1-基酯 (17.7g, 38.4mmol) 于DMF (360mL) 中的溶液添加NaI (7.49g, 50.0mmol)。将反应混合物在80℃搅拌2小时。再向该反应混合物添加2.0g NaI。将反应在80℃搅拌1.5小时, 然后冷却至室温。将混合物用二乙醚稀释, 用水及盐水洗涤, 经MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤且在减压下浓缩。使用10%至20% EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法(硅胶60, 球形, 40-50μm, Kanto Chemical), 得到标题化合物(化合物B-3, 14.3g, 89%产率)。

[0164] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.21 (s, 9H) 1.10 (d, J=6.8Hz, 3H) 1.74-1.84 (m, 1H) 3.30-3.37 (m, 2H) 3.82 (s, 3H) 3.96 (d, J=7.3Hz, 1H) 4.44 (d, J=11.2Hz, 1H) 4.73 (d, J=11.2Hz, 1H) 6.89 (d, J=8.8Hz, 2H) 7.30 (d, J=8.8Hz, 2H)。

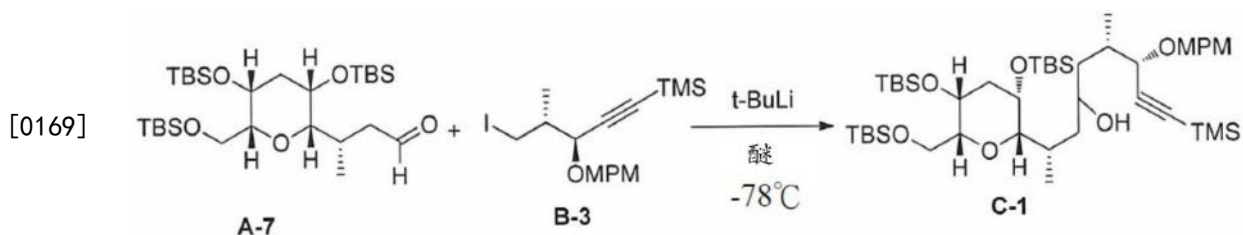
[0165] 方案C; 化合物C-8的制备



[0167] 实施例10

[0168] (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三甲基甲硅烷基)壬-8-炔-4-醇(化合物C-1)



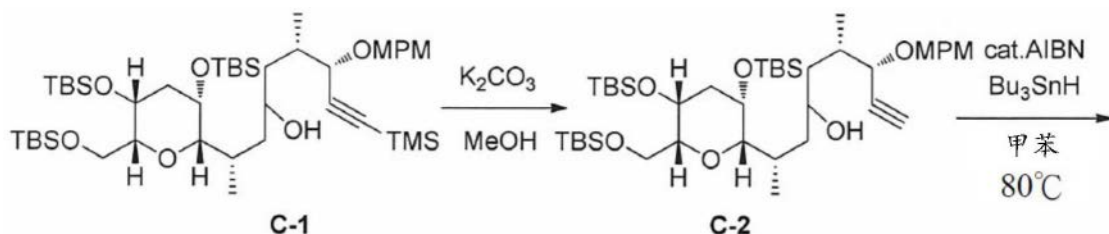


[0170] 在氩气环境下,在-78℃向实施例9中所阐述的化合物B-3:((3S,4R)-5-碘-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-4-甲基戊-1-炔-1-基)三甲基甲硅烷(1408mg,3.382mmol)于二乙醚(25mL)中的溶液添加叔丁基锂(于戊烷中1.61M,4.11mL,6.62mmol)。将反应混合物在-78℃搅拌45min。在-78℃将实施例7中所阐述的于5.0mL二乙醚中的化合物A-7:(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)丁醛(825mg,1.47mmol)添加至反应混合物。将反应混合物在-78℃搅拌60min。用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液使反应混合物淬灭。将有机层用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,然后在减压下浓缩。使用0%至25%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-1,1167mg,93%产率)。

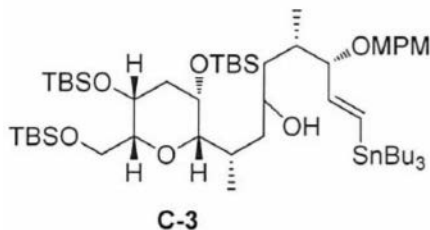
[0171] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d) δppm 0.00-0.12(m,21H) 0.15-0.24(m,6H) 0.82-0.96(m,30H) 1.03(d,J=6.3Hz,3H) 1.38-1.55(m,1H) 1.68-1.99(m,4H) 2.10-2.30(m,2H) 2.76-2.87(m,1H) 3.15(d,J=9.75Hz,1H) 3.33-3.38(m,1H) 3.56-4.02(m,9H) 4.37-4.50(m,1H) 4.64-4.78(m,1H) 6.83-6.88(m,2H) 7.23-7.35(m,2H)。

[0172] 实施例11

[0173] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三丁基锡烷基)壬-8-烯-4-醇(化合物C-3)



[0174]



[0175] 在20℃向实施例10中所阐述的化合物C-1:(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三甲基甲硅烷基)壬-8-炔-4-醇(1165mg,1.37mmol)于MeOH(20mL)中的溶液添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(189mg,1.37mmol)。将反应混合物在20℃搅拌2小时。将反应混合物用EtOAc稀释并用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭,然后分离各层。用EtOAc萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至



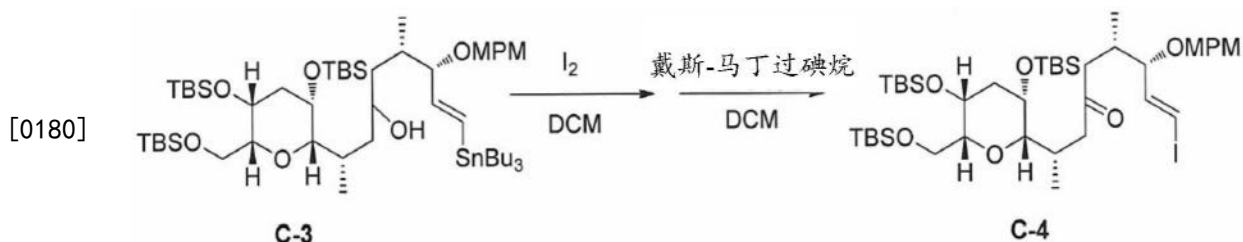
15%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到化合物C-2: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-炔-4-醇(1050mg,98%产率)。ESI-MS(m/z):801.50[M+Na]<sup>+</sup>

[0176] 在氮气环境中,在20℃向上文所获得的化合物C-2: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-炔-4-醇(780mg,1.00mmol)于甲苯(15mL)中的溶液添加三正丁基锡氢化物(2.5mL,9.36mmol)及2,2'-偶氮二(异丁腈)(82mg,0.50mmol)。将反应混合物在90℃搅拌15min。将反应混合物在减压下浓缩。使用0%至15%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-3,970mg,91%产率)。

[0177] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d) δppm 0.02-0.13(m,18H) 0.84-0.96(m,48H) 1.22-1.37(m,6H) 1.47-1.56(m,7H) 1.72-1.90(m,3H) 1.95-2.03(m,1H) 2.11-2.28(m,2H) 2.82-2.86(m,1H) 3.08-3.15(m,1H) 3.33-3.40(m,1H) 3.43-3.53(m,1H) 3.58-3.87(m,8H) 4.25-4.31(m,1H) 4.49-4.54(m,1H) 5.83(dd,J=19.3,7.6Hz,1H) 6.05-6.13(m,1H) 6.83-6.90(m,2H) 7.24(d,J=8.8Hz,2H)。

[0178] 实施例12

[0179] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-4)



[0181] 在氮气环境中,在5℃向实施例11中所阐述的化合物C-3: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三丁基锡烷基)壬-8-烯-4-醇(970mg,0.91mmol)于30mL DCM中的溶液添加于DCM(6mL)中的碘(242mg,0.95mmol),直至其维持碘颜色不变为止。用饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>水溶液使反应混合物淬灭且分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤。使合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至25%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-醇(768mg,93%产率)。

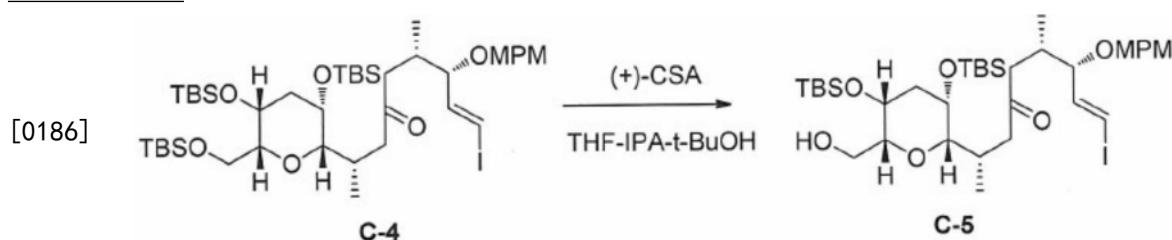
[0182] 在氮气环境中,在室温向上文所获得的(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-醇(768mg,0.85mmol)于DCM(25mL)中的溶液添加NaHCO<sub>3</sub>(17.8mg,0.21mmol)及戴斯-马丁过碘烷(485mg,1.14mmol)。将

反应混合物在室温搅拌4小时。将反应混合物用DCM稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液及饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>水溶液淬灭,且然后分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至20%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-4,776mg,定量产率)。

[0183] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.00 (s, 3H) 0.03-0.07 (m, 12H) 0.10 (s, 3H) 0.81 (d, J=6.3Hz, 3H) 0.84 (d, J=6.3Hz, 3H) 0.89 (s, 9H) 0.91 (s, 9H) 0.92 (s, 9H) 1.80 (dt, J=15.0, 4.5Hz, 1H) 1.99 (dt, J=15.0, 2.5Hz, 1H) 2.17 (dd, J=16.6, 10.2Hz, 1H) 2.20-2.29 (m, 2H) 2.43-2.48 (m, 1H) 2.54 (d, J=12.7Hz, 1H) 2.87 (dd, J=9.0, 1.7Hz, 1H) 2.99 (dd, J=16.6, 2.9Hz, 1H) 3.27 (td, J=5.8, 2.4Hz, 1H) 3.50-3.56 (m, 1H) 3.66-3.74 (m, 2H) 3.75-3.78 (m, 1H) 3.80 (s, 3H) 3.81-3.85 (m, 1H) 4.26 (d, J=11.7Hz, 1H) 4.50 (d, J=11.7Hz, 1H) 6.26 (d, J=14.6Hz, 1H) 6.42 (dd, J=14.6, 7.8Hz, 1H) 6.87 (d, J=8.3Hz, 2H) 7.21 (d, J=8.3Hz, 2H)。ESI-MS (m/z): 927.39 [M+Na]<sup>+</sup>

[0184] 实施例13

[0185] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-5)



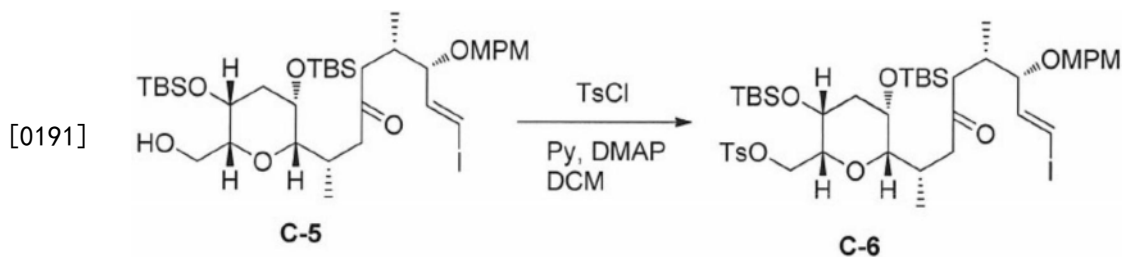
[0187] 在4°C向实施例12中所阐述的化合物C-4: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(600mg,0.66mmol)于THF(5.0mL)、IPA(5.0mL)及t-BuOH(5.0mL)中的溶液添加(1S)-(+)-10-樟脑磺酸(154mg,0.66mmol)。将反应混合物在4°C搅拌20小时。将反应混合物用EtOAc稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液淬灭,然后分离各层。用EtOAc萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至35%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-5,500mg,95%产率)。

[0188] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 0.01 (s, 3H) 0.04 (s, 3H) 0.07 (s, 3H) 0.11 (s, 3H) 0.86-0.91 (m, 15H) 0.93 (s, 9H) 1.83 (dt, J=14.9, 4.8Hz, 1H) 1.93-2.00 (dt, J=14.9, 4.8Hz, 1H) 2.19-2.26 (m, 1H) 2.29 (dd, J=14.9, 5.6Hz, 1H) 2.39 (dd, J=16.6, 8.3Hz, 1H) 2.44-2.66 (m, 4H) 2.91 (dd, J=9.5, 1.7Hz, 1H) 3.36-3.41 (m, 1H) 3.48 (td, J=11.3, 2.7Hz, 1H) 3.59 (t, J=7.1Hz, 1H) 3.74-3.78 (m, 2H) 3.80 (s, 3H) 3.85 (m, 1H) 4.25 (d, J=11.2Hz, 1H) 4.46 (d, J=11.2Hz, 1H) 6.28 (d, J=14.6Hz, 1H) 6.43 (dd, J=14.6, 7.8Hz, 1H) 6.87 (d, J=8.8Hz, 2H) 7.21 (d, J=8.8Hz, 2H)。ESI-MS (m/z): 813.30 [M+Na]<sup>+</sup>

[0189] 实施例14

[0190] ((2R,3R,5S,6S)-4-甲基苯磺酸3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-氧代壬-8-烯-2-基)四氢-2H-吡喃-

## 2-基) 甲基酯(化合物C-6)

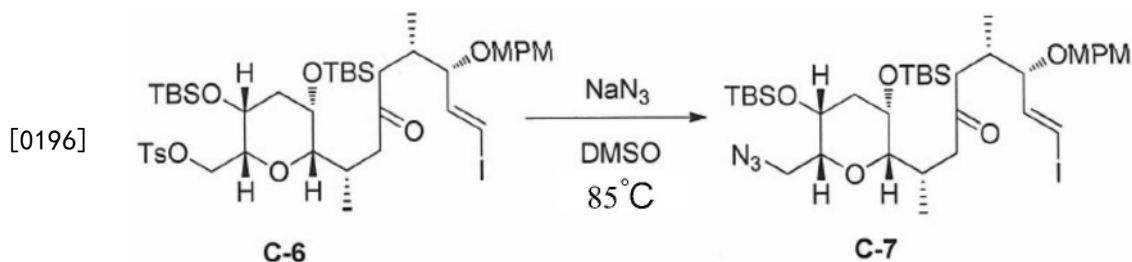


[0192] 在氮气环境中,在5℃向实施例13中所阐述的化合物C-5:(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(500mg,0.63mmol)于DCM(10mL)中的溶液添加吡啶(2.54mL,31.6mmol)、对甲苯磺酰氯(723mg,3.79mmol)及4-二甲基氨基吡啶(77mg,0.63mmol)。将反应混合物在室温搅拌24小时。在室温将对甲苯磺酰氯(150mg,0.79mmol)添加至该反应混合物。然后,将反应混合物在室温搅拌8小时。将反应混合物用DCM稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液淬灭,然后分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用0%至25%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-6,560mg,94%产率)。

[0193] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d) δppm 0.01(s,3H) 0.04(s,3H) 0.04(s,3H) 0.08(s,3H) 0.81(d,J=6.8Hz,3H) 0.83(s,9H) 0.86(d,J=6.8Hz,3H) 0.89(s,9H) 1.81(dt,J=14.9,4.5Hz,1H) 1.91-1.96(m,1H) 2.15-2.32(m,3H) 2.36-2.42(m,1H) 2.43(s,3H) 2.57(d,J=12.7Hz,1H) 2.77(dd,J=16.6,3.4Hz,1H) 2.87(dd,J=9.0,1.7Hz,1H) 3.53-3.58(m,2H) 3.70-3.75(m,1H) 3.80-3.85(m,1H) 3.81(s,3H) 4.06(dd,J=10.0,5.0Hz,1H) 4.08-4.16(m,1H) 4.28(d,J=11.2Hz,1H) 4.51(d,J=11.2Hz,1H) 6.30(d,J=14.6Hz,1H) 6.45(dd,J=14.6,7.8Hz,1H) 6.88(d,J=8.8Hz,2H) 7.24(d,J=8.8Hz,2H) 7.31(d,J=8.3Hz,2H) 7.76(d,J=8.3Hz,2H)。

[0194] 实施例15

[0195] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(叠氮基甲基)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-7)



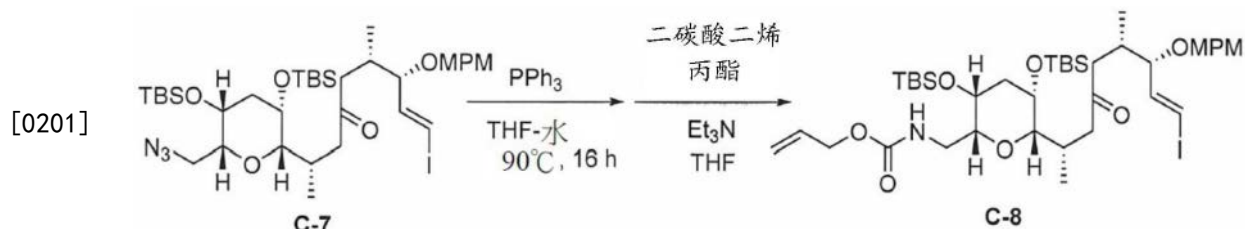
[0197] 在氮气环境中,在20℃向实施例14所阐述的化合物C-6:((2R,3R,5S,6S)-4-甲基苯磺酸3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-氧代壬-8-烯-2-基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基酯(560mg,0.59mmol)于DMSO(5.6mL)中的溶液添加叠氮化钠(385mg,5.92mmol)。将反应混合物在85℃搅拌2小时后,将叠氮化钠(100mg,1.54mmol)添加至该反应混合物,然后将反应混合物在85℃搅拌14小时。将反应混合物用EtOAc稀释且用H<sub>2</sub>O淬灭,然后分离各层。相继用水及盐水洗涤有机

萃取物。使合并的有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤且在减压下浓缩以得到粗制残余物。使用0%至15% $\text{EtOAc}$ /庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-7,298mg,62%产率)。

[0198]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 氯仿-d)  $\delta$ ppm 0.03 (s, 3H) 0.06 (s, 3H) 0.07 (s, 3H) 0.10 (s, 3H) 0.84 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H) 0.85 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H) 0.91 (s, 9H) 0.92 (s, 9H) 1.86 (dt,  $J=15.0$ , 4.7Hz, 1H) 1.98 (dt,  $J=15.0$ , 2.9Hz, 1H) 2.19-2.32 (m, 3H) 2.41-2.49 (m, 1H) 2.58 (d,  $J=12.7\text{Hz}$ , 1H) 2.94 (dd,  $J=16.6$ , 2.9Hz, 1H) 2.98 (dd,  $J=8.8$ , 2.0Hz, 1H) 3.02 (dd,  $J=12.7$ , 2.9Hz, 1H) 3.47 (dt,  $J=8.8$ , 2.7Hz, 1H) 3.49-3.54 (m, 1H) 3.63 (dd,  $J=12.7$ , 8.8Hz, 1H) 3.69-3.73 (m, 1H) 3.81 (s, 3H) 3.83-3.88 (m, 1H) 4.26 (d,  $J=11.7\text{Hz}$ , 1H) 4.50 (d,  $J=11.7\text{Hz}$ , 1H) 6.26 (d,  $J=14.6\text{Hz}$ , 1H) 6.42 (dd,  $J=14.6$ , 7.8Hz, 1H) 6.87 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H) 7.22 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H)。

[0199] 实施例16

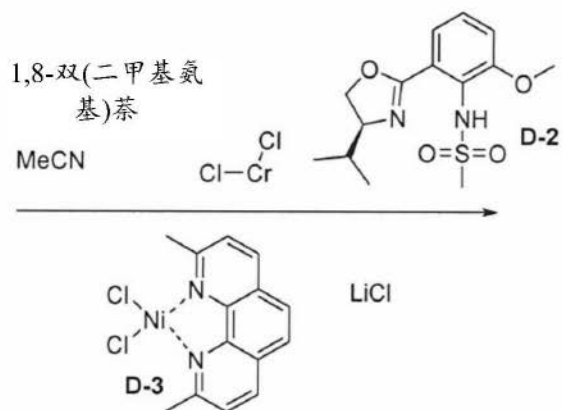
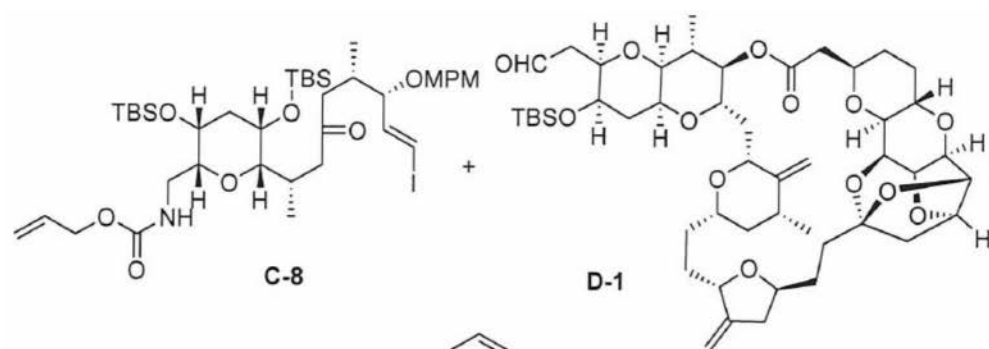
[0200] (((2R,3R,5S,6S)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-氧代壬-8-烯-2-基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基)氨基甲酸酯(化合物C-8)



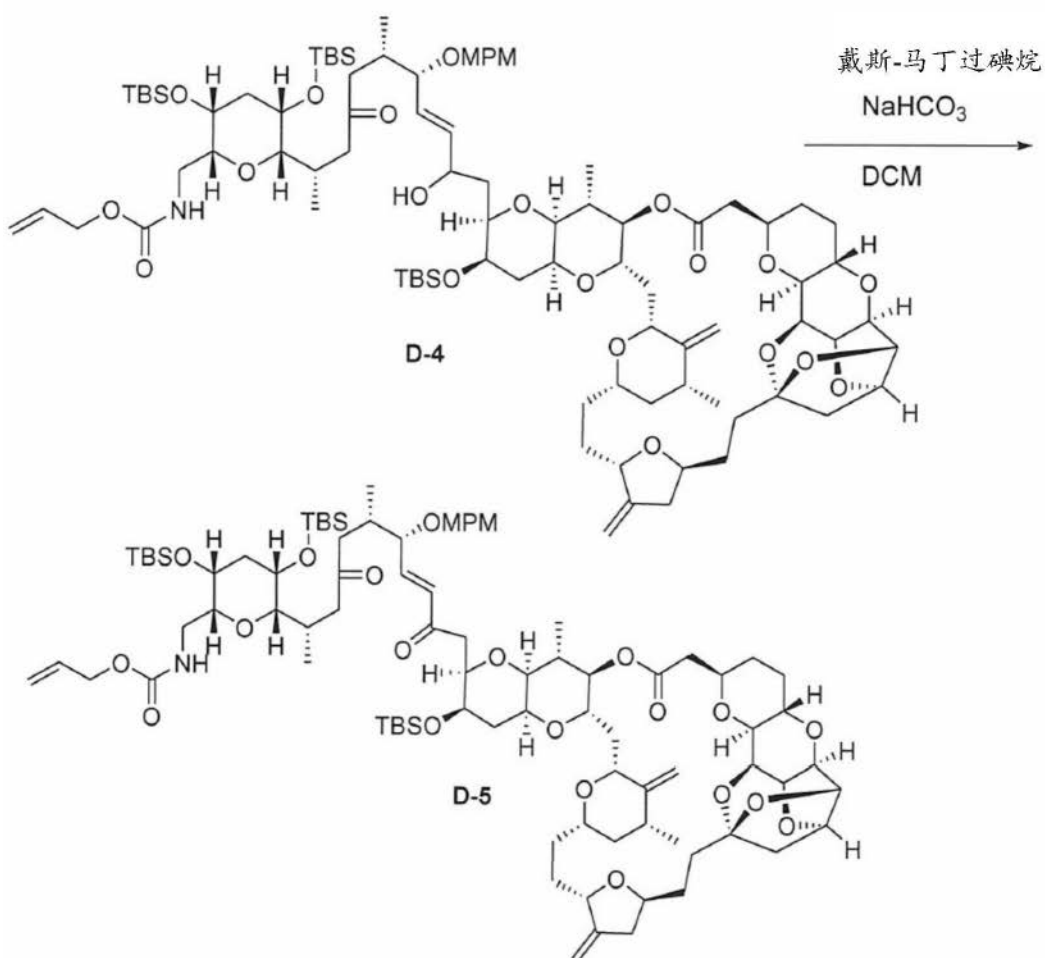
[0202] 在20°C向实施例15中所阐述的化合物C-7: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(叠氮基甲基)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(298mg,0.37mmol)于THF(10mL)及水(1.0mL)中的溶液添加三苯基膦(1437mg,5.478mmol)。将反应混合物在70°C搅拌1.5小时。将反应混合物在减压下浓缩以得到粗制胺。在5°C向上文所获得的于THF(10mL)中的粗制胺溶液添加 $\text{Et}_3\text{N}$ (0.51mL,3.66mmol)及二碳酸二烯丙酯(341mg,1.83mmol)。将反应混合物在室温搅拌60min。在减压下浓缩该反应混合物。使用0%至25% $\text{EtOAc}$ /庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物C-8,300mg,94%产率)。

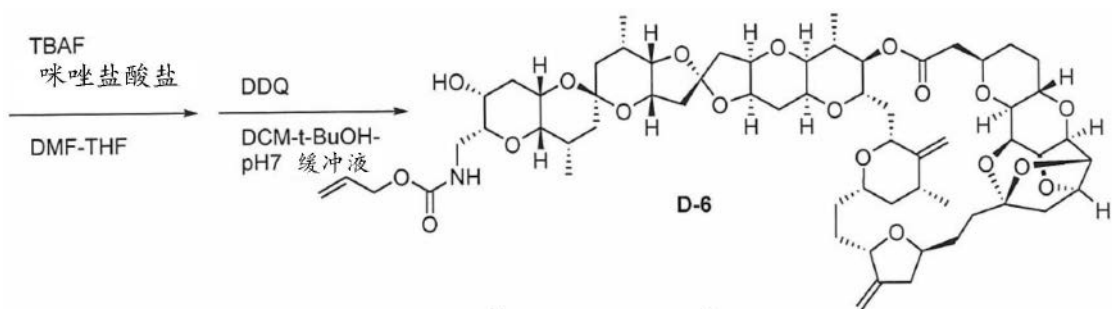
[0203]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 氯仿-d)  $\delta$ ppm 0.05-0.07 (m, 9H) 0.11 (s, 3H) 0.85 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H) 0.87 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H) 0.90 (s, 9H) 0.93 (s, 9H) 1.80 (dt,  $J=15.0$ , 4.4Hz, 1H) 1.96 (dt,  $J=15.0$ , 2.8Hz, 1H) 2.16-2.29 (m, 2H) 2.32-2.39 (m, 1H) 2.53-2.60 (m, 3H) 2.86 (d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H) 3.04-3.11 (m, 1H) 3.30-3.34 (m, 1H) 3.38-3.48 (m, 1H) 3.58 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 1H) 3.70-3.76 (m, 1H) 3.80 (s, 3H) 3.81-3.84 (m, 1H) 4.25 (d,  $J=11.2\text{Hz}$ , 1H) 4.46 (d,  $J=11.2\text{Hz}$ , 1H) 4.53-4.63 (m, 2H) 5.19 (dd,  $J=10.7$ , 1.5Hz, 1H) 5.32 (d,  $J=17.1\text{Hz}$ , 1H) 5.47 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H) 5.88-5.99 (m, 1H) 6.28 (d,  $J=14.6\text{Hz}$ , 1H) 6.43 (dd,  $J=14.6$ , 7.8Hz, 1H) 6.87 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H) 7.21 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H)。ESI-MS ( $m/z$ ): 896.34 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$

[0204] 方案D;化合物D-7的制备

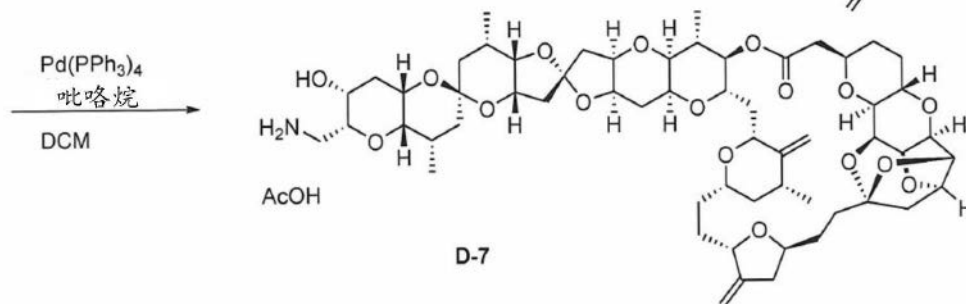


[0205]



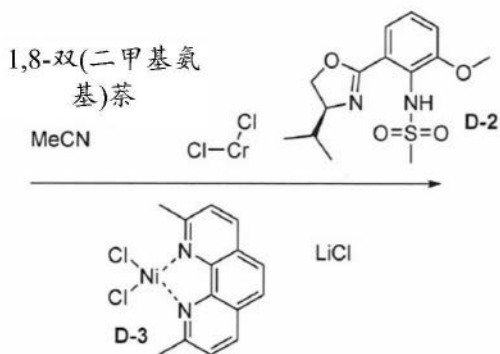
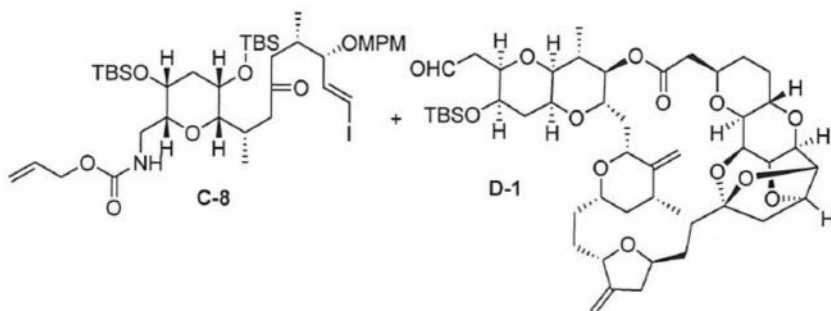


[0206]

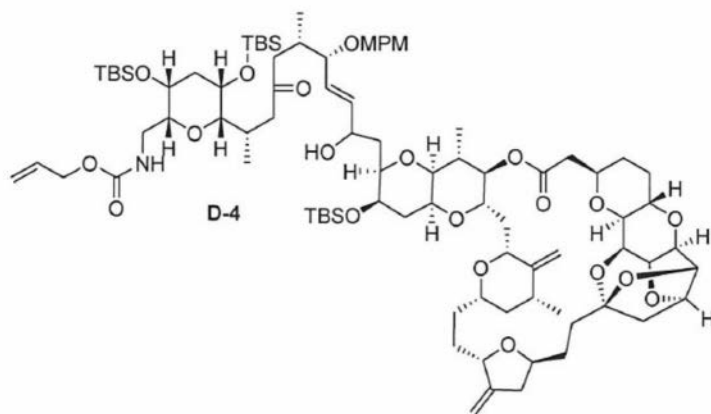


[0207] 实施例17

[0208] 化合物D-4



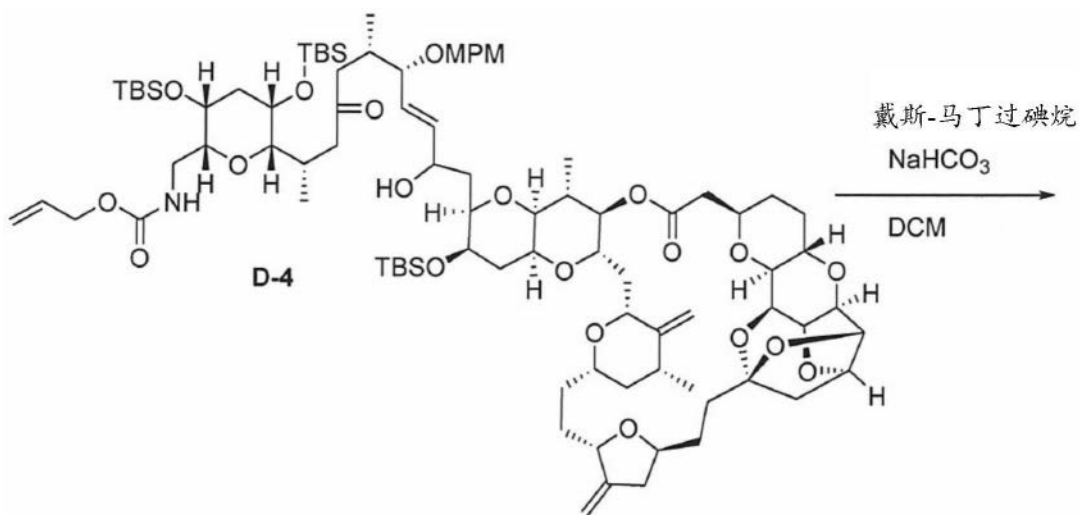
[0209]



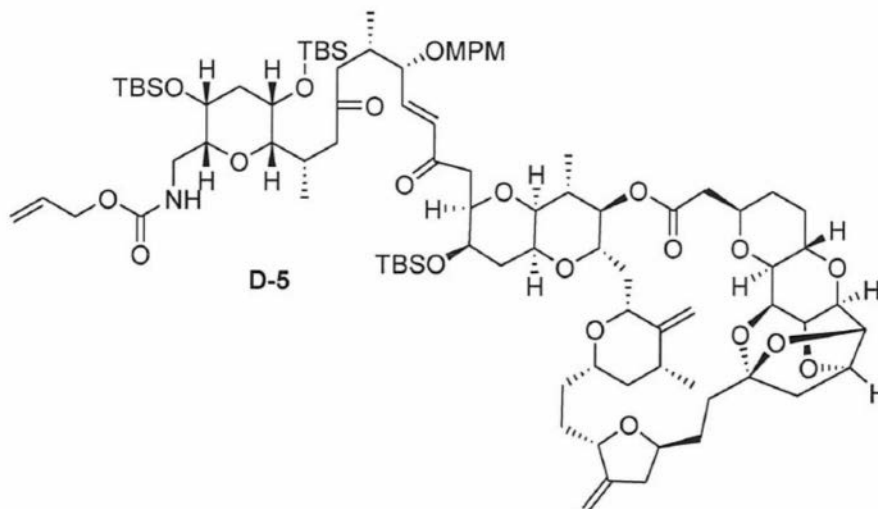
[0210] 在氮气环境下(于手套箱中),向通过Organic Letters (2002),4(25),4431-4434中所写的方法获得的化合物D-2:(S)-N-(2-(4-异丙基-4,5-二氢噁唑-2-基)-6-甲氧基苯基)甲烷磺酰胺(155mg,0.497mmol)(CAS编号;546141-34-8)及1,8-二(二甲基氨基)萘(107mg,0.497mmol)于MeCN(0.75mL)中的溶液添加氯化铬(II)(55.5mg,0.452mmol),且然后将所得混合物于手套箱中在室温搅拌1小时。将所得绿色溶液添加至以下各项的混合物中:实施例16中所阐述的化合物C-8:(((2R,3R,5S,6S)-3,5-二((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-氧代壬-8-烯-2-基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基)氨基甲酸烯丙基酯(99.0mg,0.113mmol)、通过Journal of the American Chemical Society (1992),114(8),3162-3164中所写的方法获得的化合物D-1(80.0mg,0.09mmol)(CAS编号;157322-23-1)、通过Journal of the American Chemical Society (2009),131(42),15387-15393中所写的方法获得的化合物D-3:二氯(2,9-二甲基-1,10-菲咯啉)镍(0.46mg,1.36 $\mu$ mol)(CAS编号;21361-04-6)及氯化锂(3.83mg,0.09mmol)。将反应混合物于手套箱中在室温搅拌60min。然后将反应混合物自手套箱取出,用二乙醚-EtOAc(5.0mL-5.0mL)稀释,然后将Florasil<sup>®</sup>(1600mg,15.94mmol)(CAS编号;1343-88-0)添加至该混合物。然后将混合物在室温搅拌30min。过滤(Celite<sup>®</sup>)该混合物,用EtOAc/庚烷=2/1洗涤,然后将滤液在减压下浓缩。使用3%至55%EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物D-4,140mg,95%产率)。

[0211] 实施例18

[0212] 化合物D-5



[0213]



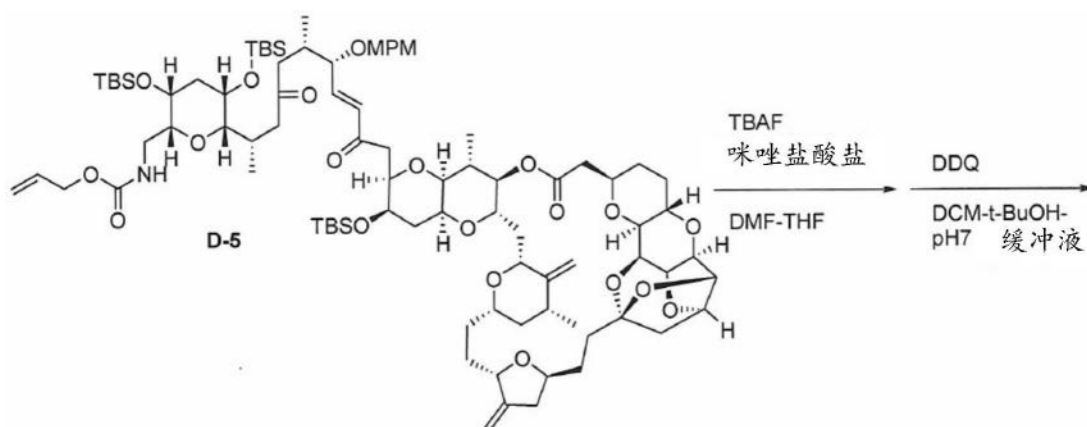
[0214] 在氮气环境中,在5℃向实施例17中所阐述的化合物D-4 (140mg, 0.09mmol) 于DCM (5.0mL) 中的溶液添加NaHCO<sub>3</sub> (28.8mg, 0.34mmol) 及戴斯-马丁过碘烷 (72.7mg, 0.17mmol)。将反应混合物在室温搅拌60min。将反应混合物用DCM稀释并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液及饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液淬灭,且然后分离各层。用DCM萃取水层。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且在减压下浓缩。使用2%至60% EtOAc/庚烷使残余物在硅胶上实施快速色谱法,得到标题化合物(化合物D-5, 120mg, 86%)。

[0215] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, 苯-d<sub>6</sub>) δppm 0.01-0.05 (m, 9H) 0.10-0.12 (m, 6H) 0.15 (s, 3H) 0.76 (d, J=6.1Hz, 3H) 0.96 (s, 9H) 1.02 (s, 9H) 1.04 (s, 9H) 0.95-1.10 (m, 7H) 1.20 (d, J=7.3Hz, 3H) 1.31-1.37 (m, 3H) 1.41 (dd, J=12.8, 4.9Hz, 1H) 1.40-1.58 (m, 4H) 1.59-1.64 (m, 1H) 1.69-1.89 (m, 3H) 1.90-1.99 (m, 2H) 2.02-2.25 (m, 8H) 2.26-2.48 (m, 6H) 2.49-2.70 (m, 6H) 2.71-2.84 (m, 2H) 3.00-3.07 (m, 1H) 3.12-3.30 (m, 4H) 3.36 (s, 3H) 3.40 (br. s, 1H) 3.44-3.53 (m, 2H) 3.65 (dd, J=6.4, 4.0Hz, 1H) 3.69-3.84 (m, 4H) 3.86-4.03 (m, 4H) 4.07-4.17 (m, 3H) 4.27-4.29 (m, 1H) 4.27 (d, J=11.0Hz, 1H) 4.48-4.58 (m, 1H) 4.49 (d, J=11.0Hz, 1H) 4.65-4.70 (m, 2H) 4.68 (d, J=5.5Hz, 1H) 4.74-4.86 (m, 2H) 4.78 (s, 1H) 4.93 (s, 1H) 5.05 (d, J=10.4Hz, 1H) 5.09 (br. s., 1H) 5.19 (br. s., 1H) 5.30 (dd, J=17.1, 1.2Hz, 1H) 5.82 (d, J=8.0Hz, 1H) 5.86-5.96 (m, 1H) 6.46 (d, J=15.9Hz, 1H) 6.84-6.92 (m, 3H) 7.31 (d, J=8.6Hz, 2H)。

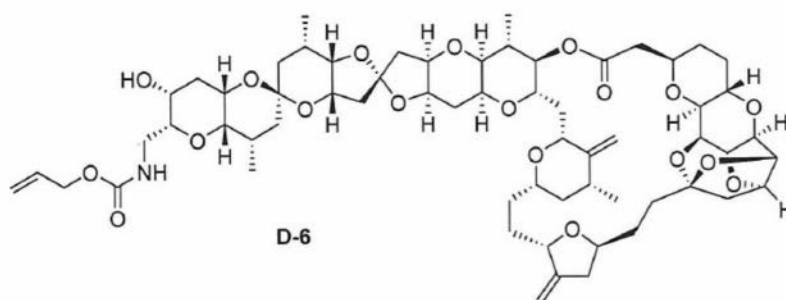


[0216] 实施例19

[0217] 化合物D-6



[0218]



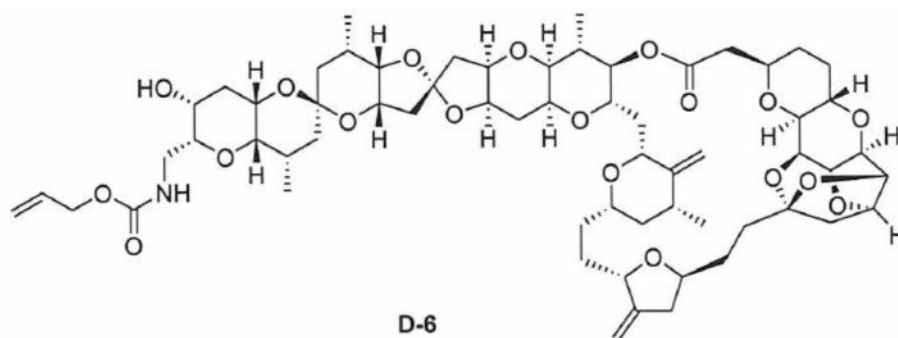
[0219] 将咪唑盐酸盐(155mg, 1.48mmol)溶解于DMF(2.9mL)中以得到于DMF中的0.5M咪唑盐酸盐溶液。将1.0mL此溶液与1.0mL TBAF(1.0M, THF溶液)混合以得到0.5M TBAF及0.25M咪唑盐酸盐于THF-DMF(1:1)中的预混合溶液。在氮气环境中,在20℃向实施例18中所阐述的化合物D-5(80.0mg, 0.05mmol)于DMF(7.0mL)中的溶液添加以上所制备的TBAF(0.5M)及咪唑盐酸盐(0.25M)于THF-DMF(1:1)中的0.588mL预混合溶液。将反应混合物在室温搅拌14小时。将1.6g  $\text{CaCO}_3$ 及4.0g **Dowex**<sup>®</sup> 50WX8(氢型, 200-400目, SIGMA-ALDRICH)添加至该反应混合物。将混合物在室温搅拌2小时。然后将混合物用EtOAc稀释, 然后过滤(**Celite**<sup>®</sup>), 用EtOAc洗涤。将滤液在减压下浓缩以得到粗制残余物。将1000mg  $\text{CaCO}_3$ 及2.25g **Dowex**<sup>®</sup> 50WX8添加至粗制残余物的EtOAc(6.0mL)溶液。将混合物在室温搅拌2.5小时。然后将混合物用EtOAc稀释, 过滤(**Celite**<sup>®</sup>), 用EtOAc洗涤。将滤液在减压下浓缩以得到粗制残余物(63.0mg)。在室温向上文所获得的粗制残余物(63.0mg)于DCM(6.0mL)、t-BuOH(0.6mL)及pH 7磷酸盐缓冲液(0.6mL, 1/15M)中的溶液添加DDQ(111mg, 0.49mmol)。将反应混合物在室温搅拌45min。用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液使反应混合物淬灭, 然后用DCM稀释并分离各层。用DCM萃取水层(3次)。使合并的有机萃取物经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤且在减压下浓缩。使用10%至100% EtOAc/庚烷、然后10% MeOH/EtOAc使残余物在NH硅胶上实施快速色谱法, 得到大致纯化的标题化合物(化合物D-6, 15.0mg, 27%)。

[0220]  $^1\text{H}$  NMR(500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta_{\text{ppm}}$  0.97(d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H) 0.97(d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H) 1.00-1.02(m, 1H) 1.05(d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 3H) 1.09(d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H) 1.31-1.45(m, 6H) 1.46-1.63(m, 5H) 1.64-1.75(m, 3H) 1.80-1.86(m, 2H) 1.87-1.93(m, 2H) 1.94-2.11(m, 9H) 2.13-2.27(m, 8H) 2.33(d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 2H) 2.39(dd,  $J=13.4, 6.1\text{Hz}$ , 1H) 2.44(dd,  $J=17.6, 2.0\text{Hz}$ , 1H)

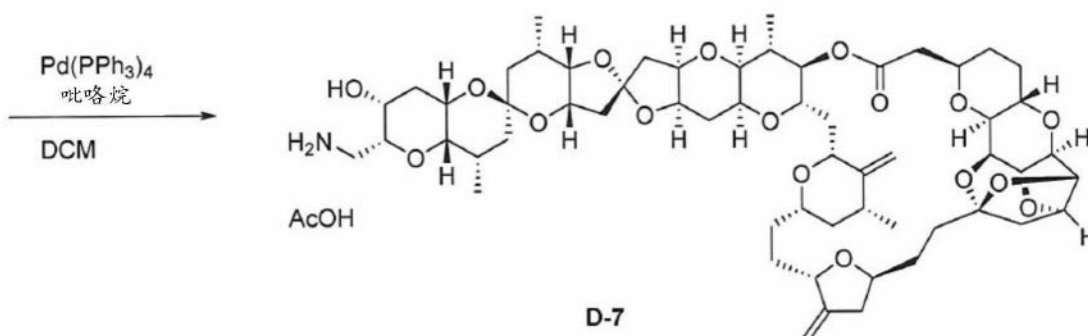
2.55 (dd,  $J=17.6, 9.3\text{Hz}$ , 1H) 2.75-2.84 (m, 1H) 2.97 (dd,  $J=9.3, 2.0\text{Hz}$ , 1H) 3.21 (dd,  $J=6.6, 4.6\text{Hz}$ , 1H) 3.32 (m, 1H) 3.41-3.46 (m, 1H) 3.57 (br. s., 1H) 3.60 (d,  $J=11.7\text{Hz}$ , 1H) 3.67-3.74 (m, 2H) 3.78 (br. s., 1H) 3.86-3.90 (m, 2H) 3.97 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H) 4.02-4.11 (m, 4H) 4.17 (dd,  $J=6.6, 4.6\text{Hz}$ , 1H) 4.23 (dd,  $J=11.5, 2.2\text{Hz}$ , 1H) 4.29 (br. s., 1H) 4.31 (td,  $J=9.3, 3.9\text{Hz}$ , 1H) 4.44 (d,  $J=10.2\text{Hz}$ , 1H) 4.51 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 2H) 4.59 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H) 4.61 (dd,  $J=7.3, 4.9\text{Hz}$ , 1H) 4.69 (t,  $J=4.6\text{Hz}$ , 1H) 4.80 (s, 1H) 4.85-4.87 (m, 1H) 5.01 (s, 1H) 5.05 (s, 1H) 5.16 (dd,  $J=10.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H) 5.28 (dd,  $J=17.1, 2.0\text{Hz}$ , 1H) 5.92 (m, 1H)。ESI-MS ( $m/z$ ): 1172.57  $[M+Na]^+$ 。

[0221] 实施例20

[0222] 化合物D-7



[0223]



[0224] 在氮气环境中,在室温向实施例19中所阐述的化合物D-6 (15.0mg, 0.013mmol)、吡咯烷 (10.8 $\mu\text{L}$ , 0.13mmol) 于DCM (2.0mL) 中的溶液添加四(三苯基膦)钯(0) (7.53mg, 6.52 $\mu\text{mol}$ )。将反应混合物在室温搅拌30min。在减压下浓缩该反应混合物。使用50%EtOAc/庚烷、然后0%至20%MeOH/EtOAc使残余物在NH硅胶上实施快速色谱法,得到大致纯化的产物。通过HPLC纯化所获得的大致纯化的产物,得到标题化合物(D-7, 7.0mg, 47%, 滞留时间=13.8min)。

[0225] HPLC条件:

[0226] 柱:YMC Pak Pro C18 (20mm $\times$ 250mm)

[0227] 检测波长:200nm

[0228] 柱温度:室温

[0229] 移动相:MeCN-水 (0.05%AcOH)

[0230] 流速:8mL/min

[0231] 洗脱剂:

[0232] MeCN/水25% (iso, 2min), 然后

[0233] MeCN/水25%至60% (梯度, 20min)

[0234]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ ppm 0.99(d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 3H) 1.00-1.03(m, 1H) 1.04(d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 3H) 1.06(d,  $J=7.3\text{Hz}$ , 3H) 1.10(d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 3H) 1.29-1.63(m, 10H) 1.65-1.78(m, 3H) 1.79-1.89(m, 2H) 1.92-2.12(m, 10H) 1.93(s, 3H) 2.13-2.36(m, 9H) 2.41(dd,  $J=13.5$ ,  $6.1\text{Hz}$ , 1H) 2.45(dd,  $J=17.6$ ,  $2.2\text{Hz}$ , 1H) 2.56(dd,  $J=17.6$ ,  $9.8\text{Hz}$ , 1H) 2.75-2.84(m, 1H) 2.98(dd,  $J=9.8$ ,  $1.8\text{Hz}$ , 1H) 3.12(dd,  $J=12.8$ ,  $3.7\text{Hz}$ , 1H) 3.22(dd,  $J=6.4$ ,  $4.6\text{Hz}$ , 1H) 3.26(dd,  $J=13.2$ ,  $7.8\text{Hz}$ , 1H) 3.39(d,  $J=1.8\text{Hz}$ , 1H) 3.61(d,  $J=12.8\text{Hz}$ , 1H) 3.63-3.68(m, 2H) 3.68-3.76(m, 2H) 3.81-3.94(m, 3H) 4.00(d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 1H) 4.03-4.15(m, 4H) 4.18(dd,  $J=6.4$ ,  $4.6\text{Hz}$ , 1H) 4.25(ddd,  $J=11.0$ ,  $4.3$ ,  $1.8\text{Hz}$ , 1H) 4.27-4.36(m, 2H) 4.46(d,  $J=11.0\text{Hz}$ , 1H) 4.57-4.65(m, 2H) 4.70(t,  $J=4.6\text{Hz}$ , 1H) 4.81(d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 1H) 5.02(br.s, 1H) 5.06(d,  $J=1.8\text{Hz}$ , 1H)。ESI-MS( $m/z$ ): 1066.96[M+H] $^+$ , 1090.19[M+Na] $^+$

[0235] 化合物(1) (化合物D-7的盐游离形式):  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ ppm 0.98(d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H) 1.00(d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H) 1.02(m, 1H) 1.05(d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H) 1.09(d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 3H) 1.28-1.45(m, 5H) 1.46-1.59(m, 4H) 1.57-1.63(m, 1H) 1.65-1.71(m, 1H) 1.70-1.75(m, 2H) 1.79-1.86(m, 2H) 1.91(dt,  $J=14.9$ ,  $3.1\text{Hz}$ , 1H) 1.94-2.11(m, 8H) 2.14-2.34(m, 9H) 2.39(dd,  $J=13.2$ ,  $6.0\text{Hz}$ , 1H) 2.44(dd,  $J=17.4$ ,  $1.9\text{Hz}$ , 1H) 2.56(dd,  $J=17.6$ ,  $9.6\text{Hz}$ , 1H) 2.69(dd,  $J=13.2$ ,  $4.2\text{Hz}$ , 1H) 2.79(ddq,  $J=15.9$ ,  $7.6$ ,  $2.0\text{Hz}$ , 1H) 2.92(dd,  $J=13.2$ ,  $8.3\text{Hz}$ , 1H) 2.97(dd,  $J=9.6$ ,  $1.7\text{Hz}$ , 1H) 3.21(dd,  $J=6.4$ ,  $4.9\text{Hz}$ , 1H) 3.29(m, 1H) 3.34(dd,  $J=8.3$ ,  $4.15\text{Hz}$ , 1H) 3.58(br.s., 1H) 3.60(br.d,  $J=11.3\text{Hz}$ , 1H) 3.68-3.73(m, 2H) 3.80(br.s., 1H) 3.84-3.90(m, 2H) 3.98(d,  $J=2.3\text{Hz}$ , 1H) 4.03-4.13(m, 4H) 4.17(dd,  $J=6.4$ ,  $4.9\text{Hz}$ , 1H) 4.24(ddd,  $J=11.3$ ,  $4.5$ ,  $1.5\text{Hz}$ , 1H) 4.29(dd,  $J=4.0$ ,  $1.9\text{Hz}$ , 1H) 4.32(td,  $J=10.2$ ,  $4.2\text{Hz}$ , 1H) 4.44(br.d,  $J=11.0\text{Hz}$ , 1H) 4.59(t,  $J=4.5\text{Hz}$ , 1H) 4.62(dd,  $J=7.4$ ,  $4.7\text{Hz}$ , 1H) 4.69(t,  $J=4.7\text{Hz}$ , 1H) 4.80(br.s., 1H) 4.87(s, 1H) 5.00(br.s., 1H) 5.05(br.d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 1H)。

[0236] ESI-MS( $m/z$ ): 1066.57[M+H] $^+$ , 1088.55[M+Na] $^+$

[0237] 药理学测试实施例

[0238] 一般信息

[0239] 文献中已知天然软海绵素化合物及其经修饰化合物(例如, 参见D.Uemura等人, “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985); Marc Litaudon等人, “Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge Lissodendoryx sp.” J. Org. Chem., 1997, 62, 1868-1871)。然而, 其大多数不易获得。举例而言, Dr. Uemura等人自多达600kg Kadota黑色软海绵中分离出12.5mg软海绵素B、35.0mg去甲软海绵素A (Norhalichondrin A) 及17.2mg拟软海绵素A (Homohalichondrin A) (例如, 参见D.Uemura等人, “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985))。在天然软海绵素化合物中, 软海绵素B在体外显示最强的针对B-16黑色素瘤细胞的抗肿瘤活性且在体内针对L-1210白血病具有高度活性(例如, 参见D.Uemura等人, “Norhalichondrin

A:An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge”J.Am.Chem.Soc.,107,4796(1985))。软海绵素C也在各种体内模型中具有活性,但与软海绵素B相比在水溶液中不稳定。去甲软海绵素B在体外以及体内均显著弱于软海绵素B(参见,例如D.Uemura等人,“Norhalichondrin A:An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge”J.Am.Chem.Soc.,107,4796(1985))。以下药理学测试视需要使用软海绵素B(Hali-B)作为参考化合物。

[0240] 药理学测试实施例1.FaDu生长抑制分析

[0241] 在此分析中,测量测试化合物在人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将FaDu细胞维持在含有10%胎牛血清(FBS:Nichirei,12D168)以及青霉素及链霉素的RPMI-1640(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,187-02021)培养基中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加75μL用培养基调整至浓度为4×10<sup>4</sup>个细胞/mL的FaDu细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加25μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo®发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),且示于表1中。

[0242] 表1

	FaDu	
	测试化合物	(IC <sub>50</sub> (nM))
[0243]	软海绵素 B	0.124
	化合物(1)	0.0714

[0244] 药理学测试实施例2.MDA-MB231生长抑制分析

[0245] 在此分析中,测量测试化合物在人类乳腺癌细胞系MDA-MB231中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将MDA-MB231细胞维持在含有10%胎牛血清(FBS:Nichirei,12D168)以及青霉素及链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's medium,Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,044-29765)中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加75μL用培养基调整至浓度为4×10<sup>4</sup>个细胞/mL的MDA-MB231细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加25μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo®发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),且示于表2中。

[0246] 表2

MDA-MB231	
测试化合物	(IC <sub>50</sub> (nM))
[0247] 软海绵素 B	1.000
化合物(1)	0.109

[0248] 药理学测试实施例3.HCC1954生长抑制分析

[0249] 在此分析中,测量测试化合物在人类乳腺癌细胞系HCC1954中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将HCC1954细胞维持在经改良含有2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、4500mg/L葡萄糖及1500mg/L碳酸氢钠(ATCC 30-2001)且含有10%胎牛血清(FBS:Nichirei,12D168)以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company,353219)的每一孔添加75μL用培养基调整至浓度为4×10<sup>4</sup>个细胞/mL的HCC1954细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加25μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo®发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),且示于表3中。

[0250] 表3

HCC1954	
测试化合物	(IC <sub>50</sub> (nM))
[0251] 软海绵素 B	0.154
化合物(1)	0.0668

[0252] 药理学测试实施例4.作为单一疗法在小鼠中的FaDu皮下异种移植物模型中的抗肿瘤效应

[0253] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用汉克斯平衡盐溶液(Hanks'Balanced Salt Solution)调整至浓度为4.8×10<sup>7</sup>个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100μL的体积接种至7周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j,雌性,Charles River Laboratories Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后9天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器,Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0254] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)=最长直径(mm)×最短直径(mm)×最短直径(mm)/2

[0255] 相对肿瘤体积(RTV)=肿瘤体积(第X天)/肿瘤体积(第1天)

[0256] 肿瘤消退(%)=(1-最低RTV)×100

[0257] 基于在第1天给药时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各

组之间实质上相等。将每一测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存在冰箱中。在即将给药之前,将原液稀释于含有100 $\mu$ M羟基丙基- $\beta$ -环糊精的盐水中。将每一评估样品以最大耐受剂量(MTD)静脉内给予。顺便提及,该实验是在各自由4只小鼠组成的群组上进行。每一测试化合物的肿瘤消退(%)示于表4中。

[0258] 表4

	测试化合物	剂量(mg/kg)	肿瘤消退(%)
[0259]	软海绵素 B	0.05	0
	化合物(1)	0.2	43

[0260] 药理学测试实施例5.作为单一疗法在小鼠中的皮下异种移植物模型中针对OSC-19的抗肿瘤活性

[0261] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的DMEM/Ham's F-12(1:1)培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系OSC-19用PBS调整至浓度为 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液,且将该悬浮液与Matrigel™(BD Bioscience,编号366237)以1:1的比率混合以制备浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL的细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至5周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj,雌性,Charles River Laboratories Japan,Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后6天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器,Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0262] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm) / 2

[0263] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0264] 肿瘤消退(%) = (1 - 最低RTV)  $\times$  100

[0265] 基于在第1天给药时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于盐水中,并以0.06mg/kg至0.18mg/kg一周一次的剂量静脉内持续给药2周(Q7D $\times$ 2时间表)。每一测试剂量的肿瘤消退(%)示于表5中。

[0266] 表5

	测试化合物	剂量(mg/kg)	肿瘤消退(%)
[0267]	化合物(1)	0.06	59
	化合物(1)	0.18	90

[0268] 药理学测试实施例6.作为单一疗法在小鼠中的皮下异种移植物模型中针对HCC1806的抗肿瘤活性

[0269] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类乳腺癌细胞系HCC1806用PBS调整至浓度为 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液,并将该悬浮液与Matrigel™(BD Bioscience,编号366237)以1:1的比率混合以制备浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL的细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至5周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/

Cr1Cr1j,雌性,Charles River Laboratories Japan,Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后12天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器,Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0270] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm) × 最短直径(mm) × 最短直径(mm) / 2

[0271] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0272] 肿瘤消退(%) = (1 - 最低RTV) × 100

[0273] 基于在第1天给药时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于盐水中,并以0.18mg/kg一周一次静脉内持续给药2周(Q7D × 2时间表)。化合物(1)的肿瘤消退(%)示于表6中。

[0274] 表6

	测试化合物	剂量(mg/kg)	肿瘤消退(%)
[0275]	化合物(1)	0.18	90

[0276] 药理学测试实施例7. 与西妥昔单抗组合在小鼠中的FaDu皮下异种移植物模型中的抗肿瘤效应

[0277] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu\text{L}$ 的体积接种至7周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j,雌性,Charles River Laboratories Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器,Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0278] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm) × 最短直径(mm) × 最短直径(mm) / 2

[0279] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0280] 第35天的肿瘤消退(%) = (1 - 第35天的RTV) × 100

[0281] 基于在第1天给药时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。将每一测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存在冰箱中。在即将给予之前,将原液稀释于含有100 $\mu\text{M}$ 羟基丙基- $\beta$ -环糊精的盐水中。将每一测试化合物以1/4MTD至1/2MTD的剂量与西妥昔单抗(Erbix,Merck Serono Co.,Ltd.)组合静脉内给药。顺便提及,该实验是在各自由4只小鼠组成的群组上进行。每一测试化合物在第35天的肿瘤消退(%)示于表7中。

[0282] 表7

	测试化合物	剂量(mg/kg)	西妥昔单抗 (mg/kg)	第 35 天的肿瘤消退(%)
	-	-	20	-242
[0283]	软海绵素 B	0.0125	20	-38
		0.025	20	-2
	化合物(1)	0.05	20	38
		0.1	20	60

[0284] 药理学测试实施例8. 与曲妥珠单抗组合在小鼠中的KPL-4皮下异种移植模型中的抗肿瘤活性

[0285] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类HER-2阳性乳腺癌细胞系KPL-4用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至7周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j, 雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后16天, 通过使用电子数字卡尺(Digimatic<sup>TM</sup>测径器, Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径, 以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0286] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm) / 2

[0287] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0288] 肿瘤消退(%) = (1 - 最低RTV)  $\times$  100

[0289] 基于在第1天给药时所获得的肿瘤体积, 将小鼠分组, 使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将每一测试化合物溶解于DMSO中, 并将溶液在使用之前储存在冰箱中。在即将给药之前, 将原液稀释于盐水中。测试化合物是以0.09mg/kg或0.18mg/kg与曲妥珠单抗(Herceptin, Genentech, Inc.)组合静脉内给药。化合物(1)的肿瘤消退示于表8中。

[0290] 表8

	测试化合物	剂量 (mg/kg)	曲妥珠单抗 (mg/kg)	肿瘤消退(%)
	-	-	10	0
[0291]	化合物(1)	0.09	-	43
		0.09	10	83
		0.18	-	87
		0.18	10	100

[0292] 药理学测试实施例9. 对小鼠FaDu皮下模型中的CD31阳性血管的效应

[0293] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈



部鳞状细胞癌 (SCCHN) 细胞系FaDu用PBS调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至7周龄裸小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j,雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.) 的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天, 将于含有100 $\mu$ M羟基丙基- $\beta$ -环糊精的盐水中的测试化合物以1/2MTD至MTD的剂量静脉内给予。该实验是在各自由3只小鼠组成的群组上进行。给予后5天, 收集肿瘤样品并用IHC锌固定剂 (BD Pharmingen) 在4 $^{\circ}$ C固定24小时。将石蜡包埋的组织切片 (3 $\mu$ m), 安装在带正电的载玻片上, 并风干。根据制造商的方案, 使用Ventana自动染色仪型号Discover XT (Roche Diagnostics) 对CD31进行免疫组织化学染色。将切片脱蜡, 调理并用CC1 (Ventana Medical Systems) 恢复抗原。将载玻片用封阻剂A及封阻剂B (内源性生物素封阻试剂盒, Roche Diagnostics) 封阻。以2 $\mu$ g/mL施加大鼠抗小鼠IgG CD31抗体 (Dianova GmbH)。使切片与该抗体一起孵育6小时, 之后与2.2 $\mu$ g/mL生物素化抗大鼠IgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 一起孵育32分钟。利用抗生蛋白链菌素-HRP D实施检测持续16min, 之后与DAB D及DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D (DABMap试剂盒, Ventana Medical Systems, Inc) 一起孵育8min。将载玻片用苏木素II (Roche Diagnostics) 复染16min, 之后与返蓝试剂 (Bluing reagent) 一起孵育4min。使切片于梯度乙醇 (graded ethanol) 中脱水, 于二甲苯更换液中脱脂并用DPX (Merck KGaA) 覆盖。

[0294] 使用Vectra 2自动化载玻片成像系统 (Perkin Elmer Inc.) 扫描经免疫染色的载玻片。通过使用inForm 2软件 (PerkinElmer Inc.) 计数CD31阳性对象来量化整个肿瘤中的血管数量。通过使用inform 2软件 (PerkinElmer Inc.) 评价苏木素染色面积来测量肿瘤区域的面积。由肿瘤区域的面积使血管数量归一化。利用以下公式来计算测试化合物给药组的血管数量增加率, 且示于表9中。

[0295] 血管数量增加率 (%) = ((测试化合物给药组的血管数量 - 对照组的血管数量) / 对照组的血管数量)  $\times$  100

[0296] 表9

	测试化合物	剂量(mg/kg)	血管数量(%)增加率
[0297]	软海绵素 B	0.025	31
		0.05	39
[0298]	化合物(1)	0.10	69
		0.20	154

[0299] 药理学测试实施例10. 对FaDu皮下模型中 $\alpha$ -SMA阳性-CAF的效应

[0300] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN) 细胞系FaDu用PBS调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至5至6周龄裸小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j,雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.) 的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天, 将于含有100 $\mu$ M羟基丙基- $\beta$ -环糊精的盐水中的测试化合物以1/2MTD及MTD静脉内给予。该实验是在各自由3只小鼠组成的群组上进行。给予后两天, 收集肿瘤样品并用IHC锌固定剂

(BD Pharmingen) 在4°C固定24小时。将石蜡包埋的组织切片(3μm), 安装在带正电的载玻片上, 并风干6小时。使用Ventana自动染色仪型号Discover XT(Roche Diagnostics)对α-SMA进行免疫组织化学染色。将切片脱蜡, 调理并用专利缓冲液EZPrep及CC1(Ventana Medical Systems)恢复抗原。以5μg/mL施加偶联有碱性磷酸酶的小鼠抗α-SM单克隆抗体(克隆1A4, Sigma)。使切片与该抗体一起孵育6小时。利用RedMap试剂盒(Ventana Medical Systems, Inc)实施检测。使切片于梯度乙醇中脱水, 于二甲苯更换液中脱脂并用DPX(Merck KGaA)覆盖。将系列肿瘤切片脱蜡并用迈耶(Mayer)苏木素(Muto Pure Chemicals)染色1min。使切片于梯度乙醇中脱水, 于二甲苯更换液中脱脂并用DPX(Merck KGaA)覆盖。

[0301] 使用Vectra 2自动化载玻片成像系统(Perkin Elmer Inc.)扫描经免疫染色的载玻片。通过使用inForm 2软件(PerkinElmer Inc.)计数α-SMA阳性对象来量化整个肿瘤中的α-SMA阳性区域的面积。通过使用inform 2软件(PerkinElmer Inc.)评价苏木素染色面积来测量肿瘤区域的面积。由肿瘤区域的面积使α-SMA阳性区域的面积归一化。利用以下公式来计算测试化合物给药组的α-SMA阳性面积的抑制率, 且示于表10中。

[0302] 表10

	测试化合物	剂量(mg/kg)	α-SMA 阳性面积的抑制率(%)
[0303]	软海绵素 B	0.025	7
		0.05	3
[0304]	化合物(1)	0.10	21
		0.20	28

[0305]  $\alpha$ -SMA阳性面积的抑制率(%) = -((测试化合物给药组的α-SMA阳性面积-对照组的α-SMA阳性面积)/对照组的α-SMA阳性面积) × 100

[0306] 药理学测试实施例11.HSC-2正位移植小鼠模型

[0307] 通过逆转录病毒介导的基因转移建立荧光素酶转导的HSC-2-Luc细胞。首先, 自pGL3-增强子质粒(基因库(GenBank) 编号:U47297) 获得编码萤火虫荧光素酶的DNA片段, 并亚克隆至逆转录病毒载体pCX4pur(基因库编号:AB086386) 中。然后, 通过将上述逆转录病毒表达载体与pGP及pE-Ampho质粒(Takara Bio;Shiga, Japan) 一起转染至293T细胞(ATCC; Manassas, USA) 中来产生无辅助的重组逆转录病毒。接下来, 用所述重组逆转录病毒感染HSC-2细胞, 且在嘌呤霉素(2μg/mL) 存在下培养两周。自培养物的多克隆增殖性群体选择经感染的细胞。

[0308] 在麻醉下, 将人类SCCHN细胞系HSC-2-Luc接种至6周龄雌性裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj小鼠;Charles River, Inc.;Shizuoka, Japan) 的舌中(50μL PBS中 $1 \times 10^6$  个细胞)。移植后7天, 使用来自HSC-2-Luc细胞的生物发光信号来分析肿瘤体积。对于生物发光成像, 在1%至2%吸入异氟醚麻醉下将0.1mL的15mg/mL D-荧光素(Promega, Madison, WI) 腹膜内注射至裸小鼠中。生物发光信号是使用由高度灵敏冷却电荷耦合器件照相机组成的IVIS SPECTRUM系列(PerkinElmer, Waltham, MA) 来监测。使用Living Image软件(PerkinElmer, Waltham, MA) 使成像数据网格化并对每一感兴趣区域(ROI) 中的总生物发光

信号进行积分。所有生物发光影像均是以1秒曝光获得。使用ROI中的总光子通量发射(光子/秒)来分析数据。

[0309] 基于在第1天给药时所获得的总光子通量发射,将小鼠分组,使得总光子通量发射的平均值在各组之间实质上相等。将化合物(1)或顺铂与或不与西妥昔单抗(Erbitux, Merck Serono Co., Ltd.)一起一周一次静脉内给药持续3周(Q7D×3时间表)。使用相同程序来进行两个实验且自所述实验收集所有数据。每一群组是由16只小鼠组成。

[0310] 成像数据显示,仅化合物(1)与西妥昔单抗的治疗在第14天后使所有小鼠中的生物发光信号明显降低(图6A-6B)。将每一治疗组的中位数存活时间(MST)计算为死亡天数的中位数。通过以下公式来计算寿命增加(ILS):  $ILS(\%) = (\text{经测试化合物治疗的动物的MST} - \text{对照动物的MST}) / \text{对照动物的MST} \times 100$ 。每一测试化合物的ILS(%)示于表11中。

[0311] 表11

	测试化合物	剂量(mg/kg)	西妥昔单抗(mg/kg)	ILS (%)
	-	-	5	231
[0312]	顺铂	5	-	0
		5	5	150
	化合物(1)	0.09	-	238
		0.09	5	>1150

[0313] 药理学测试实施例12. 与辐射组合的FaDu s.c.异种移植物模型

[0314] 通过逆转录病毒介导的基因转移建立荧光素酶转导的FaDu-Luc细胞。首先,自pGL3-增强子质粒(基因库编号:U47297)获得编码萤火虫荧光素酶的DNA片段,并亚克隆至逆转录病毒载体pCX4pur(基因库编号:AB086386)中。然后,通过将上述逆转录病毒表达载体与pGP及pE-Ampho质粒(Takara Bio;Shiga, Japan)一起转染至293T细胞(ATCC; Manassas, USA)中来产生无辅助的重组逆转录病毒。接下来,用所述重组逆转录病毒感染FaDu细胞,且在嘌呤霉素(2 $\mu$ g/mL)存在下培养两周。自培养物的多克隆增殖性群体选择经感染的细胞。

[0315] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的荧光素酶转导的人类SCCHN细胞系FaDu-Luc用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.)的右大腿皮下部分中。细胞接种后13天,使用来自FaDu-Luc细胞的生物发光信号来分析肿瘤体积。对于生物发光成像,在1%至2%吸入异氟醚麻醉下将0.1mL的15mg/mL D-荧光素(Promega, Madison, WI)腹膜内注射至裸小鼠中。生物发光信号是使用由高度灵敏冷却电荷耦合器件照相机组成的IVIS SPECTRUM系列(PerkinElmer, Waltham, MA)来监测。使用Living Image软件(PerkinElmer, Waltham, MA)使成像数据网格化并对每一感兴趣区域(ROI)中的总生物发光信号进行积分。所有生物发光影像均是以1秒曝光获得。使用ROI中的总光子通量发射(光子/秒)来分析数

据。总光子通量发射是根据以下计算公式来计算：

[0316] 相对生物发光水平 = 总光子通量发射 (第X天) / 总光子通量发射 (第1天)

[0317] 肿瘤消退 (%) = (1 - 最低相对生物发光水平) × 100

[0318] 基于在第1天给药时所获得的总光子通量发射,将小鼠分组,使得总光子通量发射的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。在第1天及第8天经由尾静脉注射给予化合物(1)。在第4天及第11天以18Gy实施辐照。化合物(1)的肿瘤消退示于表12中。

[0319] 表12

	测试化合物	剂量(mg/kg)	辐射(Gy)	肿瘤消退(%)
[0320]	-	-	18	16
	化合物(1)	0.09	-	0
		0.09	18	97

[0321] 药理学测试实施例13. 在小鼠中与抗mPD-1抗体组合在CT26皮下同基因模型中的抗肿瘤活性

[0322] 将已于含有10%FBS以及青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中培养的鼠类未分化的结肠癌细胞系CT26用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $2 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。在第1天,将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄BALB/c小鼠(BALB/cAnNCr1Cr1j,雌性,Charles River Laboratories Japan,Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后两天,将小鼠随机分成四组,且每一群组是由8只小鼠组成。通过使用电子数字卡尺(Digimatic<sup>TM</sup>测径器,Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0323] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) = 最长直径(mm) × 最短直径(mm) × 最短直径(mm) / 2

[0324] T/C = (治疗组的平均肿瘤体积) / (对照组的平均肿瘤体积)

[0325] 肿瘤生长抑制(%) = (1 - T/C) × 100

[0326] 在第3天及第11天以0.09mg/kg静脉内给药测试化合物。在第3天、第7天、第11天及第15天以10mg/kg静脉内给予抗mPD-1抗体(BE0146,Bio X Cell)。每一测试化合物在第15天时的肿瘤生长抑制(%)示于表13中。

[0327] 表13

	测试化合物	剂量(mg/kg)	抗 mPD-1 抗体 (mg/kg)	在第 15 天时的肿瘤生长抑制 (%)
[0328]	-	-	10	32
	化合物(1)	0.09	-	30
		0.09	10	62

[0329] 药理学测试实施例14. 在体外对微管蛋白聚合的效应 (图10A)

[0330] 微管蛋白聚合分析试剂盒是自Cytoskeleton, Inc. (目录号BK011P) 购得。该试剂盒含有1瓶自猪脑纯化的冻干微管蛋白、3管冻干GTP、2瓶冻干分析缓冲液及1瓶微管蛋白甘油缓冲液。分析缓冲液是通过将内容物溶解于10mL去离子并灭菌的水中来制备。此溶液含有80mmol/L哌嗪-N,N'-双[2-乙磺酸]倍半钠盐、2.0mmol/L氯化镁、0.5mmol/L乙二醇-二(2-氨基-乙基醚)N,N,N',N'-四-乙酸(pH 6.9)及10 $\mu$ mol/L荧光报道基因。将该缓冲液储存在-70 $^{\circ}$ C直至使用。微管蛋白甘油缓冲液是由以下组成:80mmol/L哌嗪-N,N'-双[2-乙磺酸]倍半钠盐、2.0mmol/L氯化镁、0.5mmol/L乙二醇-二(2-氨基-乙基醚)N,N,N',N'-四-乙酸及60% v/v甘油(pH 6.9)。将其储存在4 $^{\circ}$ C直至使用。GTP原液是通过将每一管的内容物溶解于100 $\mu$ L去离子并灭菌的水中以得到浓度为100mmol/L GTP来制备。将此原液的等分试样储存在-70 $^{\circ}$ C直至使用。通过添加1.1mL分析缓冲液及GTP原液的混合物(100:1, v/v)将微管蛋白粉末溶解来制备微管蛋白原液(10mg/mL)。将等分试样冷冻于液氮中,然后在-70 $^{\circ}$ C储存直至使用。

[0331] 在微管蛋白聚合分析中,反应混合物是通过将820 $\mu$ L分析缓冲液、17.6 $\mu$ L GTP原液及600 $\mu$ L微管蛋白甘油缓冲液混合来制备。将反应混合物(1015 $\mu$ L)与240 $\mu$ L微管蛋白原液合并。此溶液称为微管蛋白反应混合物且用于测量测试及对照孔。通过将89.85 $\mu$ L反应混合物与21.25 $\mu$ L分析缓冲液混合制备无微管蛋白的反应混合物来测量空白孔。将化合物(1)溶液(6.25-100 $\mu$ mol/L;最终浓度0.625-10 $\mu$ mol/L)或媒介物以5 $\mu$ L添加至96孔半微量滴定板的各个孔中。将微管蛋白反应混合物或无微管蛋白反应混合物以45 $\mu$ L添加至该板的每一孔。使用SpectraMax<sup>®</sup> M5e微量板读数仪(Molecular Devices)每2分钟测量460nm(激发波长360nm)下的荧光发射,持续90分钟。由于发生聚合时荧光报道基因并入至微管中,因此微管蛋白聚合后荧光增强。该分析是以一式两份实施。该分析展示,化合物(1)以浓度依赖性方式抑制微管蛋白聚合。每一时间点的荧光强度是通过以下公式来计算:

[0332] 荧光强度=测试孔或对照孔的平均荧光测量值-空白孔的平均荧光测量值;空白孔:含有媒介物不含微管蛋白;对照孔:含有媒介物及微管蛋白;测试孔:含有化合物及微管蛋白。

[0333] 药理学测试实施例15. 基于细胞的微管动力学分析(图10B)

[0334] 利用U2OS-EB3-AG骨肉瘤细胞系进行基于细胞的微管(MT)动力学分析,其中EB3(微管正端结合蛋白)及Azami-绿色(Azami-Green, EB3-AG)的融合蛋白稳定表达。将U2OS-EB3-AG细胞于含有10%FBS及青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中在37 $^{\circ}$ C于加湿5%CO<sub>2</sub>氛围中培养。活细胞中的MT动力学可可视化为EB3-AG的彗星样结构的运动。利用化合物(1)以指示浓度处理平铺于基于玻璃的培养板(EZVIEW板, AGC Techno Glass, Japan)上的U2OS-EB3-AG细胞,且使用具有60倍放大率油浸物镜的荧光显微镜(BZ-X710, KEYENCE, Japan)通过延时成像来监测微管动力学。指示时间点处的静态影像呈现于图10B中。框区域的放大率更高的视图显示于插图中。当用化合物(1)以0.5nM(U2OS-EB3-AG细胞中抗增殖活性的IC<sub>50</sub>值)处理时,在添加化合物后约60分钟时难以观察到彗星样结构。所述结果明显证明,化合物(1)具有阻抑MT动力学的能力。

[0335] 药理学测试实施例16. 体外抗增殖活性(图11)

[0336] 使用一小组癌细胞系(包括食管的人类鳞状细胞癌(OE21、TE-8)、食管的人类腺癌(OE33)及人类子宫肉瘤(MES-SA、MES-SA-Dx5-Rx1))来进行化合物(1)的体外抗增殖分析。

于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将所有细胞系于含有10%FBS及青霉素-链霉素(培养基)的RPMI-1640培养基中培养。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)的每一孔添加75μL用培养基调整至浓度为4×10<sup>4</sup>个细胞/mL的细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加25μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1),并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育72小时。然后,利用2013EnVision™多标记读数仪(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)通过CellTiter-Glo®发光细胞存活率分析(Promega)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需化合物(1)的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),并示于图11中。将P-gp易感性计算为过表达P-gp的MES-SA-Dx5-Rx1细胞的IC<sub>50</sub>值与MES-SA细胞的IC<sub>50</sub>值的比率。

[0337] 药理学测试实施例17. 作为单一疗法在小鼠中的KPL-4异种移植物模型中的抗肿瘤效应;作为单一疗法在小鼠中的COLO-704异种移植物模型中的抗肿瘤效应(图12)

[0338] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素的DMEM中培养的人类HER-2阳性乳腺癌细胞系KPL-4用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为1×10<sup>8</sup>个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100μL的体积接种至8周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j, 雌性, Charles River Laboratories Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后11天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器, Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0339] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) = 最长直径(mm) × 最短直径(mm) × 最短直径(mm) / 2

[0340] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0341] 相对体重(RBW) = 体重(第X天) / 体重(第1天)

[0342] 基于在第1天时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前,用盐水稀释原液。将于盐水中的测试化合物以20μg/kg、60μg/kg或180μg/kg一周一次静脉内给药持续2周(在第1天及第8天)。在60μg/kg及180μg/kg治疗组中观察到肿瘤消退,且以180μg/kg给予在第15天时完全根除所有小鼠中的异种移植物肿瘤。

[0343] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素的RPMI-1640中培养的人类卵巢癌细胞系COLO-704用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为1×10<sup>8</sup>个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100μL的体积接种至5周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCr1j, 雌性, Charles River Laboratories Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后9天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器, Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0344] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) = 最长直径(mm) × 最短直径(mm) × 最短直径(mm) / 2

[0345] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0346] 相对体重(RBW) = 体重(第X天) / 体重(第1天)

[0347] 基于在第1天时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前,用盐水稀释原液。将于盐水中的

测试化合物以20 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg或180 $\mu$ g/kg一周一次静脉内给药持续2周(在第1天及第8天)。化合物治疗在180 $\mu$ g/kg下诱导肿瘤消退且在60 $\mu$ g/kg下诱导肿瘤生长延迟。以180 $\mu$ g/kg给予在第22天时完全根除所有小鼠中的异种移植物肿瘤。

[0348] 药理学测试实施例18.对小鼠中的FaDu皮下模型中的CD31阳性血管的效应(图13)

[0349] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素(培养基)的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用培养基调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj,雌性,Charles River Laboratories Japan,Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将每一测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前,用盐水稀释原液。将于盐水中的测试化合物以20 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg或180 $\mu$ g/kg静脉内给药。单次给药后5天,收集肿瘤样品并用IHC锌固定剂(BD Pharmingen)在4 $^{\circ}$ C固定24小时。将石蜡包埋的组织切片(3 $\mu$ m),安装在带正电的载玻片上,并风干。根据制造商的方案,使用Ventana自动染色仪型号Discover XT(Roche Diagnostics)对CD31进行免疫组织化学染色。将切片脱蜡,调理并用CC1(Ventana Medical Systems)恢复抗原。将载玻片用封阻剂A及封阻剂B(内源性生物素封阻试剂盒,Roche Diagnostics)封阻。以2 $\mu$ g/mL施加大鼠抗小鼠IgG CD31抗体(Dianova GmbH)。使切片与该抗体一起孵育6小时,之后与2.2 $\mu$ g/mL的生物素化抗大鼠IgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)一起孵育32分钟。利用抗生物素链菌素-HRP D实施检测持续16分钟,之后与DAB D及DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D(DABMap试剂盒,Ventana Medical Systems,Inc.)一起孵育8分钟。将载玻片用苏木素II(Roche Diagnostics)复染16min,之后与返蓝试剂一起孵育4分钟。使切片于梯度乙醇中脱水,于二甲苯更换液中脱脂并用DPX<sup>®</sup>(Merck KGaA)覆盖。使用Vectra<sup>®</sup> 2自动化载玻片成像系统(Perkin Elmer Inc.)扫描经免疫染色的载玻片。通过使用inform 2软件(PerkinElmer Inc.)计数CD31阳性对象来量化整个肿瘤中的血管数量。通过使用inform 2软件(PerkinElmer Inc.)评价苏木素染色面积来测量肿瘤区域的面积。由肿瘤区域的面积使血管数量归一化。以20 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg及180 $\mu$ g/kg的剂量单次给予测试化合物使肿瘤血管数量增加。利用以下公式计算测试化合物给药组中的血管数量与未经治疗组相比的比率:

[0350] 肿瘤血管比率=测试化合物给药组的血管数量/未经治疗组的血管数量)

[0351] 药理学测试实施例19.对小鼠中的FaDu皮下模型中的 $\alpha$ -SMA阳性CAF的效应(图14)

[0352] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素(培养基)的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用培养基调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj,雌性,Charles River Laboratories Japan,Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由5只小鼠组成的群组上进行。将每一测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前,用盐水稀释原液。将于盐水中的测试化合物以20 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg或180 $\mu$ g/kg静脉内给予。单次给予后2天或5天,收集肿瘤样品并用IHC锌固定剂(BD Pharmingen)在4 $^{\circ}$ C固定24小时。将石蜡包埋的组织切片(3 $\mu$ m),安装在带正电的载玻片上,

并风干。将切片脱蜡,调理并使用微波用1mM EDTA (pH 6.0) 恢复抗原。将切片用于TBS中的1%BSA封阻。以5 $\mu$ g/mL施加偶联有碱性磷酸酶的小鼠抗 $\alpha$ -SMA单克隆抗体(克隆1A4, Sigma)。使切片与该抗体一起孵育2.5小时。利用坚牢红II (Fast red II) 基质试剂盒(Nichirei Bioscience Inc.) 实施检测。用迈耶苏木素(Muto Pure Chemicals) 将切片复染50秒。使切片于梯度乙醇中脱水,于二甲苯更换液中脱脂并用DPX (Merck KGaA) 覆盖。使用Vectra 2自动化载玻片成像系统(Perkin Elmer Inc.) 扫描经免疫染色的载玻片。通过使用inform 2软件(PerkinElmer Inc.) 计数 $\alpha$ -SMA阳性对象来量化整个肿瘤中 $\alpha$ -SMA阳性区域的面积。通过使用inform 2软件(PerkinElmer Inc.) 评价苏木素染色面积来测量肿瘤区域的面积。由肿瘤区域的面积使 $\alpha$ -SMA-阳性区域的面积归一化。在以60 $\mu$ g/kg及180 $\mu$ g/kg的剂量给药的第三天及以180 $\mu$ g/kg的剂量单次给药测试化合物的第六天显著降低 $\alpha$ -SMA阳性面积。利用以下公式来计算测试化合物给药组的 $\alpha$ -SMA-阳性面积的抑制率:

[0353]  $\alpha$ -SMA比率 = 测试化合物给药组的 $\alpha$ -SMA面积 / 未经治疗组的 $\alpha$ -SMA面积

[0354] 药理学测试实施例20. 对小鼠中的FaDu皮下模型中的腱糖蛋白-C及EDA-纤连蛋白的效应(图15)

[0355] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素(培养基)的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用培养基调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种后10天,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由5只小鼠组成的群组上进行。将化合物(1)溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。将化合物(1) (180 $\mu$ g/kg)及西妥昔单抗(CTX, Erbitux<sup>®</sup>, Merck Serono Co.Ltd.) (10mg/kg)用盐水稀释,并在第1天静脉内注射。单次给予后5天,收集肿瘤样品并用IHC锌固定剂(BD Pharmingen)在4 $^{\circ}$ C固定24小时。将石蜡包埋的组织切片(3 $\mu$ m),安装在带正电的载玻片上,并风干。将切片脱蜡,调理并使用微波用1mM EDTA (pH 6.0) 针对腱糖蛋白-C修复抗原。对于EDA-纤连蛋白,抗原修复程序不是必需的。将切片与BLOXALL封阻溶液(Vector Labs)一起孵育10min以封阻内源性过氧化酶,且与小鼠抗小鼠Ig封阻试剂(Vector Labs)一起孵育1小时,且然后与2.5%正常马血清一起孵育30分钟。对于腱糖蛋白-C的免疫组织化学染色,以5 $\mu$ g/mL施加小鼠抗腱糖蛋白-C单克隆抗体(克隆4C8MS, IBL)。将切片与该抗体一起在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。对于EDA-纤连蛋白的免疫组织化学染色,以1.5 $\mu$ g/mL施加小鼠抗EDA-纤连蛋白单克隆抗体(克隆IST-9, Abcam)。使切片与该抗体一起在室温孵育1小时。利用小鼠抗小鼠ImmPRESS<sup>™</sup>过氧化酶聚合物试剂盒(Vector Labs)实施检测。用迈耶苏木素(Muto Pure Chemicals) 将切片复染50秒。使切片于梯度乙醇中脱水,于二甲苯更换液中脱脂并用DPX (Merck KGaA) 覆盖。使用Vectra 2自动化载玻片成像系统(Perkin Elmer Inc.) 扫描经免疫染色的载玻片。与对照肿瘤相比,在经化合物(1)及CTX治疗的肿瘤中,腱糖蛋白-C及ED-A纤连蛋白二者的表达水平均降低。

[0356] 药理学测试实施例21. 与西妥昔单抗组合在小鼠中的FaDu皮下异种移植物模型中的抗肿瘤效应(图16)

[0357] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中培养的人类头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)细胞系FaDu用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备



细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至无胸腺小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 雌性, 7周龄, Charles River Japan Inc.) 的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后10天, 通过使用电子数字卡尺(Mitutoyo Corporation) 测量每一小鼠中肿瘤的长度及宽度, 以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0358] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm) / 2

[0359] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0360] 基于TV, 将小鼠随机分组(第1天)。每一群组是由6只小鼠组成。将化合物(1) 溶解于DMSO中, 并将溶液在使用之前储存于冰箱中。将化合物(1) (20 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg或180 $\mu$ g/kg) 及西妥昔单抗(CTX, **Erbix®**, Merck Serono Co., Ltd.) (10mg/kg) 用盐水稀释, 并在第1天静脉内注射。每一群组的RTV变化示于图16中。在180 $\mu$ g/kg及60 $\mu$ g/kg剂量下, 化合物(1) 与CTX的抗肿瘤效能强于CTX单一疗法, 其中肿瘤消退。在20 $\mu$ g/kg的剂量下的化合物(1) 与CTX组合的抗肿瘤效能趋向于强于CTX单一疗法。

[0361] 药理学测试实施例22. 作为单一疗法在小鼠中的软组织肉瘤异种移植模型中的抗肿瘤效应(图17)

[0362] MES-SA

[0363] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素的RPMI-1640中培养的人类子宫肉瘤细胞系MES-SA用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $2 \times 10^8$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液, 并将该悬浮液与**Geltrex®** (Thermo Fisher Scientific Inc., 编号A1413202) 以1:1的比率混合以制备浓度为 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL的细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 雌性, Charles River Laboratories Japan Inc.) 的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后6天, 通过使用电子数字卡尺(Digimatic™测径器, Mitutoyo Corporation) 测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径, 以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0364] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm) / 2

[0365] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0366] 基于在第1天时所获得的肿瘤体积, 将小鼠分组, 使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由6只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于DMSO中, 并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前, 用盐水稀释原液。将于盐水中的测试化合物以180 $\mu$ g/kg一周一次静脉内给药持续2周(在第1天及第8天)。在治疗组中观察到肿瘤生长延迟的抗肿瘤活性。

[0367] HT-1080

[0368] 将已于含有10%FBS、NEAA及抗生素的E-MEM中培养的人类纤维肉瘤细胞系HT-1080用培养基调整至浓度为 $3 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至无胸腺小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 雌性, 6周龄, Charles River Japan Inc.) 的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后6天, 通过使用电子数字卡尺(Mitutoyo Corporation) 测量每一小鼠中肿瘤的长度及宽度, 以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0369] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm) / 2

[0370] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天) / 肿瘤体积(第1天)

[0371] 基于TV,将小鼠随机分组(第1天)。每一群组是由6只小鼠组成。将化合物(1)溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。将化合物(1)(180 $\mu$ g/kg)用盐水稀释,并在第1天及第8天静脉内注射。每一群组的RTV的变化示于图17中。在治疗组中观察到肿瘤消退的抗肿瘤活性。

[0372] CTG-2041

[0373] 将人类血管肉瘤CTG-2041的肿瘤片段皮下(s.c.)植入于雌性小鼠的左侧腹中。使用数字卡尺一周两次监测肿瘤生长,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0374] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)/2

[0375] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天)/肿瘤体积(第1天)

[0376] 当肿瘤体积达到约200 $\text{mm}^3$ 时,按肿瘤体积将动物匹配至治疗或对照组中,并在第1天开始给药。每一群组是由5只小鼠组成。将化合物(1)溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。将化合物(1)(100 $\mu$ g/kg)稀释于盐水中,并在第1天及第8天静脉内注射。每一群组的RTV的变化示于图17中。在治疗组中观察到肿瘤消退的抗肿瘤活性。

[0377] 药理学测试实施例23.作为单一疗法在小鼠中的子宫内膜癌肉瘤异种移植模型中的抗肿瘤效应(图18)

[0378] HEC-108

[0379] 将已于含有15%FBS及抗生素的E-MEM中培养的人类子宫内膜癌细胞系HEC-108用培养基调整至浓度为 $7.14 \times 10^7$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以150 $\mu$ L的体积接种至无胸腺小鼠(CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj,雌性,6周龄,Charles River Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后13天,通过使用电子数字卡尺(Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的长度及宽度,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0380] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)/2

[0381] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天)/肿瘤体积(第1天)

[0382] 基于TV,将小鼠随机分组(第1天)。每一群组是由6只小鼠组成。将化合物(1)溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。将化合物(1)(180 $\mu$ g/kg)稀释于盐水中,并在第1天及第8天静脉内注射。每一群组的RTV的变化示于图18中。在治疗组中观察到肿瘤生长延迟的抗肿瘤活性。

[0383] AN3CA

[0384] 将已于含有10%FBS及青霉素-链霉素的E-MEM中培养的人类子宫内膜癌细胞系AN3CA用汉克斯平衡盐溶液调整至浓度为 $1.4 \times 10^8$ 个细胞/mL以制备细胞悬浮液,并将该悬浮液与Geltrex<sup>®</sup>(Thermo Fisher Scientific Inc.,编号A1413202)以1:1的比率混合以制备浓度为 $7 \times 10^7$ 个细胞/mL的细胞悬浮液。将该细胞悬浮液以100 $\mu$ L的体积接种至6周龄裸小鼠(CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj,雌性,Charles River Laboratories Japan Inc.)的右侧腹的皮下部分中。细胞接种(第1天)后12天,通过使用电子数字卡尺(Digimatic<sup>™</sup>测径器, Mitutoyo Corporation)测量每一小鼠中肿瘤的最短直径及最长直径,以便根据以下计算公式来计算肿瘤的体积:

[0385] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 最长直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)  $\times$  最短直径(mm)/2

[0386] 相对肿瘤体积(RTV) = 肿瘤体积(第X天)/肿瘤体积(第1天)

[0387] 基于在第1天时所获得的肿瘤体积,将小鼠分组,使得肿瘤体积的平均值在各组之间实质上相等。该实验是在各自由5只小鼠组成的群组上进行。将测试化合物溶解于DMSO中,并将溶液在使用之前储存于冰箱中。在即将给予之前,用盐水稀释原液。将于盐水中的测试化合物以180 $\mu$ g/kg一周一次静脉内给药持续2周(在第1天及第8天)。在治疗组中观察到肿瘤消退的抗肿瘤活性。

[0388] 药理学测试实施例24.NCI-N87及MKN-28生长抑制分析

[0389] 在此分析中,分别测量测试化合物在人类胃癌细胞系NCI-N87及MKN-28中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中将NCI-N87及MKN-28细胞维持在含有10%FBS、青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加100 $\mu$ L用培养基调整至浓度为 $3 \times 10^4$ 个细胞/mL的NCI-N87或MKN-28细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加100 $\mu$ L悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),并示于表14中。

[0390] 表14

	NCI-N87	MKN-28
	(IC <sub>50</sub> (nM))	(IC <sub>50</sub> (nM))
[0391] 软海绵素 B	0.007	0.017
化合物(1)	0.002	0.015

[0392] 药理学测试实施例25.HuTu 80生长抑制分析

[0393] 在此分析中,测量测试化合物在自十二指肠组织分离的人类小肠癌细胞系HuTu 80中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中将HuTu 80细胞维持在含有10%FBS、青霉素及链霉素的EMEM培养基中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加100 $\mu$ L用培养基调整至浓度为 $3 \times 10^4$ 个细胞/mL的HuTu80细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加100 $\mu$ L悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37°C)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),并示于表15中。

[0394] 表15

**HuTu 80**

	<b>测试化合物</b>	<b>(IC<sub>50</sub> (nM))</b>
[0395]	软海绵素 B	0.031
	化合物(1)	0.019

[0396] 药理学测试实施例26.SW780生长抑制分析

[0397] 在此分析中,测量测试化合物在人类泌尿道上皮癌细胞系SW780中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将SW780细胞维持在含有10%FBS、青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加100μL用培养基调整至浓度为3×10<sup>4</sup>个细胞/mL的SW780细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加100μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),并示于表16中。

[0398] 表16

**SW780**

	<b>测试化合物</b>	<b>(IC<sub>50</sub> (nM))</b>
[0399]	软海绵素 B	0.032
	化合物(1)	0.017

[0400] 药理学测试实施例27.HS-SY-II生长抑制分析

[0401] 在此分析中,测量测试化合物在人类滑膜肉瘤细胞系HS-SY-II中的生长抑制活性。于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中将SH-SY-II细胞维持在含有10%FBS、青霉素及链霉素的DMEM培养基中。向96孔板(Becton,Dickinson and Company,353219)的每一孔添加100μL用培养基调整至浓度为3×10<sup>4</sup>个细胞/mL的HS-SY-II细胞悬浮液,并将所述细胞于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育过夜。在第二天,向每一孔添加100μL悬浮于培养基中的于三倍稀释系列中的化合物(1)或软海绵素B,并将所得物于5%CO<sub>2</sub>孵育器(37℃)中孵育3天。然后,通过CellTiter-Glo<sup>®</sup>发光细胞存活率分析(Promega)利用EnVision2103多标记读数仪(Perkin-Elmer,Wellesley,MA)测定细胞存活率。含有细胞但不添加测试化合物的孔的值定义为100%且不含细胞的孔的值定义为0%。计算将细胞生长抑制50%所需测试化合物的浓度(即,IC<sub>50</sub>值),并示于表17中。

[0402] 表17

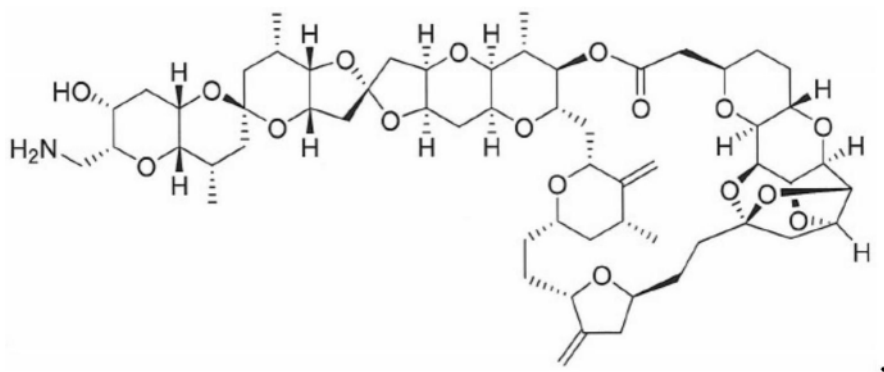
## HS-SY-II

	测试化合物	(IC <sub>50</sub> (nM))
[0403]	软海绵素 B	0.010
	化合物(1)	0.002

[0404] 具体地,本发明涉及如下方面:

[0405] 1.一种化合物,其具有以下结构:

[0406]



[0407] 或其药学上可接受的盐。

[0408] 2.一种药物组合物,其包含在药学上可接受的载体中的如1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0409] 3.如1的化合物或其药学上可接受的盐,其用于抑制以血管发生、侵袭或转移为特征的肿瘤或癌症的生长。

[0410] 4.如1的化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗以血管发生、侵袭或转移为特征的肿瘤或癌症。

[0411] 5.如3或4的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、小肠癌、膀胱癌或肉瘤。

[0412] 6.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌。

[0413] 7.如6的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)。

[0414] 8.如6的用于所述用途的化合物,其中所述癌症是腺样囊性癌。

[0415] 9.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是乳腺癌。

[0416] 10.如9的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是HER2阳性乳腺癌。

[0417] 11.如9的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是HER2阴性乳腺癌。

[0418] 12.如9的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是三阴性乳腺癌。

[0419] 13.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是结肠直肠癌。

[0420] 14.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是食管癌。

[0421] 15.如14的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是食管腺癌。

[0422] 16.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是子宫癌。

[0423] 17.如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是卵巢癌。

- [0424] 18. 如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是肉瘤。
- [0425] 19. 如18的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是子宫肉瘤、纤维肉瘤、滑膜肉瘤、软组织肉瘤或血管肉瘤。
- [0426] 20. 如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是胃癌。
- [0427] 21. 如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是小肠癌。
- [0428] 22. 如21的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是小肠腺癌。
- [0429] 23. 如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是膀胱癌。
- [0430] 24. 如5的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是泌尿道上皮癌。
- [0431] 25. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与程序化死亡1蛋白 (PD-1) 抗体组合使用。
- [0432] 26. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与程序化死亡L1蛋白 (PD-L1) 抗体组合使用。
- [0433] 27. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与抗EGFR (表皮生长因子受体) 抗体组合使用。
- [0434] 28. 如27的用于所述用途的化合物,其中该抗EGFR抗体是抗EGFR mAb。
- [0435] 29. 如27或28的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌。
- [0436] 30. 如29的用于所述用途的化合物,其中所述癌症或肿瘤是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)。
- [0437] 31. 如28至30中任一项的用于所述用途的化合物,其中该抗EGFR mAb是西妥昔单抗。
- [0438] 32. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与HER2 (人类表皮生长因子受体) 抗体组合使用。
- [0439] 33. 如32的用于所述用途的化合物,其中该HER2抗体是HER2 mAb。
- [0440] 34. 如32或33的用于所述用途的化合物,其中所述癌症是乳腺癌。
- [0441] 35. 如33或34的用于所述用途的化合物,其中该HER2 mAb是曲妥珠单抗。
- [0442] 36. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与放射疗法组合使用。
- [0443] 37. 如4至24中任一项的用于所述用途的化合物,其用于与手术组合使用。
- [0444] 38. 一种治疗受试者的以血管发生、侵袭或转移为特征的肿瘤或癌症的方法,其包括向该受试者给予任选在药学上可接受的载体中的如1的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0445] 39. 如38的方法,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌、乳腺癌、食管癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、小肠癌、膀胱癌或肉瘤。
- [0446] 40. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌。
- [0447] 41. 如40的方法,其中所述癌症或肿瘤是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)。
- [0448] 42. 如40的方法,其中所述癌症是腺样囊性癌。
- [0449] 43. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是乳腺癌。
- [0450] 44. 如43的方法,其中所述癌症或肿瘤是HER2阳性乳腺癌。
- [0451] 45. 如43的方法,其中所述癌症或肿瘤是HER2阴性乳腺癌。
- [0452] 46. 如43的方法,其中所述癌症或肿瘤是三阴性乳腺癌。
- [0453] 47. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是结肠直肠癌。

- [0454] 48. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是食管癌。
- [0455] 49. 如48的方法,其中所述癌症或肿瘤是食管腺癌。
- [0456] 50. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是子宫癌。
- [0457] 51. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是卵巢癌。
- [0458] 52. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是肉瘤。
- [0459] 53. 如52的方法,其中所述癌症或肿瘤是子宫肉瘤、纤维肉瘤、滑膜肉瘤、软组织肉瘤或血管肉瘤。
- [0460] 54. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是胃癌。
- [0461] 55. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是小肠癌。
- [0462] 56. 如55的方法,其中所述癌症或肿瘤是小肠腺癌。
- [0463] 57. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是膀胱癌。
- [0464] 58. 如39的方法,其中所述癌症或肿瘤是泌尿道上皮癌。
- [0465] 59. 如39至58中任一项的方法,其包括进一步利用程序化死亡1蛋白 (PD-1) 抗体治疗所述受试者。
- [0466] 60. 如39至58中任一项的方法,其包括进一步利用程序化死亡L1蛋白 (PD-L1) 抗体治疗所述受试者。
- [0467] 61. 如39至58中任一项的方法,其包含进一步利用抗EGFR (表皮生长因子受体) 抗体治疗所述受试者。
- [0468] 62. 如61的方法,其中所述抗EGFR抗体是抗EGFR mAb。
- [0469] 63. 如61或62的方法,其中所述癌症或肿瘤是头颈癌。
- [0470] 64. 如63的方法,其中所述癌症或肿瘤是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)。
- [0471] 65. 如62至64中任一项的方法,其中所述抗EGFR mAb是西妥昔单抗。
- [0472] 66. 如39至58中任一项的方法,其包括进一步利用HER2 (人类表皮生长因子受体) 抗体治疗所述受试者。
- [0473] 67. 如66的方法,其中所述HER2抗体是HER2 mAb。
- [0474] 68. 如66或67的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
- [0475] 69. 如67或68的方法,其中所述HER2 mAb是曲妥珠单抗。
- [0476] 70. 一种治疗受试者的HER2阴性乳腺癌或头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN) 的方法,其包括向所述受试者给予如1的化合物或其药学上可接受的盐。
- [0477] 71. 如39至70中任一项的方法,其包括进一步利用放射疗法治疗所述受试者。
- [0478] 72. 如39至71中任一项的方法,其包含进一步利用手术治疗所述受试者。
- [0479] 73. 如39至72中任一项的方法,其中所述受试者是人类。
- [0480] 74. 一种如1的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于抑制以血管发生、侵袭或转移为特征的肿瘤或癌症的生长。
- [0481] 75. 一种如1的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于治疗以血管发生、侵袭或转移为特征的肿瘤或癌症。
- [0482] 等效形式及范围
- [0483] 在权利要求中,除非指示相反情形或自上下文中另外明显可见,否则诸如“一 (a、an)”及“该 (the)”等冠词可意指一个或一个以上。除非指示相反情形或自上下文中另外明

显可见,否则若群组成员中的一个、一个以上或所有均存在于、用于给定产物或过程或以其它方式与给定产物或过程相关,则在群组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或说明书被认为是满足要求的。本发明包括其中恰好一个群组成员存在于、用于给定产物或过程或以其它方式与给定产物或过程相关的实施方案。本发明包括其中一个以上或所有群组成员均存在于、用于给定产物或过程或以其它方式与给定产物或过程相关的实施方案。

[0484] 此外,本发明涵盖其中将来自所列示技术方案中的一个或多个的一种或多种限制、要素、条款及说明性术语引入至另一技术方案中的所有变化形式、组合及排列。举例而言,附属于另一技术方案的任一技术方案可经修饰以包括一种或多种在附属于同一基础技术方案的任何其它技术方案中所发现的限制。倘若以列表形式(例如,以马库什群组(Markush group)格式)呈现要素,则也披露所述要素的每一亚组且可自该群组移除任何要素。应理解,通常,倘若称本发明或本发明的方面包含特定要素和/或特征,则本发明的某些实施方案或本发明的方面是由这些要素和/或特征组成或基本上由其组成。出于简单性目的,那些实施方案未在本文中以所述语言明确陈述。也应注意,术语“包含”及“含有”意欲为开放性的且容许包括其它要素或步骤。在给出范围的情形下,终点包括在内。此外,除非另有指示或自上下文及本领域技术人员的理解另外明显可见,否则表述为范围的值可设想在本发明的不同实施方案中在所陈述范围内的任何特定值或子范围直至该范围下限的单位的十分之一,除非上下文另外明确地指明。

[0485] 本领域技术人员仅使用常规实验即可识别或能够断定本文所阐述的特定实施方案的诸多等效形式。本文所阐述的本发明实施方案的范围并不意欲限于以上说明,而是如随附权利要求中所陈述。本领域技术人员应了解,可在不背离本发明的精神或范围的情形下做出各种变化及修改,如随附权利要求中所限定。



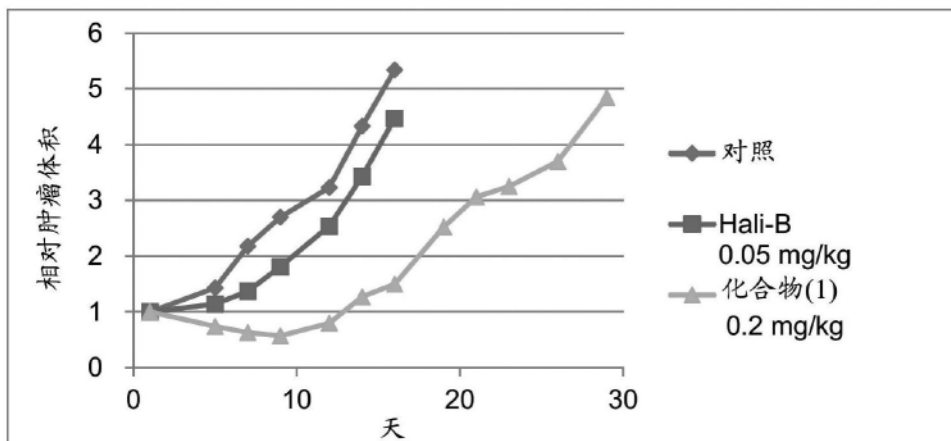


图1

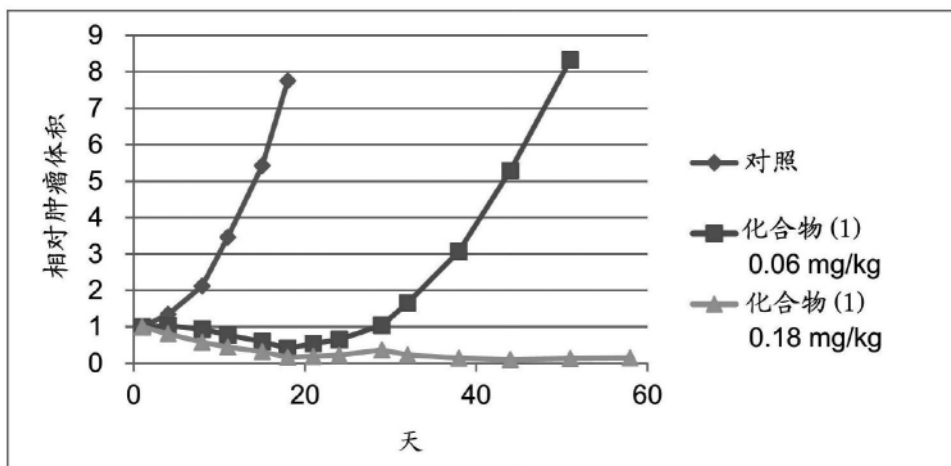


图2

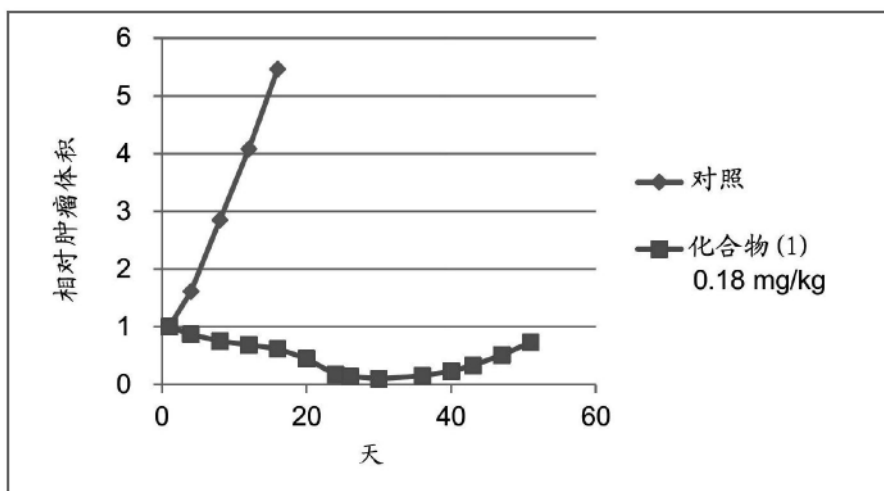


图3

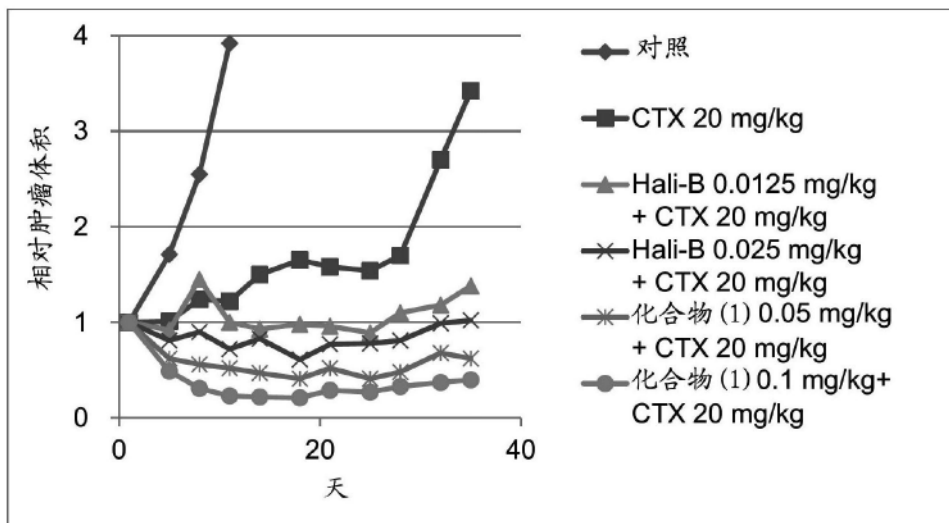


图4

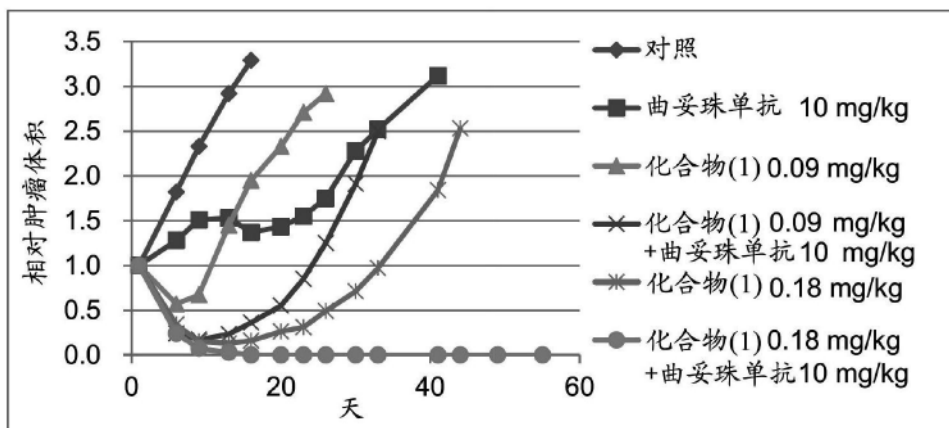


图5

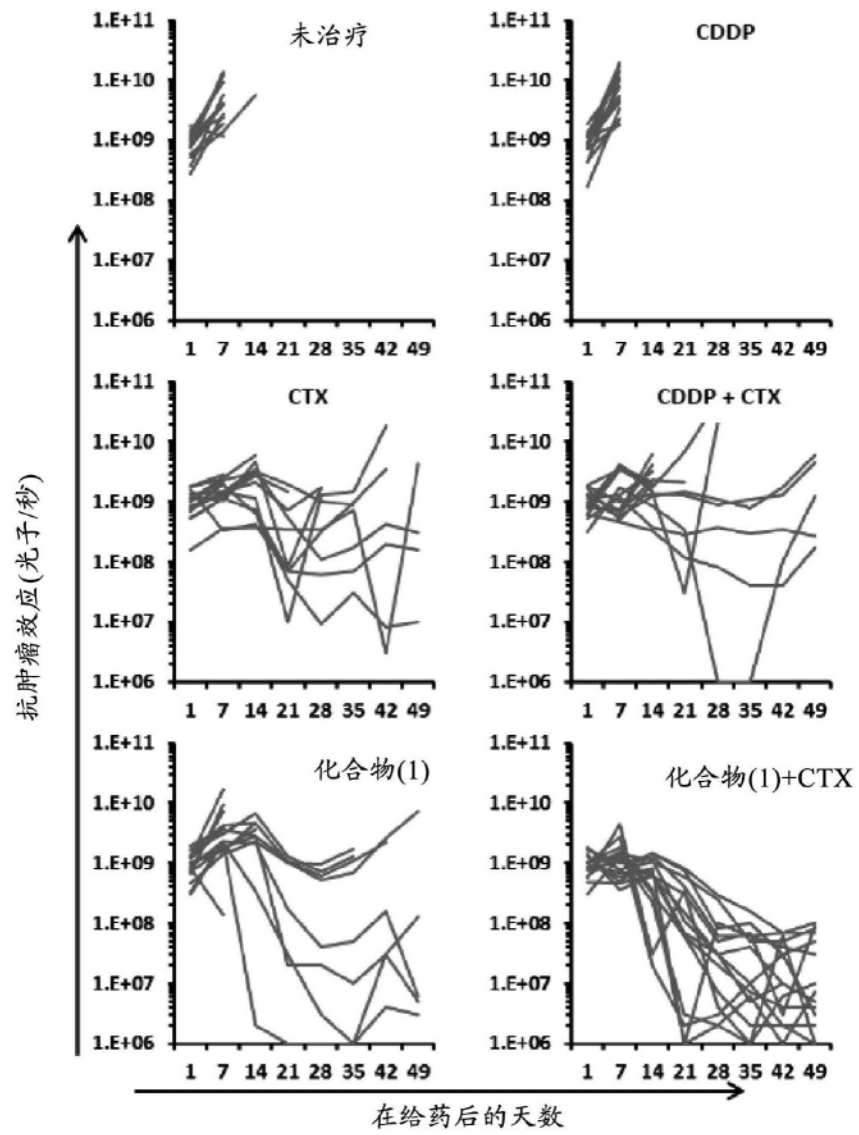


图6A

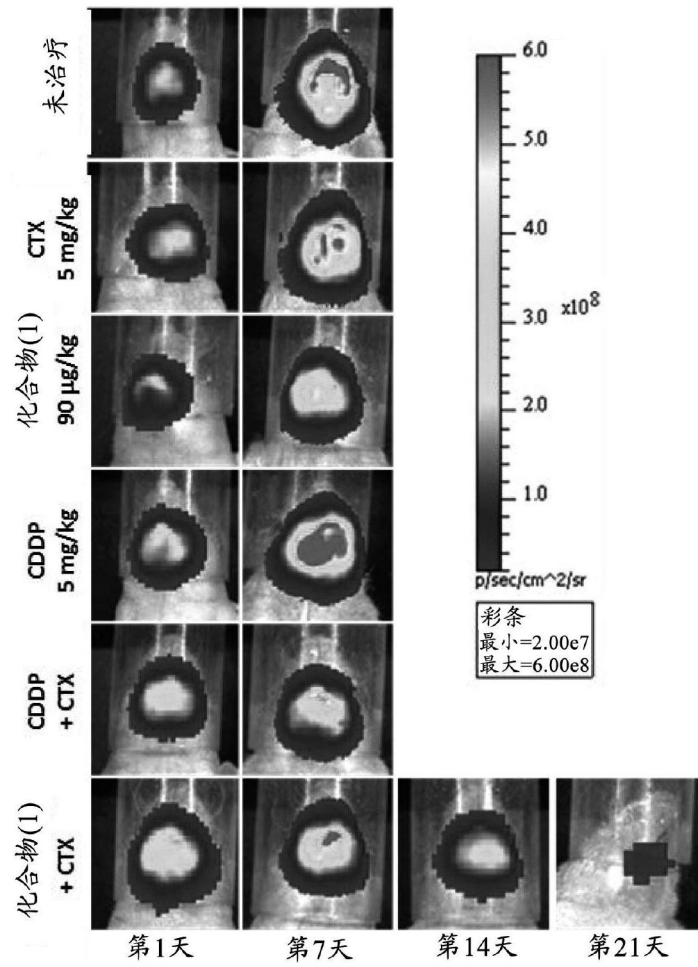


图6B

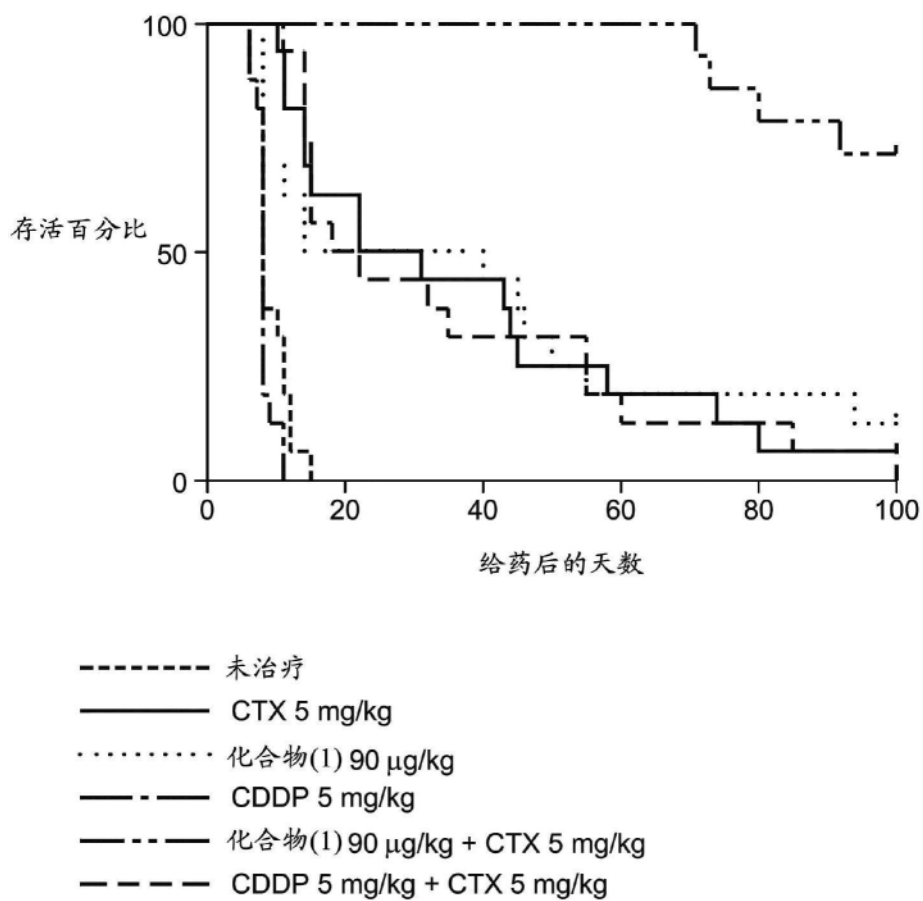


图7A

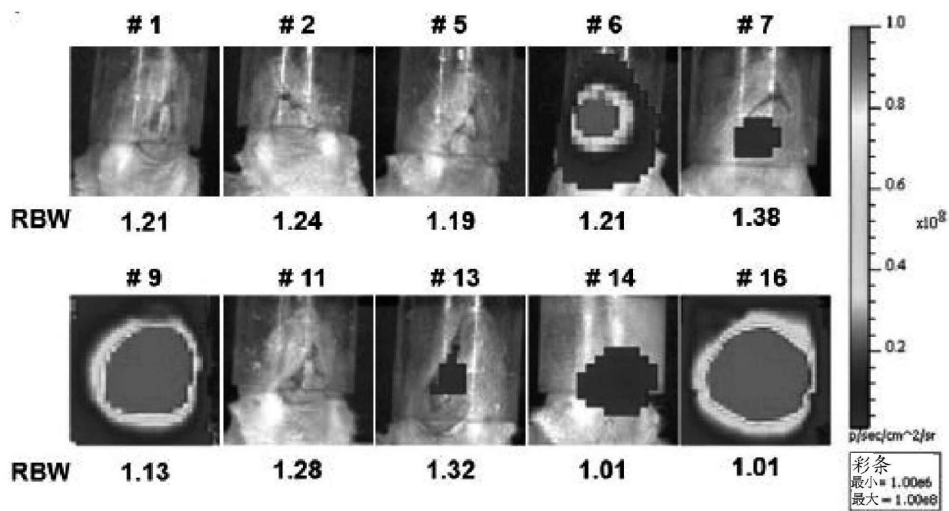


图7B

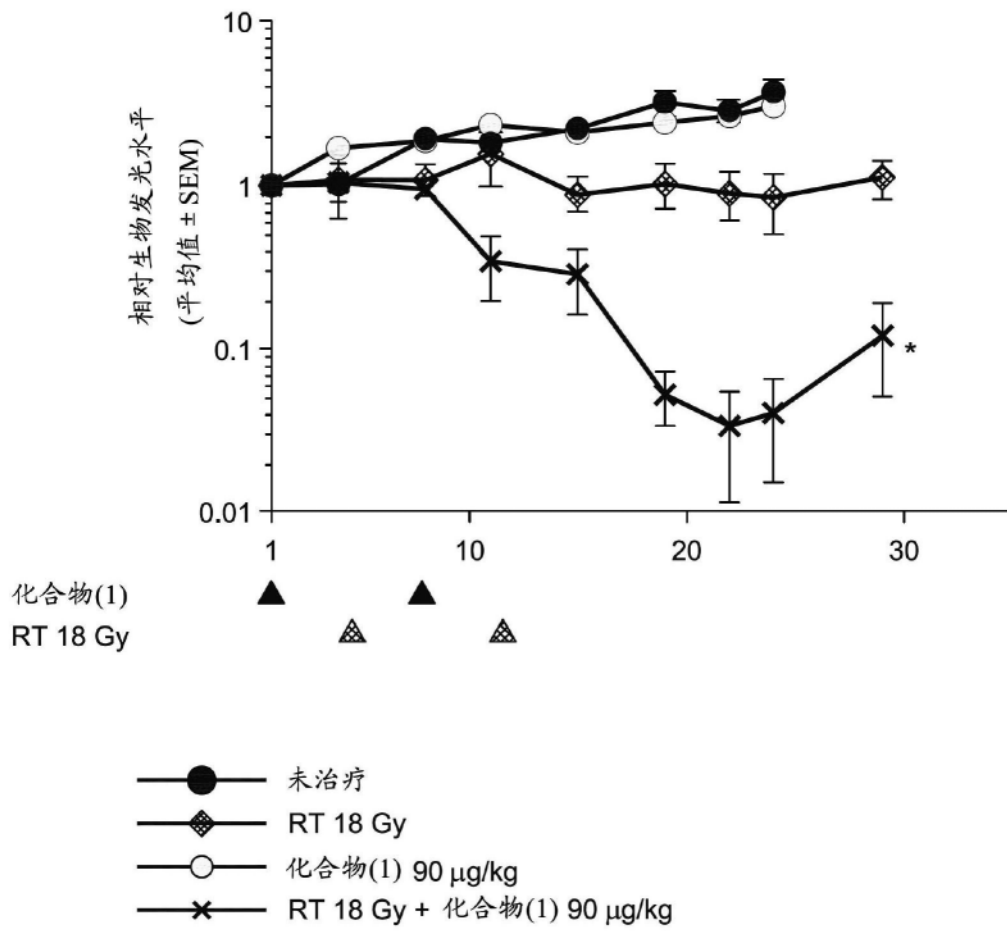


图8A

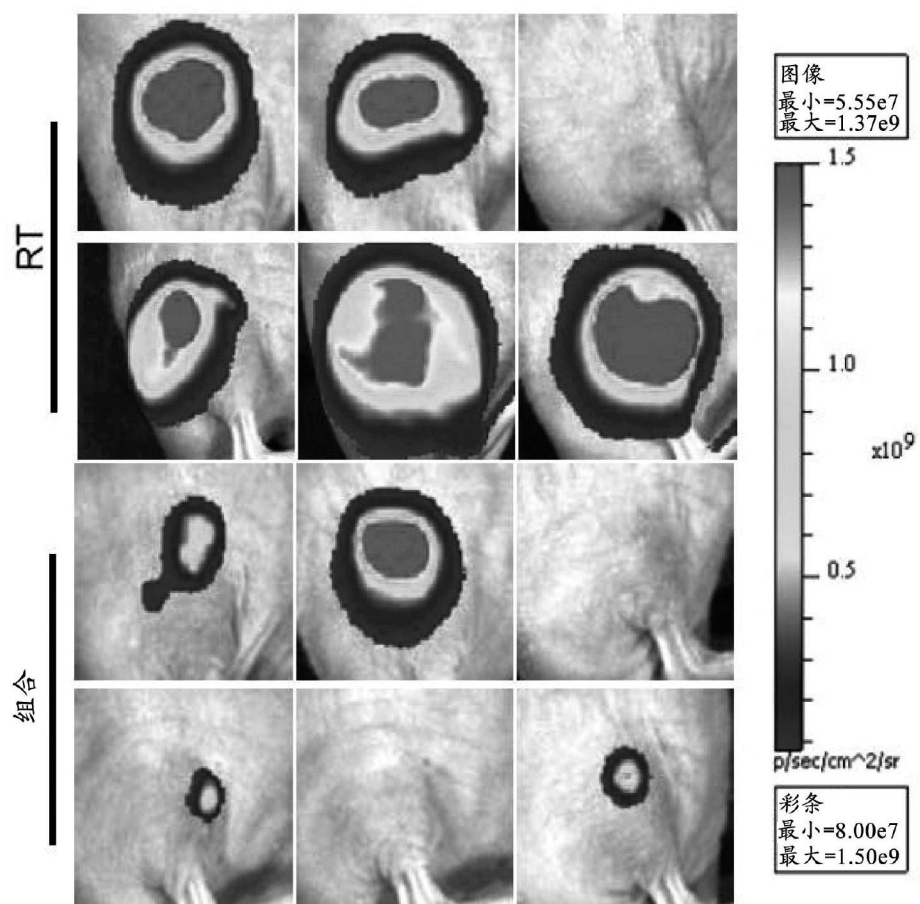


图8B

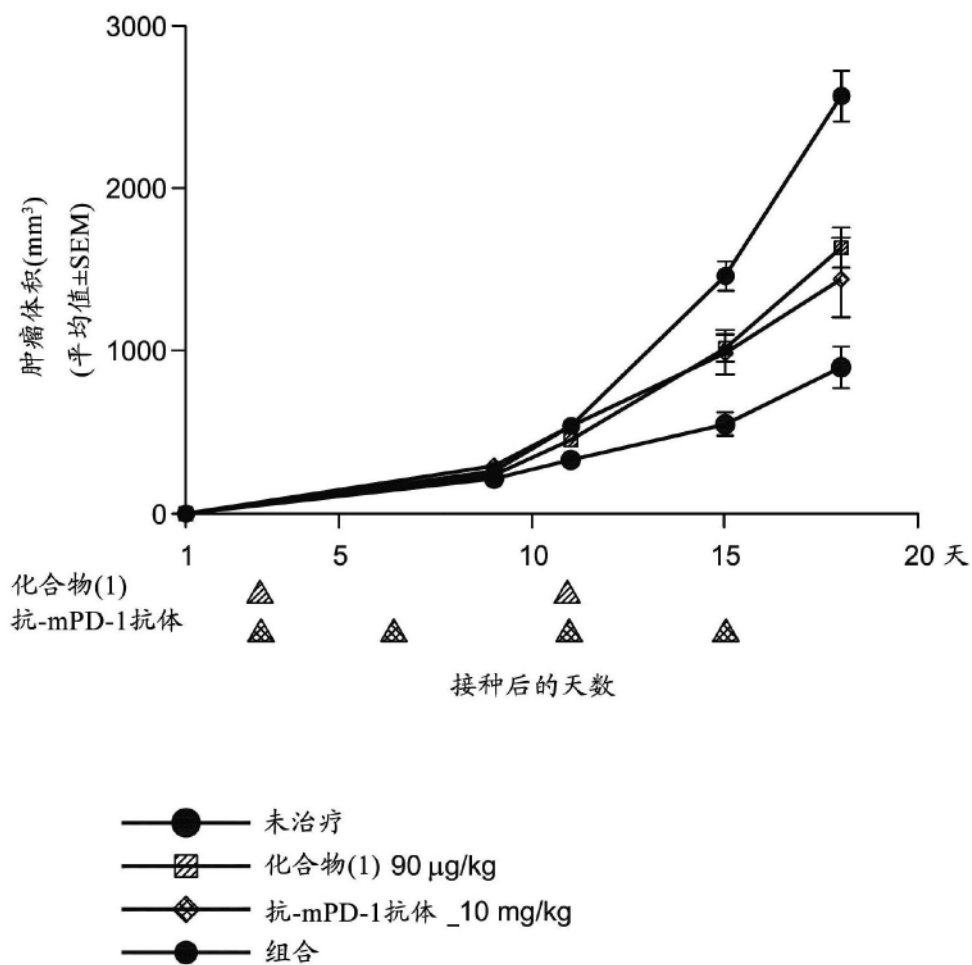


图9

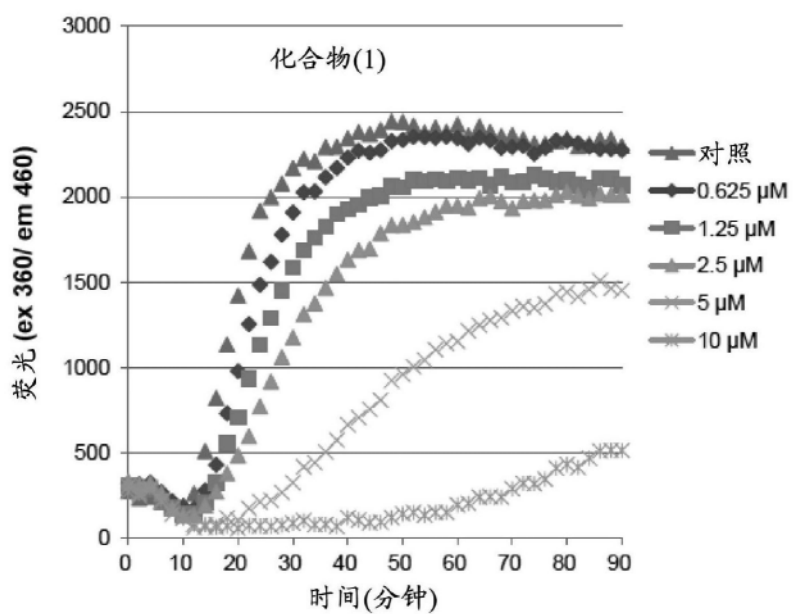


图10A



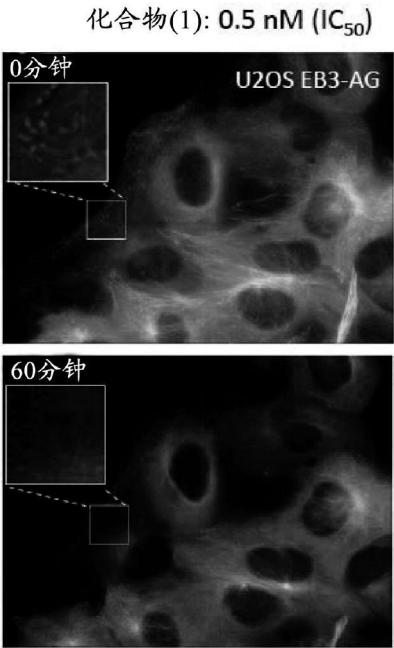


图10B

化合物	体外细胞生长抑制IC <sub>50</sub> (nM)					P-gp 易感性
	食管癌			子宫肉瘤		
	OE21	OE33	TE-8	MES-SA	MES-SA/Dx5-Rx1	
化合物 (1)	0.061	0.29	0.095	0.070	8.7	123

图11

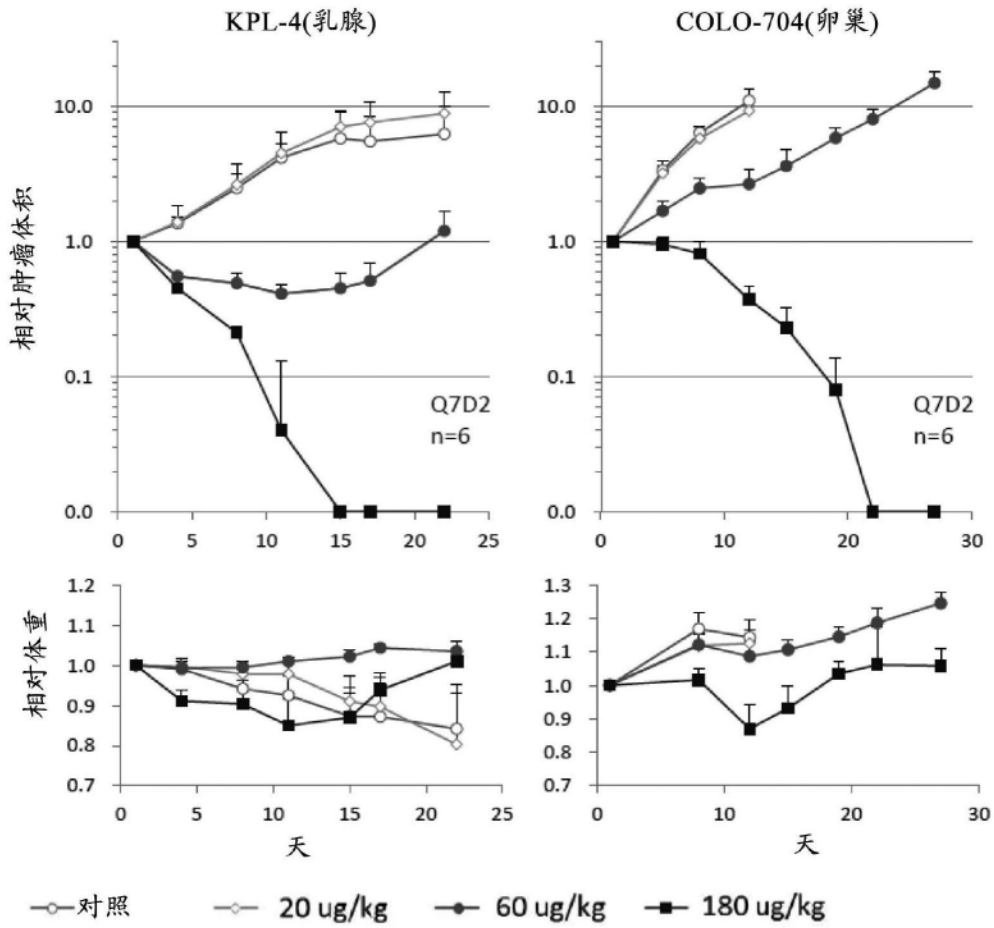


图12

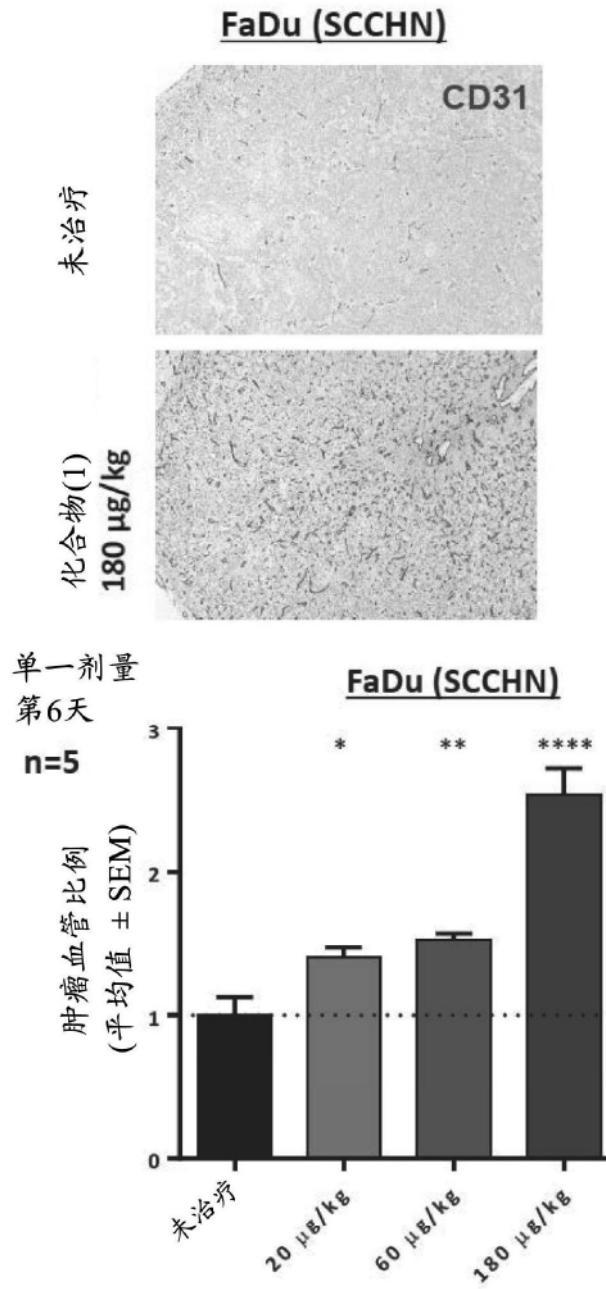


图13

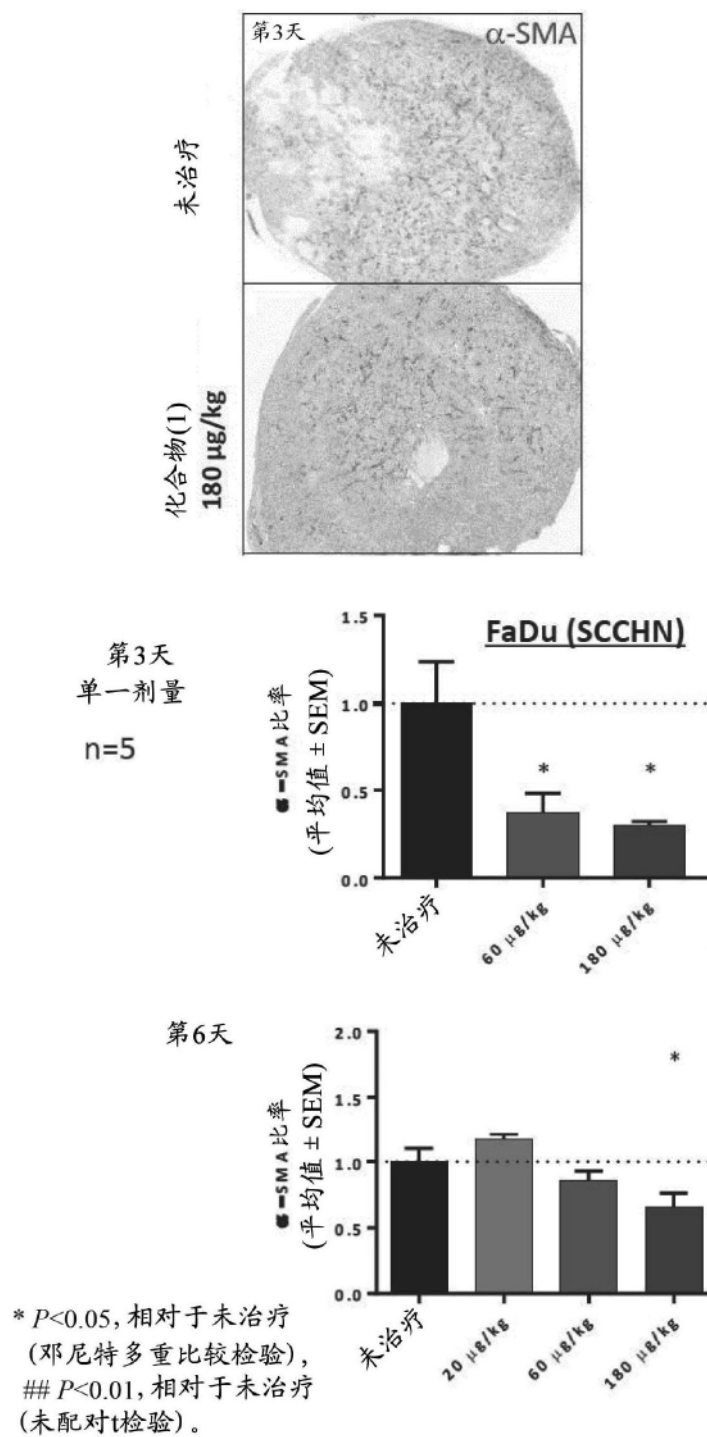


图14

**FaDu  
(SCCHN)**

单一剂量

第6天

腱糖蛋白-C

EDA-纤维蛋白

对照

180  $\mu\text{g/kg}$ 的化合物(1)+西妥昔单抗

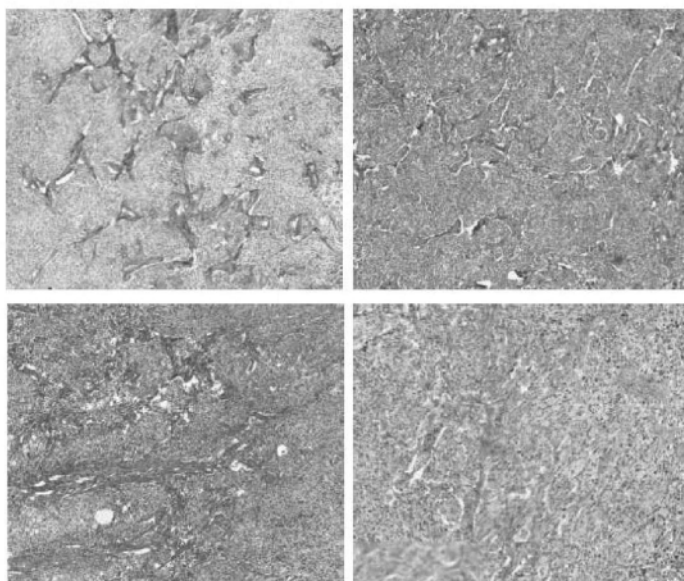


图15

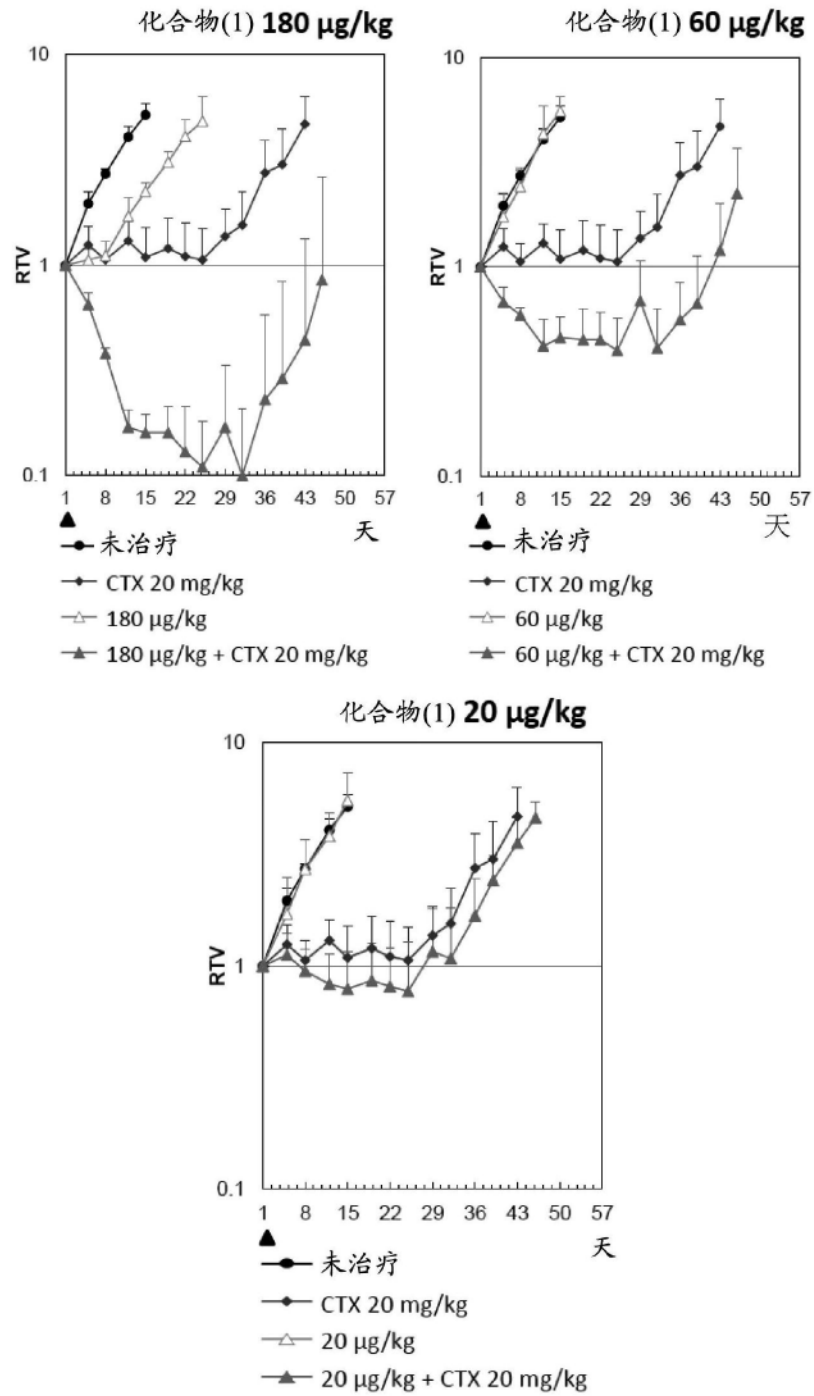


图16

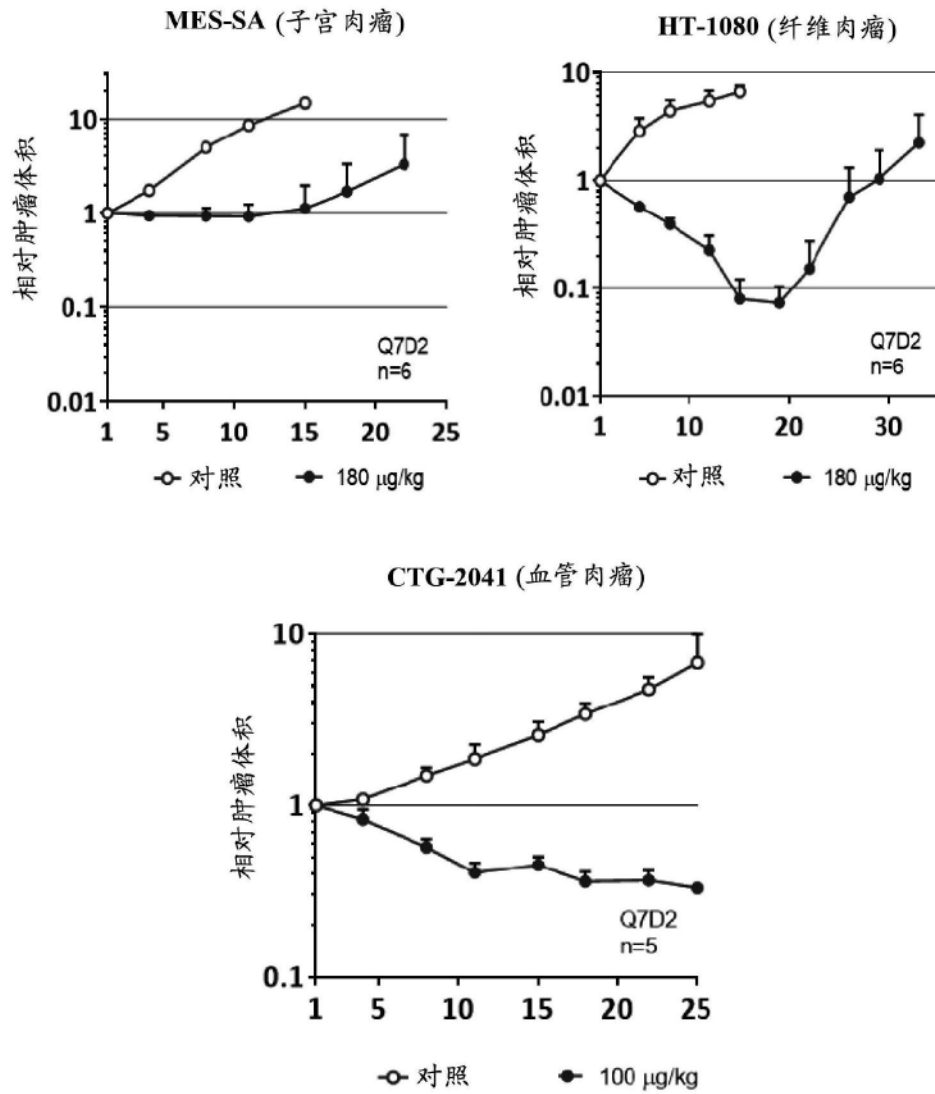


图17

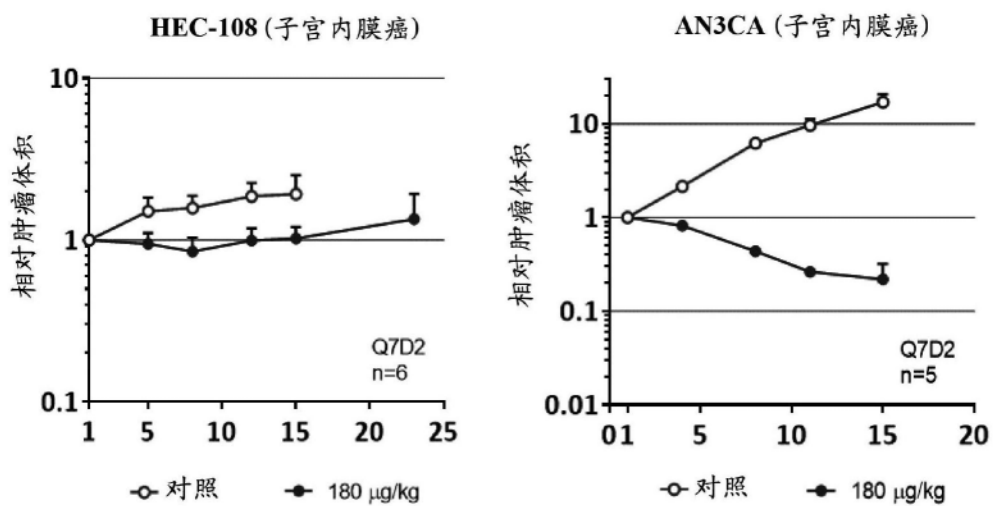


图18