



MD/EP 3606928 T2 2022.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3606928 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 493/22 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61K 31/357 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

| | |
|--|--|
| <p>(21) Numărul de depozit: e 2020 0167</p> <p>(22) Data de depozit: 2018.04.03</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18719390.9, 2018.04.03</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3606928, 2020.02.12</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201762482030 P; 201762526677 P; 201715814105; 201762586416 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.04.05; 2017.06.29; 2017.11.15; 2017.11.15</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US</p> | <p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2022, 2022.12.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 36/2022, 2022.09.07</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2020, 2020.03.31</p> |
| <p>(71) Solicitanți: PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, US; EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., JP</p> <p>(72) Inventatori: KISHI Yoshito, US; KIRA Kazunobu, JP; ITO Ken, JP</p> <p>(73) Titular: PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, US; EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., JP</p> <p>(74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela</p> | |

(54) Compus macroclic și utilizări ale acestuia

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție furnizează un nou Compus (1) având efect de remodelare vasculară tumorală și/sau activitate anti-CAF (Fibroblaste Asociate Cancerului), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, opțional într-un purtător acceptabil farmaceutic, și utilizări medicale ale acestuia.

Revendicări: 15

Figuri: 18

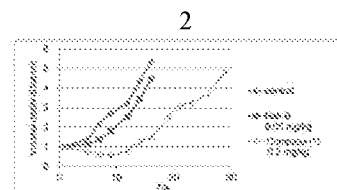
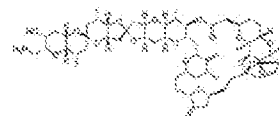


Figure 1



Compound 1

MD/EP 3606928 T2 2022.12.31

(54) Macrocyclic compound and uses thereof**(57) Abstract:**

1
The present invention provides novel Compound (1) having tumor vascular remodeling effect and/or anti-CAF (Cancer Associated Fibroblasts) activity, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, optionally in a pharmaceutically acceptable

2
and medical uses thereof. Compound (1)
Claims: 15
Fig.: 18

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

5 Prezentă invenție furnizează un nou compus macrociclic care are efecte de remodelare vasculară tumorală și activitate anti-CAF (Fibroblaste asociate cu cancerul). Compusul poate fi utilizat pentru tratarea cancerului sau pentru inhibarea creșterii tumorii la un subiect.

CONTEXT

10 Halicondrinele, cum ar fi Halicondrina B, sunt agenți împotriva cancerului izolați inițial din burete de mare *Halicondria okadai* (Vezi, *de ex.*, D. Uemura și colab. "Norhalicondrina A: O macrolidă polieterică antitumorală din burete de mare" J. Am. Chim. Soc., 107, 4796 (1985)), și a fost găsit ulterior în *Axinella* sp., *Phakellia carteri* și *Lissondendryx* sp. O sinteză totală a Halicondrinei B a fost publicată în 1992 (vezi, *de ex.*, Y. Kishi și colab. "Sinteza totală a Halicondrinei B și a Norhalicondrinei B" J. Am. Chim. Soc., 114, 3162 (1992)). Halicondrina B a demonstrat *in vitro* inhibarea polimerizării tubulinei, a asamblării microtubulilor, a reticulării beta 5-tubulinei, a legării GTP și vinblastinei la tubulină, și hidroliza GTP dependentă de tubulină, și a demonstrat *in vitro* și *in vivo* proprietăți împotriva cancerului (vezi, *de ex.*, Y. Hirata și colab. "Macrolide polieterice antitumorale din burete de mare" Pure Appl. Chem., 58, 701 (1986); Fodstad și colab. "Activitățile antitumorale comparative

15 ale halicondrinelor și vinblastinei împotriva xenogrefelor de tumoare umană" J. Experimental Therapeutics & Oncology 1996; 1: 119, 125).

Mesilat de eribulină (Halaven™), care a fost dezvoltat pe baza Halicondrinei B (vezi, *de ex.*, Publicația Internațională Nr. WO 1999/065894, publicată în 23 decembrie 1999; Publicația Internațională nr. WO 2005/118565, publicată în 15 decembrie 2005; și W. Zheng și colab. "Analogi macrociclici de cetone ai Halicondrinei B" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, 5551-5554 (2004)) este în prezent utilizat clinic în multe țări, *de ex.*, pentru tratamentul cancerului mamar metastatic și pentru liposarcom avansat.

Publicații suplimentare de brevet care descriu halicondrine includ Brevetul U.S. Nr. 5.436.238 al lui Kishi, și colab., acordat în 25 iulie 1995; Brevetul U.S. Nr. 5.338.865 al lui Kishi, și colab., acordat în 16 august 1994; și WO 2016/003975 înregistrat de Kishi, și colab., toate aparținând președintelui și colegilor colegiului Harvard.

Vezi, de asemenea, *de ex.*, Brevetul U.S. Nr. 5.786.492; Brevetul U.S. Nr. 8.598.373; Brevetul U.S. Nr. 9.206.194; Brevetul U.S. Nr. 9.469.651; WO/2009/124237A1; WO/1993/017690A1; WO/2012/147900A1; Brevetul U.S. Nr. 7.982.060; Brevetul U.S. Nr. 8.618.313; Brevetul U.S. Nr. 9.303.050; Brevetul U.S. Nr. 8.093.410; Brevetul U.S. Nr. 8.350.067; Brevetul U.S. Nr. 8.975.422; Brevetul U.S. Nr. 8.987.479; Brevetul U.S. Nr. 8.203.010; Brevetul U.S. Nr. 8.445.701; Brevetul U.S. Nr. 8.884.031; Brevetul U.S. Nr. RE45.324; Brevetul U.S. Nr. 8.927.597; Brevetul U.S. Nr. 9.382.262; Brevetul U.S. Nr. 9.303.039; WO/2009/046308A1; WO/2006/076100A3; WO/2006/076100A2; WO/2015/085193A1; WO/2016/176560A1; Brevetul U.S. Nr. 9.278.979; Brevetul U.S. Nr. 9.029.573; WO/2011/094339A1; WO/2016/179607A1; WO/2009/064029A1; WO/2013/142999A1; WO/2015/066729A1; WO/2016/038624A1; și WO/2015/000070A1.

Fibroblastele asociate cancerului (CAF), care se găsesc pe scară largă într-o varietate de tumori solide, sunt celule stromale. Este bine cunoscut faptul că CAF joacă un rol important în angieneză, invazie și metastază. Se raportează că există o strânsă corelare între cantitățile de CAF și prognosticul clinic, de exemplu, în cancerul mamar invaziv (vezi, *de ex.*, M. Yamashita și colab. "Rolul miofibroblastelor stromale în cancerul mamar invaziv: expresia stromală a actinei alfa a mușchilor netezi este corelată cu un rezultat clinic mai rău" Cancer mamar 19, 170, 2012) și în adenocarcinom esofagian (vezi, *de ex.*, T. J. Underwood și colab. "Fibroblastele asociate cu cancerul prezic un rezultat nesatisfăcător și promovează invazia dependentă de periostină în adenocarcinomul esofagian" Journal of Pathol., 235, 466, 2015). De asemenea, a fost raportat că CAF este corelat cu rezistența într-o varietate de tumori, cum ar fi, de exemplu, cancerul mamar (vezi, *de ex.*, P. Farmer și colab. "O semnătură genetică legată de stromă prezice rezistența la chimioterapia neoadjuvantă în cancerul mamar" Nature Medicine, 15(1), 68, 2009), și cancerul de cap și gât (vezi, *de ex.*, S. Schmitz și colab. "Cetuximab promovează tranziția epitelială la mezenchimală și fibroblastele asociate cu cancerul la pacienții cu cancer de cap și gât" Oncotarget, 6 (33), 34288, 2015; Y. Matsuoka și colab. "Caracteristicile stromale tumorale sunt asociate cu rezistența la chimioradioterapie pe bază de 5-FU, și cu un prognostic nesatisfăcător la pacienții cu carcinom bucal cu celule scuamoase" APMIS 123(3), 205, 2015).

Astfel, s-a observat că efectele de remodelare vasculară tumorală și activitatea anti-CAF au ca rezultat îmbunătățirea micromediului cancerului, care ajută la tratamentul tumorii. Vasele de sânge sunt esențiale pentru creșterea tumorilor. Vasele de sânge reconstruite în tumori pot furniza agenți împotriva cancerului în tumori, în plus față de ameliorarea hipoxiei. Este raportat că remodelarea indusă de eribulină a vasculaturii tumorale anormale conduce la un micromediu mai funcțional care poate reduce agresivitatea tumorilor datorită eliminării hipoxiei tumorale interne. Deoarece micromediile tumorale anormale sporesc, atât rezistența la medicamente, cât și metastazele, capacitatea aparentă a eribulinei de a inversa aceste caracteristici agresive poate contribui la beneficiile sale clinice (vezi, *de ex.*, Y. Funahashi și colab. "Mesilatul de eribulină reduce anomalia micromediului tumoral prin remodelare vasculară în modelele preclinice de cancer mamar uman" *Cancer Sci.* 105 (2014), 1334-1342). Medicamentele împotriva cancerului cu efecte de remodelare vasculară tumorală și a activității anti-CAF nu au fost raportate până în prezent. Francis G. Fang și colab., "Synthetic Studies Towards Halicondrins: Synthesis of the Left Halves of Norhalicondrins and Homohalichondrins", *Tetrahedron Letters*, 33(12), 1557-1560, 1992 dezvoltă halicondrine, norhalicondrine și homohalicondrine A, B și C. Hickford S J H și colab., "Antitumour polyether macrolides: Four new halichondrins from the New Zealand deep-water marine sponge *Lissodendoryx sp*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6), 2199-2203, 2009 dezvoltă halicondrină B, izohomohalicondrină B și analogi ai acestora.

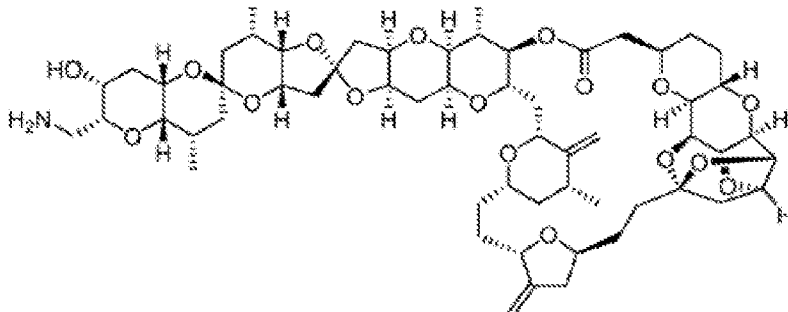
În ciuda progreselor înregistrate, compuși suplimentari sunt necesari pentru progresul cercetării și pentru îngrijirea medicală a tumorilor și cancerului. Orice referire în descriere la metode de tratament se referă la compușii, compoziții farmaceutice sau medicamente din prezenta invenție pentru utilizare într-o metodă de tratament a corpului uman sau animal prin terapie.

EXPUNEREA PE SCURT A INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un compus macrociclic (de exemplu, Compusul (1)) care are efecte de remodelare vasculară tumorală și a activității anti-CAF, și la săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia, și la compoziții farmaceutice ale acestuia.

Invenția include, de asemenea, metode de utilizare a compusului (1) pentru tratarea cancerului, metode de inhibare a în mod reversibil sau ireversibil a mitozei într-o celulă, și metode de inhibare a creșterii tumorii *in vitro*, *in vivo*, sau într-un subiect. Sunt dezvoltate kituri care cuprind Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, sau o compoziție farmaceutică a acestuia.

Într-un aspect, invenția prezintă un compus care este compusul (1):



Compusul (1),

și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestuia.

Într-un aspect, invenția furnizează compoziții farmaceutice care cuprind Compusul (1) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde unu sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde, în plus, unu sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari în combinație, în alternanță sau alt tip de terapie sincronizată, pentru a atinge scopul dorit al tratamentului.

Invenția prezintă, de asemenea, metode de obținere a Compusului (1) sau a intermediarilor săi. Intermediarii sintetici sunt furnizați, aici de asemenea, ca parte a invenției.

S-a descoperit că Compusul (1) are un efect avantajos asupra remodelării vasculare tumorale și are activitate anti-CAF, așa cum este demonstrat în Figuri și Exemple. În consecință, compusul (1) are o utilizare posibilă în tratamentul cancerului (de ex., carcinom cu celule scuamoase la cap și gât (SCCHN), cancer mamar, cancer esofagian, cancer uterin, cancer ovarian, cancer colorectal, cancer endometrial, cancer gastric, cancer de intestin subțire, cancer de vezică urinară, sarcoame, cancere rare).

Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează metode de inhibare a oricărei creșteri tumorale sau cancer care va răspunde la un compus cu efecte de remodelare vasculară tumorală și/sau activitate

anti-CAF, la un subiect, de obicei un om, cu compusul (1) sau cu o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Compusul (1) sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție a acestuia, poate fi administrat în combinație cu orice alt agent activ care furnizează rezultate benefice pentru pacient. În anumite variante de realizare, Compusul (1) este utilizat în combinație cu un anticorp (*de ex.*, un anticorp monoclonal). Într-o variantă de realizare, Compusul (1) este utilizat în combinație, în alternanță sau altă terapie sincronizată cu o imunoterapie, cum ar fi un anticorp anti-EGFR (receptor al factorului de creștere epidermică), un anticorp anti-HER2 (receptor al factorului uman de creștere epidermică), un anticorp anti-PD-1 sau un anticorp anti-PD-L1, așa cum este descris mai detaliat mai jos.

De exemplu, este furnizată o metodă de tratare a carcinomului cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN) la un subiect, de obicei un om, care are nevoie de aceasta, care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente de compus (1) sau de o sare acceptabilă farmaceutic sau de o compoziție a acestuia, în combinație cu o terapie cu anticorp monoclonal (mAb) anti-EGFR (receptor al factorului de creștere epidermică). În anumite variante de realizare, mAb anti-EGFR (receptorul factorului de creștere epidermică) este cetuximab.

Ca un alt exemplu, o metodă de tratare a cancerului mamar la un subiect, de obicei, un om, care are nevoie de aceasta, care cuprinde administrarea la subiect menționat a unei cantități eficiente de compus (1) sau de o sare acceptabilă farmaceutic sau de o compoziție a acestuia, în combinație cu o terapie cu mAb de HER2 (receptorul factorului uman de creștere epidermică). În anumite variante de realizare, mAb de HER2 (receptorul factorului uman de creștere epidermică) este trastuzumab. În alte variante de realizare, Compusul (1) poate fi utilizat pentru tratarea cancerului mamar în combinație cu chimioterapia tradițională, cum ar fi adriamicină, ciclofosamidă, taxol, *etc.*, sau cu un anti-estrogen, cum ar fi un modulator selectiv de estrogen (SERM), un degradator selectiv de estrogen (SERD), un inhibitor parțial sau total de estrogen (cum ar fi fulvestrant), sau un inhibitor CDK 4/6, cum ar fi palbociclib (Pfizer).

Este dezvăluit Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, care poate fi sub formă de hidrat, solvat, polimorf, sau o compoziție a acestuia, într-un kit, care poate fi un pachet de formă de dozare. Kiturile descrise aici pot include o singură doză sau mai multe doze de compus sau de compoziție farmaceutică a acestuia. Un kit conform invenției poate include instrucțiuni pentru utilizarea formelor de dozare terapeutice furnizate (de ex., instrucțiuni pentru utilizarea compusului sau a compoziției farmaceutice incluse în kit).

Prezenta invenție descrie astfel cel puțin următoarele caracteristici:

(i) Compus (1) sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf;

(ii) O metodă de tratament care include administrarea unei cantități eficiente la un subiect, cum ar fi un om, de compus (1) sau de sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, pentru tratarea cancerului de cap și gât (*de ex.*, carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN), carcinom adenoid chistic), cancer mamar (de ex., cancer mamar HER2-negativ, cancer mamar triplu negativ), cancer esofagian (de ex., adenocarcinom esofagian), cancer uterin (*de ex.*, sarcom uterin), cancer ovarian, cancer colorectal, sarcom (*de ex.*, sarcom sinovial, angiosarcom, sarcom de țesut moale, fibrosarcom, sarcom uterin), cancer de vezică urinară (de ex., cancer urotelial), cancer gastric, cancer de intestin subțire (de ex., adenocarcinom de intestin subțire), cancer endometrial sau un cancer rar;

(iii) O metodă de tratament care include administrarea unei cantități eficiente la un subiect, cum ar fi un om, de compus (1) sau de sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, pentru utilizare pentru tratarea unei tulburări medicale, cum ar fi un cancer sau o tumoare care răspunde la efectele de remodelare vasculară și/sau la activitatea anti-CAF;

(iv) Compus (1) sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, pentru utilizare pentru tratarea carcinomului cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN), a cancerului mamar, a cancerului esofagian, a cancerului uterin, a cancerului ovarian, a cancerului colorectal, a sarcomului, a cancerului de vezică urinară, a cancerului gastric, a cancerului de intestin subțire, a cancerului endometrial sau a unui cancer rar;

(v) Compus (1) sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, pentru utilizare pentru tratarea unei tulburări medicale, cum ar fi un cancer sau o tumoare care răspunde la efectele de remodelare vasculară și/sau la activitatea anti-CAF;

(vi) Un procedeu de fabricare a unui medicament destinat utilizării terapeutice pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor, cum ar fi un cancer sau o tumoare care răspunde la efectele de remodelare vasculară și/sau la activitatea anti-CAF, caracterizat prin aceea că compusul (1) sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf descris mai sus, sau o variantă de realizare a compusului activ, este utilă pentru fabricare;

- (ix) O compoziție acceptabilă farmaceutic a Compusului (1), sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, într-un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic;
- 5 (x) O formă de dozare acceptabilă farmaceutic a Compusului (1) sau a sării acceptabile farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, opțional, într-un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic;
- (xi) Compus (1) sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru tratarea unei tulburări descrise aici, care acționează printr-un mecanism altul decât acțiunea efectelor de remodelare vasculară și/sau activitatea anti-CAF; și
- 10 (xii) Metode pentru fabricarea compuşilor descriși aici, și a intermediarilor de sinteză.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Desenele însoțitoare, care sunt încorporate și constituie o parte a acestei specificații, ilustrează câteva variante de realizare a invenției și, împreună cu descrierea, furnizează exemple nelimitative ale invenției.

15 *Figura 1* arată efectele antitumorale ale Compusului (1) în monoterapie în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată (cancer de cap și gât) la șoareci, așa cum este descris în Exemplul 4 de Testare Farmacologică.

20 *Figura 2* arată activitatea antitumorală a Compusului (1) în monoterapie împotriva modelului de xenogrefă OSC-19 subcutanată (cancer de cap și gât) la șoareci, așa cum este descris în Exemplul 5 de Testare Farmacologică.

Figura 3 arată activitatea antitumorală a Compusului (1) în monoterapie împotriva modelului de xenogrefă HCC-1806 subcutanată (cancer mamar) la șoareci, așa cum este descris în Exemplul de Testare Farmacologică 6.

25 *Figura 4* arată efectele antitumorale ale Compusului (1) în combinație cu cetuximab în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată la șoareci, așa cum este descris în Exemplul 7 de Testare Farmacologică.

Figura 5 arată activitatea antitumorală a Compusului (1) în combinație cu trastuzumab în modelul de xenogrefă KPL-4 subcutanată (cancer mamar) la șoareci, așa cum este descris în Exemplul 8 de Testare Farmacologică.

30 *Figura 6A-6B* arată efectul anti-tumoral al compusului (1) în modelul de șoarece cu transplant ortotopic HSC-2. *Figura 6A*. Șoareci nuzi au fost implantați cu HSC-2 transdus cu luciferază (1×10^6 celule/pată) în limbă. Cantitatea de HSC-2 transdusă cu luciferază a fost analizată utilizând Sistemul de imagistică In Vivo (IVIS). Datele arată nivelurile de bioluminescență în limbă la fiecare șoarece. *Figura 6B*. Imagine reprezentativă de bioluminescență pentru 16 șoareci. CDDP, CTX, CDDP+CTX au fost utilizate ca comparatori, care sunt utilizate în prezent în tratamentul pacientului cu cancer SCCHN. CDDP= cisplatină, CTX= cetuximab.

35 *Figura 7A-7B* arată avantajul de supraviețuire al compusului (1) în combinație cu cetuximab în modelul de șoarece cu transplant ortotopic HSC-2. *Figura 7A*. Șoareci nuzi au fost implantați cu HSC-2 transdus cu luciferază (1×10^6 celule/pată) în limbă. Datele arată curba de supraviețuire până în ziua 100 după tratamentul cu medicamente (n=16). * $P < 0,0001$ față de compusul (1) sau CTX în monoterapie (testul Log-rank (Mantel-Cox)). *Figura 7B*. Cantitatea de HSC-2 transdusă cu luciferază a fost analizată utilizând Sistemul de imagistică In Vivo (IVIS). Imagini de bioluminescență pentru 10 șoareci care au supraviețuit din grupul cu combinație Compus (1) + CTX în ziua 100. RBW = greutate corporală relativă. CDDP= cisplatină, CTX= cetuximab.

45 *Figura 8A-8B* arată efectul anti-tumoral al compusului (1) în combinație cu terapia cu radiații în modelul de xenogrefă FaDu la șoarece. *Figura 8A*. Șoareci nuzi au fost implantați subcutanat cu FaDu transdus cu luciferază (5×10^6 celule/pată) în coapsele drepte. La treisprezece zile după inoculare, șoarecii au fost repartizați aleatoriu (n=6) și injectați intravenos cu Compusul (1) la 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ în Ziua 1 și în Ziua 8, cu sau fără RT de 18 Gy în Ziua 4 și Ziua 11. Cantitatea de FaDu transdus cu luciferază a fost analizată utilizând Sistemul de imagistică In Vivo (IVIS). Datele arată nivelul mediu de bioluminescență relativă în Ziua 1 și SEM (n=6). SEM= eroarea standard a mediei. * $P < 0,05$ față de netratat în ziua 29 (test t nepereche). *Figura 8B*. Imagini reprezentative de bioluminescență pentru 6 șoareci din fiecare grup în ziua 29. RT = radioterapie.

50 *Figura 9* arată activități anti-tumorale ale Compusului (1) în combinație cu anticorp anti-mPD-1. Modelul de șoarece identic genetic CT26 s.c. (carcinom de colon) a fost tratat cu compus (1) și anticorp anti-mPD-1 în programul Q7D și, respectiv, de două ori pe săptămână, timp de 3 săptămâni. Rezultatele arată mediile \pm SEM ale volumelor tumorii (mm^3) (n=8).

60 *Figura 10A* arată un test de polimerizare a tubulinei fără celule. Compusul (1) are activitate inhibitoare asupra polimerizării tubulinei. *Figura 10B* prezintă un test de dinamică a microtubulilor. Compusul (1) are, de asemenea, activitate inhibitoare asupra dinamicii microtubulilor.

Figura 11 arată că Compusul (1) este un agent antiproliferativ puternic în liniile celulare de cancer esofagian (OE21, OE33 și TE-8) și de cancer uterin (MES-SA, MES-SA/Dx5-Rx1).

Figura 12 arată că Compusul (1) în monoterapie are activitate antitumorală puternică în modelele de xenogrefă subcutanată de cancer mamar și ovarian (KPL-4 și, respectiv, COLO-704).

5 *Figura 13* arată efectul compusului (1) asupra micromediilor tumorale. Așa cum este arătat, compusul (1) crește densitatea microvaselor. * P < 0,05, ** P < 0,01, **** P < 0,0001 față de lipsa tratării (testul de comparație multiplă Dunnett).

Figura 14 arată efectul compusului (1) asupra micromediilor tumorale. Așa cum este arătat, compusul (1) reduce CAF-urile în α -SMA pozitiv.

10 *Figura 15* arată că Compusul (1) scade proteinele ECM din CAF în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată. Tumorile de xenogrefe FaDu au fost colectate în ziua 6 după administrarea compusului (1) 180 μ g/kg singur + cetuximab în ziua 1.

Figura 16 arată că Compusul (1) prezintă un efect combinat dependent de doză cu cetuximab într-un model de xenogrefă FaDu subcutanată. Doză unică, n = 6. Compusul (1) și cetuximab (CTX) au fost administrate în ziua 1 în modelul de xenogrefă FaDu.

15 *Figura 17* arată efecte antitumorale ale monoterapiei în modele de xenogrefă de sarcom de țesut moale la șoareci. Sunt prezentate MES-SA (sarcom uterin uman), HT-1080 (fibrosarcom uman) și CTG-2041 (angiosarcom uman).

20 *Figura 18* arată efecte antitumorale ale monoterapiei în modelele de xenogrefă de cancer endometrial la șoareci. Sunt prezentate HEC-108 și AN3CA (cancer endometrial).

DEFINIȚII

Așa cum este utilizat aici, termenul "sare" se referă la oricare și la toate sărurile și cuprinde sărurile acceptabile farmaceutic. Termenul "sare acceptabilă farmaceutic" se referă la acele săruri care, în
25 limitele raționamentului medical corect, sunt adecvate pentru utilizare în contact cu țesuturile oamenilor și animalelor inferioare, fără toxicitate, iritare, răspuns alergic și altele asemenea, și sunt proporționale cu un raport rezonabil beneficiu/risc. Sărurile acceptabile farmaceutic sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, Berge și colab. descriu în detaliu sărurile acceptabile farmaceutic în J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, încorporat aici prin referire. Sărurile acceptabile farmaceutic ale compușilor din această
30 invenție le includ pe cele derivate din acizi și baze anorganice și organice adecvate. Exemple de săruri de adiție acidă netoxice acceptabile farmaceutic sunt sărurile unei grupări amino formate cu acizi anorganici, cum ar fi acid clorhidric, acid bromhidric, acid fosforic, acid sulfuric și acid percloric, sau cu acizi organici, cum ar fi acid acetic, acid oxalic, acid maleic, acid tartric, acid citric, acid succinic sau acid malonic, sau prin utilizarea altor metode cunoscute în domeniu, cum ar fi schimbul de ioni. Alte săruri
35 acceptabile farmaceutic includ săruri adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butirat, camforat, camforsulfonat, citrat, ciclopentanpropionat, digluconat, dodecilsulfat, etansulfonat, formiat, fumarat, glucoheptonat, glicerofosfat, gluconat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, hidriodură, 2-hidroxi-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauril sulfat, malat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naftalensulfonat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3
40 fenilpropionat, fosfat, picrat, pivalat, propionat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tiocianat, p-toluensulfonat, undecanoat, valerat, și altele asemenea. Sărurile derivate din baze adecvate includ săruri de metale alcaline, metale alcalino-pământoase, amoniu și $N^+(C_{1-4} \text{ alchil})_4^+$. Sărurile reprezentative ale metalelor alcaline sau alcalino-pământoase includ sodiu, litiu, potasiu, calciu, magneziu și altele asemenea. Alte săruri acceptabile farmaceutic includ, atunci când este cazul, cationi netoxici de amoniu, amoniu
45 cuaternar și amină formați folosind contraioni, cum ar fi halogenură, hidroxid, carboxilat, sulfat, fosfat, azotat, sulfonat de alchil inferior și sulfonat de aril. Compusul (1) este furnizat, de asemenea, și poate fi administrat sub forma unei baze libere.

De asemenea, trebuie înțeles că compușii care au aceeași formulă moleculară, dar diferă în natura sau secvența legăturii atomilor lor sau în aranjarea atomilor lor în spațiu sunt denumiți "izomeri". Izomerii care diferă în aranjarea atomilor lor în spațiu sunt denumiți "stereoizomeri".

Termenii "compoziție" și "formulare" sunt utilizați interschimbabil.

Un "subiect" la care se are în vedere administrarea se referă la un om (*adică*, bărbat sau femeie din orice grupă de vârstă, *de ex.*, subiect pediatric (*de ex.*, sugar, copil sau adolescent) sau subiect adult (de *ex.*, adult tânăr, adult de vârstă mijlocie sau adult în vârstă)) sau animal non-uman. În anumite variante de realizare, animalul non-uman este un mamifer (*de ex.*, primat (*de ex.*, maimuță cynomolgus sau maimuță rhesus), mamifer relevant din punct de vedere comercial (de *ex.*, vită, porc, cal, oaie, capră, pisică sau câine) sau pasăre (de *ex.*, pasăre relevantă comercial, cum ar fi pui, rață, găscă sau curcan)). În anumite variante de realizare, animalul non-uman este un pește, reptilă sau amfibian. Animalul non-uman poate fi un mascul sau o femelă în orice stadiu de dezvoltare. Animalul non-uman poate fi un animal transgenic sau un animal modificat genetic. Termenul "pacient" se referă la un subiect uman care are
60 nevoie de tratament pentru o boală.

Termenul "a administra", "administrare" sau "administrare" se referă la implantarea, absorbția, ingerarea, injectarea, inhalarea sau introducerea în alt mod a unui compus descris aici, sau a unei compoziții a acestuia, într-un sau la un subiect.

Termenii "tratament", "tratează" și "tratare" se referă la inversarea, atenuarea, întârzierea debutului sau inhibarea progresului unei boli descrise aici. În unele variante de realizare, tratamentul poate fi administrat după ce unu sau mai multe semne sau simptome ale bolii s-au dezvoltat sau au fost observate. În alte variante de realizare, tratamentul poate fi administrat în absența semnelor sau simptomelor bolii. De exemplu, tratamentul poate fi administrat înainte de apariția simptomelor la un subiect susceptibil. De asemenea, tratamentul poate fi continuat după ce simptomele s-au rezolvat, de exemplu, pentru a întârzia sau a preveni recidiva.

O "cantitate eficientă" de un compus descris aici se referă la o cantitate suficientă pentru a provoca răspunsul biologic dorit. O cantitate eficientă de un compus descris aici poate varia în funcție de factori, cum ar fi obiectivul biologic dorit, farmacocinetica compusului, afecțiunea care este tratată, modul de administrare și vârsta și starea de sănătate a subiectului. În anumite variante de realizare, o cantitate eficientă este o cantitate eficientă terapeutică. În mod alternativ, într-o metodă sau utilizare separată, invenția poate fi utilizată, acolo unde este indicat și eficient, ca tratament profilactic. În anumite variante de realizare, o cantitate eficientă este cantitatea de un compus descris aici într-o singură doză. În anumite variante de realizare, o cantitate eficientă este cantitățile combinate ale unui compus descris aici în mai multe doze.

O "cantitate eficientă terapeutică" de un compus descris aici este o cantitate suficientă pentru a furniza un beneficiu terapeutic în tratamentul unei afecțiuni sau pentru a întârzia sau reduce la minimum unu sau mai multe simptome asociate cu afecțiunea. O cantitate eficientă terapeutică de un compus înseamnă o cantitate de agent terapeutic, singur sau în combinație cu alte terapii, care furnizează un beneficiu terapeutic în tratamentul afecțiunii. Termenul "cantitate eficientă terapeutică" poate cuprinde o cantitate care îmbunătățește terapia generală, reduce sau evită simptomele, semnele sau cauzele afecțiunii și/sau sporește eficacitatea terapeutică a unui alt agent terapeutic. În anumite variante de realizare, o cantitate eficientă terapeutică este o cantitate suficientă pentru tratarea oricărei boli sau afecțiuni descrise.

Așa cum este utilizat aici, "inhibarea", "de inhibare", "inhibă" și "inhibitor" și altele asemenea, se referă la capacitatea unui compus de a reduce, încetini, opri sau preveni activitatea unui proces biologic (de ex., creșterea tumorii). În anumite variante de realizare, inhibarea este de aproximativ 45% până la 50%. În anumite variante de realizare, inhibarea este de aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99,9% sau 100%.

Termenii "neoplasm" și "tumoare" sunt utilizați aici în mod interschimbabil și se referă la o masă anormală de țesut în care creșterea masei depășește și nu este coordonată cu creșterea unui țesut normal. Un neoplasm sau o tumoare poate fi "benignă" sau "malignă", în funcție de următoarele caracteristici: gradul de diferențiere celulară (incluzând morfologia și funcționalitatea), viteza de creștere, invazia locală și metastaza. Un "neoplasm benign" este, în general, bine diferențiat, are o creștere caracteristică mai lentă decât un neoplasm malign și rămâne localizat la situsul de origine. În plus, un neoplasm benign nu are capacitatea de a se infiltra, invade sau metastaza în locuri îndepărtate. În schimb, un "neoplasm malign" este, în general, slab diferențiat (anaplazie) și are o creștere caracteristică rapidă, însoțită de infiltrare progresivă, invazie și distrugere a țesutului înconjurător. Mai mult, un neoplasm malign are, în general, capacitatea de a metastaza în locuri îndepărtate. Termenul "metastază", "metastatic" sau "a metastaza" se referă la răspândirea sau migrarea celulelor canceroase de la o tumoare principală sau inițială la un alt organ sau țesut și este, de obicei, identificabil prin prezența unei "tumori secundare" sau "mase celulare secundare" de tipul de țesut al tumorii principale sau inițiale și nu de tipul celui al organului sau țesutului în care se află tumoarea secundară (metastatică).

Termenul "cancer" se referă la o clasă de boli caracterizate prin dezvoltarea celulelor anormale care proliferază necontrolat și au capacitatea de a se infiltra și de a distruge țesuturile normale ale corpului.

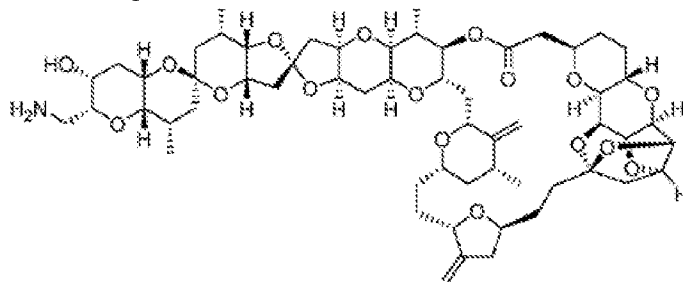
Termenul "cancer rar" se referă la cancerurile care apar la un număr relativ mic de pacienți. Cancerurile rare includ, dar nu se limitează la, sarcoame (de ex., sarcom de țesut moale, liposarcom, sarcom uterin, leiomiiosarcom, mixofibrosarcom, osteosarcom, angiosarcom, sarcom Ewing, sarcom sinovial, rhabdomiiosarcom cancer), limfoame maligne, cancer al timusului (de ex., timoame), mezoteliom, tumori stromale gastrointestinale (GIST-uri), cancer neuroendocrin, cancer de ochi, tumori cerebrale, tumori ale țesuturilor osoase moi, cancer de piele și tumori cu celule germinale.

Termenul "agent împotriva cancerului" se referă la orice agent terapeutic care este util pentru tratarea cancerului la un subiect (de ex., inhibarea cancerului sau a creșterii tumorii la un subiect). Agenții împotriva cancerului includ agenții bioterapeutici împotriva cancerului, precum și agenții chimioterapeutici.

DESCRIERE DETALIATĂ A ANUMITOR VARIANTE DE REALIZARE

Prezenta invenție este descrisă în detaliu mai jos cu referire la variante de realizare și altele asemenea ale prezentei invenții. Invenția furnizează compuși (de ex., Compusul (1)) și săruri acceptabile farmaceutic și compoziții farmaceutice ale acestora. Invenția furnizează, de asemenea, metode de inhibare a creșterii tumorii și/sau de tratare a cancerului la un subiect, care cuprind administrarea la subiect a unei cantități eficiente de un compus sau compoziție furnizată aici. Compusul sau compoziția poate fi administrată în monoterapie sau în combinație cu o altă terapie, așa cum este descris aici. Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează metode de preparare a Compusului (1) și a intermediarilor de sinteză utili în acest scop.

Invenția include un compus cu structura:



Compusul (1).

sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care poate fi opțional sub formă de hidrat, solvat sau polimorf, opțional, într-un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic.

Compusul (1) poate exista sub forma unui cristal polimorf, și compusul din prezenta invenție poate fi în oricare dintre formele de monocristal sau un amestec de două sau mai multe forme de cristal. Compusul (1) poate fi într-o formă amorfă sau poate fi o anhidridă sau un solvat, cum ar fi un hidrat.

Prezenta invenție include săruri acceptabile farmaceutic ale Compusului (1). Un compus marcat izotopic este echivalent cu compusul (1), cu excepția faptului că unu sau mai mulți atomi sunt înlocuiți cu atomi cu o masă atomică sau cu un număr de masă diferit de cei care se găsesc de obicei în natură. Exemple de un izotop care pot fi încorporați în compusul din prezenta invenție includ izotopi de hidrogen, carbon, azot, oxigen, fosfor, fluor, iod, brom și clor, cum ar fi ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{35}S , ^{123}I , și ^{125}I .

Compusul marcat izotopic, cum ar fi un compus în care este încorporat un izotop radioactiv, de exemplu, de ^3H și/sau ^{14}C , este util pentru un test de distribuție tisulară a unui medicament și/sau a unei matrice. Izotopii ^3H și ^{14}C sunt considerați a fi utili deoarece acești izotopi pot fi ușor preparați și detectați. Izotopii ^{11}C și ^{18}F sunt utili în PET (tomografie cu emisie de pozitroni). Izotopul ^{125}I este considerat a fi util în SPECT (tomografie computerizată cu emisie de foton unic) și poate fi util în imagistica creierului. Înlocuirea cu un izotop mai greu, cum ar fi ^2H , determină, datorită stabilității metabolice mai mari, unele avantaje, într-un tratament, de exemplu, prelungirea timpului de înjumătățire *in vivo* sau reducerea unei doze necesare și, prin urmare, este considerată utilă în anumite circumstanțe. Compusul marcat izotopic poate fi preparat în mod similar utilizând un reactiv marcat izotopic ușor disponibil în loc de un reactiv marcat izotopic, și prin efectuarea proceselor descrise în schemele și/sau exemplele descrise mai jos.

Compusul (1) poate fi utilizat ca sondă chimică pentru captarea unei proteine țintă a unui compus cu greutate moleculară mică activ biologic. În mod specific, compusul din prezenta invenție poate fi transformat într-o sondă de cromatografie de afinitate, o sondă de fotoafinitate sau altele asemenea, prin introducerea unei grupări de marcare, a unui linker sau a altora asemenea într-un fragment, altul decât un fragment structural indispensabil expresiei activității compusului printr-o metodă descrisă în J. Mass Spectrum. Soc. Jpn. Vol. 51, nr. 5, 2003, p. 492-498, WO2007/139149, sau altele asemenea.

Exemplele de grupare de marcare, linker sau altele asemenea utilizate într-o astfel de sondă chimică includ grupări aparținând următoarelor grupări (1) până la (5). (1) Grupări de marcare a proteinelor, cum ar fi grupări de marcare cu fotoafinitate (cum ar fi o grupare benzoil, o grupare benzofenonă, o grupare azidă, o grupare carbonil azidă, o grupare diaziridină, o grupare enonă, o grupare diazo și o grupare nitro), și grupări de afinitate chimică (cum ar fi, o grupare cetonă în care un atom de carbon alfa este substituit cu un atom de halogen, o grupare carbamoil, o grupare ester, o grupare alchiltio, un acceptor Michael de cetone α,β -nesaturate, esteri sau altele asemenea, și o grupare oxiran); (2) linkeri scindabili, cum ar fi S-S, O-Si-O, o monozaharidă (cum ar fi o grupare glucoză sau o grupare galactoză) și o dizaharidă (cum ar fi, lactoză) și linkeri oligopeptidici care pot fi scindați printr-o reacție enzimatică; (3) grupări de etichete de îmbinare, cum ar fi biotina și o grupare 3-(4,4-difluor-5,7-dimetil-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indacen-3-il)propionil; (4) grupări de marcare radioactive, cum ar fi ^{125}I , ^{32}P , ^3H

și ¹⁴C; grupări de marcarea cu fluorescență, cum ar fi fluoresceină, rodamină, dansil, umbeliferonă, 7-nitrofurazani și o grupare 3-(4,4-difluor-5,7-dimetil-4H-3a,4a-diaza-4-bora-s-indacen-3-il) propionil; grupări chemiluminiscente, cum ar fi luciferină și luminol; și markeri capabili să detecteze ioni de metale grele, cum ar fi ioni de metale lantanoide și ioni de radiu; și (5) grupări care urmează să fie legate la un purtător în fază solidă, cum ar fi granule din sticlă, un pat de sticlă, o placă de microlitri, granule de agaroză, un pat de agaroză, granule din polistiren, un pat de polistiren, granule din nailon și un pat de nailon.

Poate fi utilizată ca sondă chimică, o sondă preparată prin introducerea în compusul din prezenta invenție a unei grupări de marcarea sau similară selectată dintre grupările (1) până la (5) descrise mai sus, prin metoda descrisă în oricare dintre literaturile menționate anterior sau în altele asemenea, pentru identificarea unei proteine marker utilă pentru cercetarea unei noi ținte posibile pentru medicament.

Exemple de o "sare" utilizate aici includ săruri cu acizi anorganici, săruri cu acizi organici și săruri cu aminoacizi acizi, și în special, sunt preferate săruri acceptabile farmaceutic. Mai mult decât atât, o sare a compusului din prezenta invenție include o anhidridă a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia și un solvat, cum ar fi un hidrat, al sării acceptabile farmaceutic. Exemple preferate de sare cu un acid anorganic includ săruri cu acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid azotic, acid fosforic, și altele asemenea, și exemple preferate de sare cu un acid organic includ săruri cu acid acetic, acid succinic, acid fumaric, acid maleic, acid tartric, acid citric, acid lactic, acid stearic, acid benzoic, acid metansulfonic, acid etansulfonic, acid benzensulfonic, acid p-toluensulfonic, și altele asemenea. Exemple preferate de sare cu un aminoacid acid includ săruri cu acid aspartic și cu acid glutamic, și altele asemenea.

În cazul în care Compusul (1) conform prezentei invenții este obținut sub forma unei sări a Compusului (1) sau a unui hidrat al Compusului (1), sarea și hidratul pot fi transformate într-un corp liber al Compusului (1) printr-o metodă convențională.

Compoziții farmaceutice, kituri și administrare

Prezenta invenție furnizează compoziții farmaceutice care cuprind Compusul (1) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, și un excipient acceptabil farmaceutic. În anumite variante de realizare, compusul descris aici, sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia, este furnizată într-o cantitate eficientă în compoziția farmaceutică (de ex., o cantitate eficientă terapeutic).

Compozițiile farmaceutice descrise aici pot fi preparate prin orice metodă cunoscută în domeniul farmacologiei. În general, astfel de metode de preparare includ aducerea Compusului (1) (*adică*, "ingredientul activ") în asocieră cu un purtător sau excipient și/sau cu unu sau mai multe alte ingrediente accesorii și apoi, dacă este necesar și/sau de dorit, modelarea și/sau ambalarea produsului într-o formă dorită de unitate unică sau multiplă de dozare. O compoziție farmaceutică din invenție poate fi preparată conform metodei cunoscute, cum ar fi o metodă descrisă în regulile generale de preparare din Farmacopeea japoneză, ediția a 16-a, Farmacopeea Statelor Unite, și Farmacopeea Europeană, ediția a IX-a. O compoziție farmaceutică din invenție poate fi administrată pacienților în mod adecvat, în funcție de forma de dozare.

Compozițiile farmaceutice pot fi preparate, ambalate și/sau vândute în vrac, sub forma unei unități unice de doză, și/sau sub forma unei multitudini de unități unice de doză. O "unitate de doză" este o cantitate discretă din compoziția farmaceutică care cuprinde o cantitate predeterminată de ingredient activ. Cantitatea de ingredient activ, în general, este egală cu doza de ingredient activ care ar trebui să fie administrată unui subiect, și/sau o fracțiune convenabilă a unei astfel de doze, cum ar fi jumătate sau o treime dintr-o astfel de doză.

Cantitățile relative de ingredient activ, excipient acceptabil farmaceutic și/sau orice ingrediente suplimentare dintr-o compoziție farmaceutică descrisă aici, vor varia, în funcție de identitatea, dimensiunea și/sau afecțiunea subiectului tratat și, în plus, de calea prin care compoziția urmează să fie administrată. Compoziția poate cuprinde între 0,1% și 100% (g/g) de ingredient activ.

Excipienții acceptabili farmaceutic utilizați la fabricarea compozițiilor farmaceutice furnizate includ diluanți inerti, agenți de dispersare și/sau granulare, agenți activi de suprafață și/sau emulgatori, agenți de dezintegrare, agenți de legare, conservanți, agenți de tamponare, agenți de lubrifiere și/sau uleiuri. În compoziție pot fi, de asemenea, prezenți excipienți, cum ar fi unt de cacao și ceară pentru supozitoare, agenți de colorare, agenți de acoperire, agenți de îndulcire, aromatizare și parfumare.

Compușii furnizați aici sunt formulați în mod obișnuit sub formă de unitate de dozare pentru ușurința administrării și uniformitatea dozării. Se va înțelege, totuși, că totalul de compoziții descrise aici utilizate zilnic va fi decis de un medic în limitele raționamentului medical corect. Nivelul de doză specific eficient terapeutic pentru orice subiect sau organism particular va depinde de o varietate de factori, incluzând boala care este tratată și severitatea tulburării; activitatea ingredientului activ specific folosit; compoziția specifică folosită; vârsta, greutatea corporală, starea generală de sănătate, sexul și alimentația subiectului; timpul de administrare, calea de administrare și viteza de excreție a ingredientului activ

specific folosit; durata tratamentului; medicamente utilizate în combinație sau accidental cu ingredientul activ specific utilizat; și factori asemenea bine cunoscuți în științele medicale.

Compusul din prezenta invenție (Compusul (1)) și compozițiile acestuia furnizate aici pot fi administrate pe orice cale, incluzând enteral (*de ex.*, oral), parenteral, intravenos, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, subcutanat, intraventricular, transdermic, interdermic, rectal, intravaginal, intraperitoneal, topic (cum ar fi, prin pulberi, unguente, creme și/sau picături), mucozal, nazal, bucal, sublingual; prin instilare intratraheală, instilare bronșică și/sau inhalare; și/sau ca pulverizat oral, pulverizat nazal și/sau aerosol. Căile avute în vedere în mod specific sunt administrarea orală, administrarea intravenoasă (de ex., injecția intravenoasă sistemică), administrarea regională prin aport în sânge și/sau limfă, și/sau administrarea directă la un situs afectat. În general, calea cea mai adecvată de administrare va depinde de o varietate de factori, incluzând natura agentului (*de ex.*, stabilitatea acestuia în mediul tractului gastrointestinal) și/sau starea subiectului (de ex., dacă subiectul este capabil să tolereze administrarea orală).

Cantitatea exactă de compus (1) necesară pentru a obține o cantitate eficientă va varia de la subiect la subiect, în funcție, de exemplu, de specie, vârstă și starea generală ale unui subiect, severitatea efectelor secundare sau a tulburării, identitatea compusului particular, modul de administrare, și altele asemenea. O cantitate eficientă poate fi inclusă într-o singură doză (*de ex.*, doză orală unică) sau în mai multe doze (de ex., mai multe doze orale). În anumite variante de realizare, atunci când mai multe doze sunt administrate unui subiect sau sunt aplicate unui țesut sau celulă, oricare două doze din dozele multiple includ cantități diferite sau substanțial aceleași de un compus descris aici. În anumite variante de realizare, atunci când mai multe doze sunt administrate unui subiect sau sunt aplicate unui țesut sau celulă, frecvența administrării mai multor doze la subiect sau a aplicării mai multor doze la țesut sau celulă poate fi, în exemple nelimitative, trei doze pe zi, două doze pe zi, o doză pe zi, o doză la două zile, o doză la trei zile, o doză pe săptămână, o doză la două săptămâni, o doză la trei săptămâni sau o doză la patru săptămâni, sau chiar eliberare controlată de doză lentă într-o perioadă de timp selectată, utilizând un dispozitiv de eliberare a medicamentului. În anumite variante de realizare, frecvența administrării mai multor doze la subiect sau a aplicării mai multor doze la țesut sau celulă este de o doză pe zi. În anumite variante de realizare, frecvența administrării mai multor doze la subiect sau a aplicării mai multor doze la țesut sau celulă este de două doze pe zi. În anumite variante de realizare, frecvența administrării mai multor doze la subiect sau a aplicării mai multor doze la țesut sau celulă este de trei doze pe zi. În anumite variante de realizare, atunci când mai multe doze sunt administrate unui subiect sau aplicate unui țesut sau celulă, durata dintre prima doză și ultima doză dintre acele mai multe doze este de aproximativ sau cel puțin o zi, două zile, patru zile, o săptămână, două săptămâni, trei săptămâni, o lună, două luni, trei luni, patru luni, șase luni, nouă luni, un an, doi ani, trei ani, patru ani, cinci ani, șapte ani, zece ani, cincisprezece ani, douăzeci de ani, sau durata de viață a subiectului, țesutului sau celulei. În anumite variante de realizare, durata dintre prima doză și ultima doză dintre acele mai multe doze este de aproximativ sau cel puțin trei luni, șase luni sau un an. În anumite variante de realizare, durata dintre prima doză și ultima doză a acelor mai multe doze este durata de viață a subiectului, țesutului sau celulei. În anumite variante de realizare, o doză (*de ex.*, o doză unică sau orice doză cu mai multe doze) descrisă aici include, în mod independent, între 0,001 mg/kg și 0,01 mg/kg, între 0,01 mg/kg și 0,1 mg/kg sau între 0,1 mg/kg și 1 mg/kg, inclusiv, de compus (1). Exemple sunt forme de dozare cu cel puțin aproximativ 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 5, 20, 25 sau 50 mg de compus activ sau sare a acestuia, într-o formă de dozare.

Intervalele de doză, așa cum sunt descrise aici, furnizează îndrumări pentru administrarea compozițiilor farmaceutice furnizate la un adult. Cantitatea care trebuie administrată, de exemplu, unui copil sau unui adolescent poate fi determinată de către un medic sau de către o persoană de specialitate în domeniu, și poate fi mai mică sau aceeași cu cea administrată unui adult.

De asemenea, în dezvăluire sunt incluse kituri (de ex., pachete farmaceutice). Kiturile furnizate pot cuprinde o compoziție farmaceutică sau Compusul (1) și un recipient (de ex., un flacon, o fiolă, o sticlă, o seringă și/sau un dozator, sau alt recipient adecvat). În unele variante de realizare, kiturile furnizate pot include în mod opțional un al doilea recipient care cuprinde un excipient farmaceutic pentru diluarea sau suspendarea unei compoziții farmaceutice sau a Compusului (1). În unele variante de realizare, compoziția farmaceutică sau Compusul (1) furnizat în primul recipient și în cel de-al doilea recipient sunt combinate pentru a forma o formă de unitate de dozare. Un kit descris aici poate include unu sau mai mulți agenți farmaceutici suplimentari descriși aici sub forma unei compoziții separate.

Metode de tratament și utilizări

Așa cum este arătat aici, Compusul (1) are efecte semnificative de remodelare vasculară a tumorii și activitate anti-CAF și, prin urmare, are o utilizare posibilă pentru tratamentul cancerului și/sau pentru inhibarea creșterii tumorii.

Aici este furnizată o metodă de tratare a cancerului la un subiect, metoda cuprinzând administrarea la subiect a unei cantități eficiente de un compus (1) sau de o sare acceptabilă farmaceutic

sau de o compoziție farmaceutică a acestuia. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, pentru utilizare pentru tratarea cancerului la un subiect. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, utilizarea Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea cancerului.

De asemenea, aici este furnizată o metodă de inhibare a creșterii tumorii la un subiect, metoda cuprinzând administrarea la subiect a Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia. De asemenea, aici este furnizat Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în inhibarea creșterii tumorii la un subiect. Prezenta invenție furnizează, de asemenea, utilizarea Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru inhibarea creșterii tumorii.

În anumite variante de realizare a metodelor și utilizărilor furnizate aici, cancerul este cancer de cap și gât, cancer mamar, cancer esofagian, cancer uterin, cancer ovarian, cancer colorectal, cancer endometrial, cancer gastric, cancer de intestin subțire, cancer de vezică urinară, sau un sarcom.

În anumite variante de realizare a metodelor și utilizărilor furnizate aici, cancerul este cancer de cap și gât (*de ex.*, carcinom cu celule scuamoase de cap și gât, cancer oral, cancer de gât, cancer de glande salivare, cancer de limbă, carcinom adenoid chistic). În anumite variante de realizare, cancerul este carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN). În anumite variante de realizare, cancerul este carcinom adenoid chistic. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer mamar (de ex., cancer mamar HER2-pozitiv, cancer mamar triplu negativ). În anumite variante de realizare, cancerul este cancer mamar HER2-pozitiv. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer mamar triplu negativ. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer colorectal (*de ex.*, carcinom de colon). În anumite variante de realizare, cancerul este carcinom de colon. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer esofagian (de ex., adenocarcinom esofagian). În anumite variante de realizare, cancerul este adenocarcinom esofagian. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer uterin (*de ex.*, sarcom uterin). În anumite variante de realizare, cancerul este sarcom uterin. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer ovarian. În anumite variante de realizare, cancerul este un sarcom (*de ex.*, sarcom uterin, fibrosarcom, angiosarcom, sarcom sinovial, carcinom de țesut moale). În anumite variante de realizare, cancerul este fibrosarcom. În anumite variante de realizare, cancerul este angiosarcom. În anumite variante de realizare, cancerul este sarcom sinovial. În anumite variante de realizare, cancerul este carcinom de țesut moale. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer gastric. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer de intestin (de ex., cancer de intestin subțire, adenocarcinom de intestin subțire). În anumite variante de realizare, cancerul este cancer de intestin subțire. În anumite variante de realizare, cancerul este adenocarcinom de intestin subțire. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer de vezică urinară (de ex., cancer urotelial). În anumite variante de realizare, cancerul este cancer urotelial. În anumite variante de realizare, cancerul este cancer endometrial. În anumite variante de realizare, cancerul este un cancer rar.

Terapie combinată

Pe lângă administrarea în monoterapie, Compusul (1) poate fi administrat în combinație cu alți agenți terapeutici sau cu alte modalități de tratament. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un anticorp. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un anticorp monoclonal. Compusul din prezenta invenție poate fi administrat în combinație cu un alt agent terapeutic, cum ar fi terapia anti-EGFR, terapia anti-HER2, terapia anti-PD-1, terapia anti-PD-L1 sau terapia cu iradiere.

În anumite variante de realizare, Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, este administrată în combinație cu o terapie anti-EGFR (de ex., anticorp monoclonal anti-EGFR (mAb), cum ar fi cetuximab). În anumite variante de realizare, terapia anti-EGFR este un anticorp anti-EGFR. De exemplu, aici este furnizată o metodă de tratare a carcinomului cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN) la un subiect, care cuprinde administrarea la subiectul menționat a Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții farmaceutice a acestuia, în combinație cu o terapie cu mAb anti-EGFR (receptorul factorului de creștere epidermică). În anumite variante de realizare, mAb anti-EGFR este cetuximab (CTX).

În anumite variante de realizare, Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, este administrată în combinație cu o terapie anti-HER2 (de ex., anticorp monoclonal anti-HER2 (mAb), cum ar fi trastuzumab). În anumite variante de realizare, terapia anti-HER2 este un anticorp anti-HER2. De exemplu, aici este furnizată o metodă de tratare a cancerului mamar la un subiect care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea la subiectul menționat a Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții a acestuia, în combinație cu o terapie cu mAb de HER2 (receptor al factorului uman de creștere epidermică). În anumite variante de realizare, mAb anti-HER2 este trastuzumab.

În anumite variante de realizare, Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, este administrată în combinație cu o terapie anti-PD-1 sau anti-PD-L1 (*de ex.*, anticorp monoclonal anti-PD-1 sau anti-PD-L1). În anumite variante de realizare, terapia anti-PD-1 sau anti-PD-L1 este un anticorp. De exemplu, aici este furnizată o metodă de tratare a cancerului colorectal la un subiect care are nevoie de aceasta, care cuprinde administrarea la subiectul menționat a Compusului (1), sau a unei sări acceptabile farmaceutic sau a unei compoziții a acesteia, în combinație cu o terapie cu anti-PD-1 sau anti-PD-L1 (*de ex.*, terapie mAb).

În anumite variante de realizare, Compusul (1), sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție farmaceutică a acestuia, este utilizată în combinație cu terapie cu radiații (RT). În anumite variante de realizare, compusul este administrat în combinație cu intervenția chirurgicală.

EXEMPLE

Sinteza compusului (1)

Proceduri și metode generale

Compusul conform prezentei invenții poate fi produs prin metodele descrise în Exemplele de mai jos. Cu toate acestea, aceste exemple sunt doar pentru scopuri ilustrative, și compusul conform prezentei invenții nu este limitat în niciun fel la exemplele specifice menționate mai jos.

În exemple, cu excepția cazului în care se menționează în mod precis altfel, silicagelul pentru purificare prin cromatografie pe coloană de silicagel a fost coloană Hi-Flash™ (Silicagel, 30 μm 60 Å sau 40 μm 60 Å, Yamazen Corporation), silicagelul pentru purificare prin utilizarea cromatografiei pe coloană de silicagel NH a fost silicagel Chromatorex NH (Fuji Silysia Chemical LTD). Cromatografia analitică în strat subțire (TLC) a fost efectuată cu silicagel TLC 60 F₂₅₄, grosimea stratului 0,25 mm (Merck KGaA) sau silicagel Chromatorex TLC NH F₂₅₄, grosimea stratului 0,25 mm (Fuji Silysia Chemical LTD). Plăcile TLC au fost vizualizate prin colorare cu colorant p-anisaldehydă, colorare cu acid fosfomolibdic sau colorare Hanessian.

Toate reacțiile sensibile la umiditate au fost desfășurate într-o atmosferă inertă. Reactivii și solvenții au fost de calitate comercială și au fost utilizați așa cum au fost furnizați, cu excepția cazului în care este menționat altfel.

Spectrele RMN au fost înregistrate pe un spectrometru JEOL ECZ500R (500 MHz), JEOL ECZ400S (400 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz), Varian Mercury 400 (400 MHz) sau Bruker Avance (600 MHz). Deplasările chimice sunt raportate în părți la fiecare milion (ppm). Pentru spectre ¹H RMN (CDCl₃, C₆D₆, și/sau CD₃OD), vârful solventului rezidual a fost utilizat ca referință internă (7,27 ppm în CDCl₃; 7,16 ppm în C₆D₆; 3,31 ppm în CD₃OD).

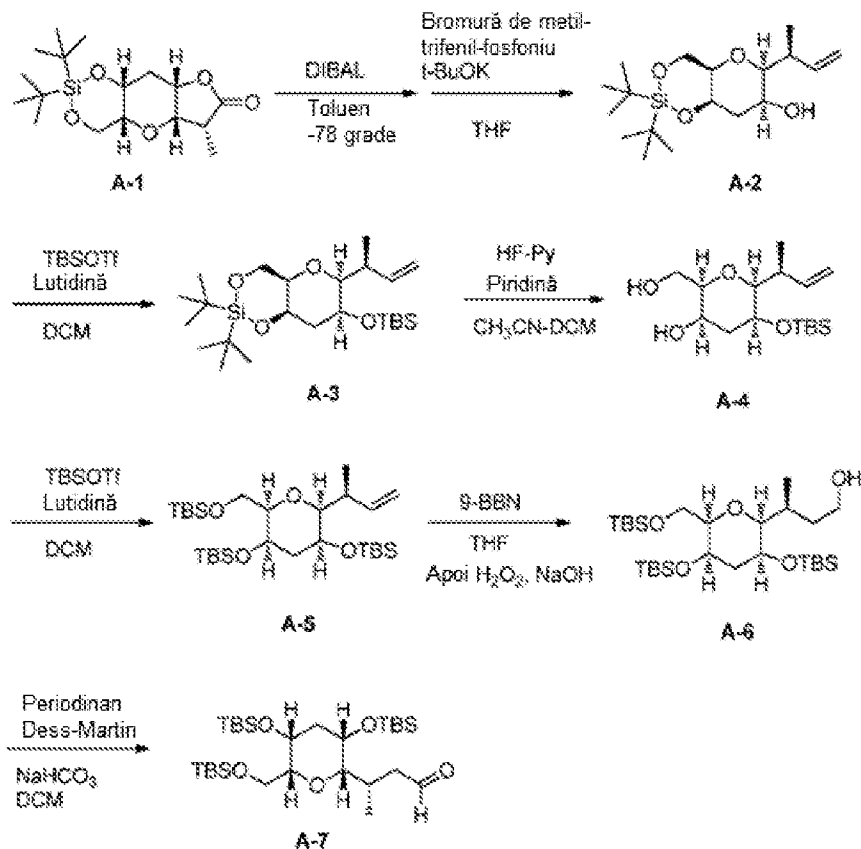
Rezultatele spectrelor de masă analitice (MS) au fost obținute utilizând un Waters Acquity UPLC echipat cu un singur detector cvadrapol (SQ Detector 2) sau LTQ Orbitrap XL™ (Thermo scientific).

Cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC) a fost efectuată cu Shimadzu LC-10AD pe un detector spectrofotometric UV (200 nm, Shimadzu SPD-10A).

Abrevierile utilizate aici sunt după cum urmează: AIBN: 2,2'-azobis(izobutironitril); 9-BBN: 9-borabicyclo[3.3.1]nonan; Bu₃SnH: hidrură de tri-normal-butilstaniu; (+)-CSA: acid (1S)-(+)-10-camforsulfonic; DMAP: 4-dimetilaminopiridină; DCM: diclorometan; DDQ: 2,3-diclor-5,6-diciano-1,4-benzochinonă; DIBAL: hidrură de diizobutilaluminiiu; DMF: N,N-dimetilformamidă; DMSO: dimetil sulfoxid; Et₃N: trietilamină; EtOAc: acetat de etil; HF-piridină: acid fluorhidric piridină; HPLC: cromatografie de lichid de înaltă performanță; IPA: alcool izopropilic; MeCN: acetonitril; MeOH: metanol; MPM: para-metoxibenzil; PPh₃: trifenilfosfină; t-BuOH: alcool *terț*-butilic; tBuLi: *terț*-butil litiu; TBME: metil *terț*-butil eter; TBAF: fluorură de tetrabutylamoniu; TBS: *terț*iar-butildimetilsilil; THF: tetrahidrofur; TMS: trimetilsilil; Ts: para-toluensulfonil.

Intermediarii de sinteză dezvăluți aici sunt considerați parte a prezentei invenții.

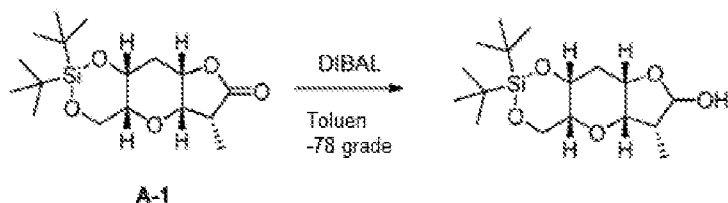
Schema A: Prepararea Compusului A-7



Exemplul 1

(4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-di-*tert*-butil-6-metiloctahidrofuro[2',3':5,6]pirano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7-ol

5



Într-o atmosferă de azot, la soluția de compus A-1: (4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-di-*tert*-butil-6-metilhexahidrofuro[2',3':5,6]pirano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7(8aH)-onă (A-1 18,5 g, 54,0 mmoli) obținută prin metoda scrisă în Organic Letters (2009), 11(2), 409-412 (Nr CAS; 1095280-04-8) în toluen (275 mL) la -78 °C, a fost adăugat DIBAL (70,2 mL, 70,2 mmoli, soluție 1,0 M de toluen) timp de 30 min. Apoi amestecul de reacție a fost agitat la -78 °C. După 90 de minute, reacția a fost stinsă cu MeOH (4,37 mL) cu grijă la -78 °C, apoi a fost îndepărtată baia de răcire. La amestecul de reacție a fost adăugată soluție saturată de tartrat de sodiu potasiu tetrahidrat (300 mL), agitarea a fost continuată timp de 2 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost turnat într-o pâlnie de separare, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu EtOAc (300 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină (300 mL), au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate, au fost concentrate la presiune redusă. Lactolul brut a fost utilizat pentru următoarea reacție fără purificare.

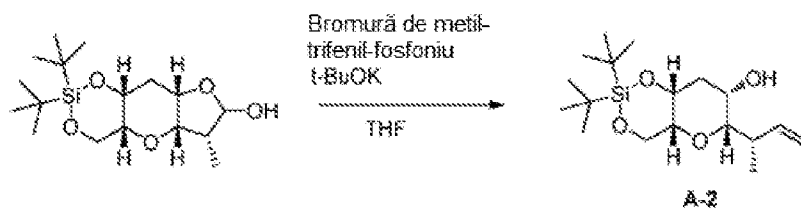
10

15

Exemplul 2

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-il)-2,2-di-*tert*-butilhexahidropiran[3,2-d][1,3,2] dioxasilin-7-ol (Compusul A-2)

20

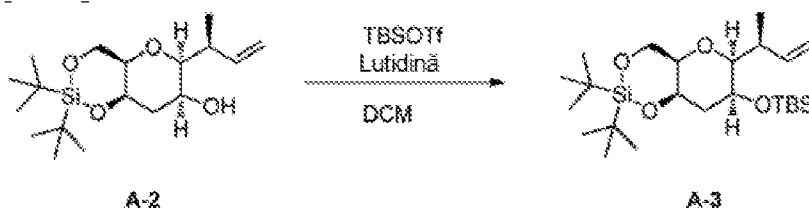


Într-o atmosferă de azot, la suspensia de bromură de metiltrifenilfosfoniu (73,30 g, 205,2 mmoli) în THF (200 mL), a fost adăugat terț-butoxid de potasiu (17,27 g, 153,9 mmoli) la -5 °C timp de 10 minute, și apoi au fost agitate timp de 60 min la -5 °C. Soluția de lactol brut descrisă în Exemplul 1 în
 5 THF (40 mL) a fost transferată în amestecul de reacție la -5 °C timp de 10 minute, apoi a fost agitată la -5 °C timp de 1 oră, la temperatura camerei timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost stins cu apă cu gheață (400 ml), apoi a fost diluat cu TBME (400 ml) și apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu TBME (400 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină (400 mL), au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Reziduuul a fost suspendat cu Heptan/EtOAc = 1/1 (100 mL). Suspensia rezultată a fost filtrată, a fost clătită cu Heptan/EtOAc = 1/1 (100 mL) pentru a îndepărta materialul derivat din trifenilfosfină. Apoi filtratul a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduuului pe silicagel (400 g, Silica Gel 60, sferic, 40-50 μm, Kanto Chemical) folosind 0% până la 20% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul A-2, 16,7 g, randament 90%).

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,03 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,05 (s, 9 H) 1,07 (s, 9 H) 1,75 (dt, J=14,5, 3,0 Hz, 1 H) 2,37 (dt, J=14,5, 2,9 Hz, 1 H) 2,65 - 2,76 (m, 1 H) 3,03 (dd, J=9,8, 1,0 Hz, 1 H) 3,31 (m, 1 H) 3,69 (d, J=15,0 Hz, 1 H) 3,75 - 3,79 (m, 1 H) 4,16 - 4,31 (m, 2 H) 4,41 (t, J=2,9 Hz, 1 H) 4,95 - 5,09 (m, 2 H) 6,02 (ddd, J=17,3, 10,5, 6,3 Hz, 1 H).

Exemplul 3

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-il)-2,2-di-terț-butil-7-((terț-butildimetilsilil)oxi)hexahidropirano[3,2-d][1,3,2]dioxasilină (Compusul A-3)

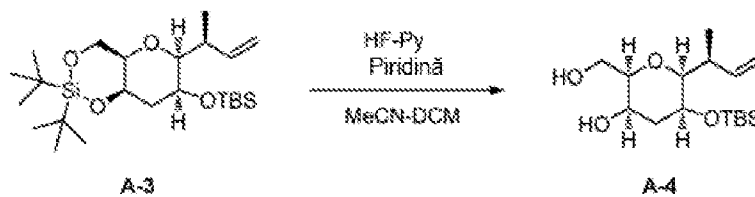


Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus A-2: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-il)-2,2-di-terț-butilhexahidropirano[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-7-ol (9,85 g, 28,8 mmoli) descris în Exemplul 2, în DCM (150 mL) la 0°C, au fost adăugate 2,6-lutidină (6,68 mL, 57,5 mmoli) și trifluormetansulfonat de terț-butildimetilsilil (9,25 mL, 40,3 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 0°C timp de 30 de minute, apoi la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu dietil eter. Stratul organic a fost spălat cu soluție apoasă de HCl 0,5 N, soluție apoasă saturată de NaHCO₃ și apoi cu soluție salină. Straturile organice combinate au fost uscate pe MgSO₄, au fost filtrate (cantitate mică de SiO₂) și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduuului pe silicagel utilizând 0% până la 15% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul A-3, 12,0 g, randament 91%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,10 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,96 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 1,02 (s, 9 H) 1,06 (s, 9 H) 1,73 (dt, J=15,0, 4,0 Hz, 1 H) 2,26 (dt, J=15,0, 2,5 Hz, 1 H) 2,66 - 2,74 (m, 1 H) 2,95 (dd, J=9,5, 2,2 Hz, 1 H) 3,17 (m, 1 H) 3,81 - 3,84 (m, 1 H) 4,12 - 4,22 (m, 2 H) 4,24 (t, J=2,7 Hz, 1 H) 4,93 - 5,06 (m, 2 H) 6,08 (ddd, J=17,3, 10,5, 6,3 Hz, 1 H).

Exemplul 4

(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-but-3-en-2-il)-5-((terț-butildimetilsilil)oxi)-2-(hidroximetil)tetra hidro-2H-piran-3-ol (Compusul A-4)



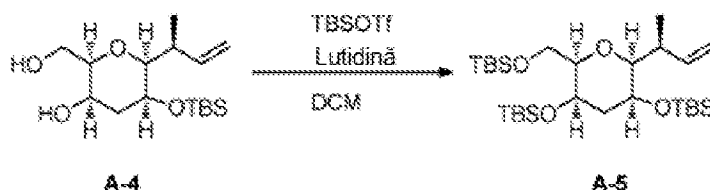
Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus A-3: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-but-3-en-2-il)-2,2-di-terț-butil-7-((terț-butildimetilsilil)oxi)hexahidropirano[3,2-d][1,3,2]dioxasilină (12 g, 26,3 mmoli)

descrișă în Exemplul 3, în MeCN (120 mL) și DCM (40 mL) la -10 °C, a fost adăugată soluție preamestecată de HF-piridină (4,0 mL) și piridină (20 mL) în 20 mL de MeCN. Amestecul de reacție a fost agitat la -10 °C timp de 15 minute, apoi la temperatura camerei timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃ la 0 °C și a fost diluat cu DCM, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină. Stratul organic combinat a fost uscat pe MgSO₄, a fost filtrat și a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduului pe silicagel utilizând 15% până la 60% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul A-4, 8,4 g, Randament Cantitativ).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,13 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,94 (s, 9 H) 0,96 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,72 (dt, J=14,6, 2,9 Hz, 1 H) 2,15 (dd, J=9,8, 2,4 Hz, 1 H) 2,23 (dt, J=14,6, 2,9 Hz, 1 H) 2,55 - 2,65 (m, 1 H) 3,03 (d, J=9,8 Hz, 1 H) 3,41 - 3,46 (m, 1 H) 3,49 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 3,62 - 3,72 (m, 2 H) 3,92 (ddd, J=11,7, 8,3, 2,4 Hz, 1 H) 4,02 (t, J=2,7 Hz, 1 H) 5,01 - 5,12 (m, 2 H) 5,93 (ddd, J=17,4, 10,4, 7,3 Hz, 1 H).

Exemplul 5

(((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-but-3-en-2-il)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-3,5-diil)bis(oxi))bis(tert-butildimetilsilan) (Compusul A-5)

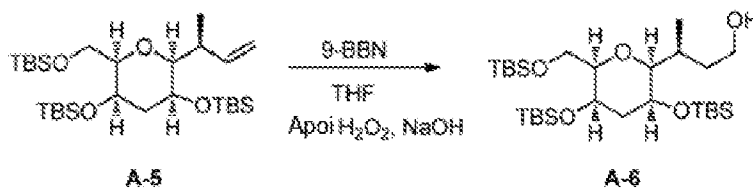


Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus A-4: (2R,3R,5S,6S)-6-((S)-but-3-en-2-il)-5-(((tert-butildimetilsilil)oxi)-2-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-ol (997 mg, 3,15 mmoli) descriș în Exemplul 4, în DCM (10 mL) la 5°C, au fost adăugate 2,6-lutidină (1,83 mL, 15,8 mmoli) și trifluormetansulfonat de tert-butildimetilsilil (2,17 mL, 9,45 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 5 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu dietil eter și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃, apoi straturile au fost separate. Extractele organice combinate au fost spălate succesiv cu HCl 0,5 N apos, soluție apoasă saturată de NaHCO₃ și apoi cu soluție salină. Stratul organic a fost uscat pe MgSO₄, a fost filtrat și a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduului pe silicagel utilizând 0% până la 5% EtOAc/heptan (conținând 1% Et₃N) a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul A-5, 1,69 g, randament 98%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,02 - 0,08 (m, 15 H) 0,11 (s, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 0,90 - 0,92 (m, 18 H) 0,94 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,82 (dt, J=14,9, 4,8 Hz, 1 H) 2,00 (dt, J=14,9, 2,9 Hz, 1 H) 2,62 - 2,72 (m, 1 H) 2,93 (dd, J=9,3, 2,0 Hz, 1 H) 3,27 - 3,34 (m, 1 H) 3,66 - 3,79 (m, 3 H) 3,83 - 3,87 (m, 1 H) 4,91 - 5,07 (m, 2 H) 6,11 (ddd, J=17,3, 10,7, 6,1 Hz, 1 H).

Exemplul 6

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis(((tert-butildimetilsilil)oxi)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)butan-1-ol (Compusul A-6)



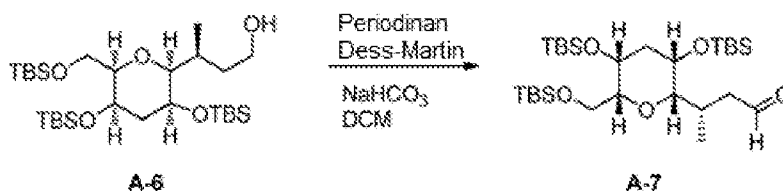
La o soluție de compus A-5: (((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-but-3-en-2-il)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-3,5-diil)bis(oxi))bis(tert-butildimetilsilan) (1,32 g, 2,42 mmoli) descriș în Exemplul 5, în THF (10 mL) la 0°C, a fost adăugat 9-BBN (9,69 mL, soluție de 0,5 M THF, 4,84 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 0°C timp de 1 oră, și la temperatura camerei timp de 1,5 ore. La amestecul de reacție au fost adăugate NaOH apos 3,0 M (3 mL, 9,00 mmoli) și peroxid de hidrogen (35% în apă, 3 mL) la 0°C. Amestecul de reacție a fost agitat la 0°C timp de 30 de minute, apoi la temperatura camerei timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de Na₂SO₃, și apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu EtOAc (de 3 ori). Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduului pe silicagel utilizând 0% până la 20% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul A-6, 1,36 g, randament 100%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,03 (s, 3 H) 0,05 - 0,08 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,88 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,89 - 0,93 (m, 27 H) 1,55 - 1,65 (m, 1H) 1,82 (dt, J=15,4, 4,4 Hz, 1 H) 1,87 -

1,96 (m, 1 H) 1,97 - 2,03 (m, 1 H) 2,17- 2,26 (m, 1H) 2,67 (dd, J=7,8, 3,9 Hz, 1 H) 2,98 - 3,10 (m, 1 H) 3,34 - 3,40 (m, 1 H) 3,59 - 3,86 (m, 6 H) ESI-MS (m/z): 563,64 [M+H]⁺, 585,62 [M+Na]⁺

Exemplul 7

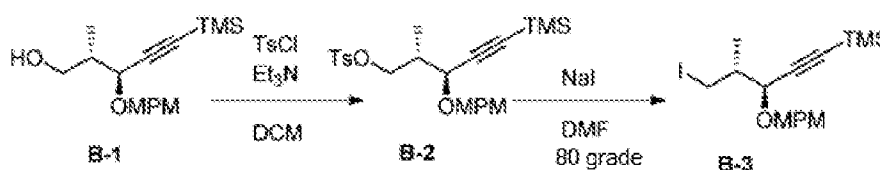
(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)butanal (Compusul A-7)



Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus **A-6**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)butan-1-ol (1100 mg, 1,954 mmoli) descris în Exemplul 6, în DCM (30 mL) la 5°C, a fost adăugat NaHCO₃ (41,0 mg, 0,49 mmoli) și Periodinan Dess-Martin (1077 mg, 2,54 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei. După 3 ore, amestecul de reacție a fost diluat cu DCM și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃ și cu soluție apoasă saturată de Na₂SO₃, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe MgSO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 25% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **A-7**, 950 mg, randament 87%).

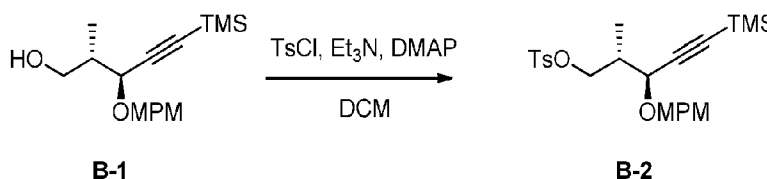
¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,00 (s, 3 H) 0,03 - 0,08 (m, 12 H) 0,11 (s, 3 H) 0,88 (s, 9 H) 0,91 - 0,92 (m, 21H) 1,82 (dt, J=15,0, 4,5 Hz, 1 H) 2,01 (dt, J=15,0, 2,5 Hz, 1 H) 2,28 (ddd, J=16,0, 7,3, 2,4 Hz, 1 H) 2,53 -2,58 (m, 1 H) 2,74 (ddd, J=16,0, 5,5, 2,0 Hz, 1 H) 2,94 (dd, J=9,0, 1,7 Hz, 1 H) 3,29 (td, J=5,9, 2,0 Hz, 1 H) 3,68 (d, J=5,9 Hz, 2 H) 3,75 - 3,82 (m, 1 H) 3,82 - 3,90 (m, 1 H) 9,73 (t, J=2,4 Hz, 1 H).

Schema B: Prepararea Compusului B-3



Exemplul 8

(2S,3S)-3-((4-metoxibenzil)oxi)-2-metil-5-(trimetilsilil)pent-4-in-1-il 4-metilbenzensulfonat (Compusul B-2)

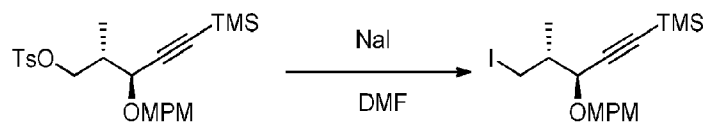


Într-o atmosferă de azot, la soluția de compus **B-1**: (2S,3S)-3-((4-metoxibenzil)oxi)-2-metil-5-(trimetilsilil)pent-4-in-1-ol (11,08 g, 36,15 mmoli) obținut prin metoda scrisă în WO 9317690 A1/US 5436238 A (Nr CAS; 157323-41-6) în DCM (330 ml), au fost adăugate Et₃N (12,6 ml, 90,4 mmoli) și clorură de p-toluensulfonil (8,27 g, 43,4 mmoli) la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost spălat cu NaHCO₃ saturat și cu soluție salină, a fost uscat pe MgSO₄, a fost filtrat, apoi a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel (Silica Gel 60, sferic, 40-50 μm, Kanto Chemical) folosind 0% până la 10% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **B-2**, 17,7 g, randament 93%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,17 (s, 9 H) 1,02 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 2,10 - 2,18 (m, 1 H) 2,44 (s, 3 H) 3,82 (s, 3 H) 3,99 (d, J=6,8 Hz, 1 H) 4,04 - 4,07(m, 2 H) 4,33 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,66 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,21 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,33 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,77 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

Exemplul 9

((3S,4R)-5-iodo-3-((4-metoxibenzil)oxi)-4-metilpent-1-in-1-il)trimetilsilan (Compusul B-3)

**B-2****B-3**

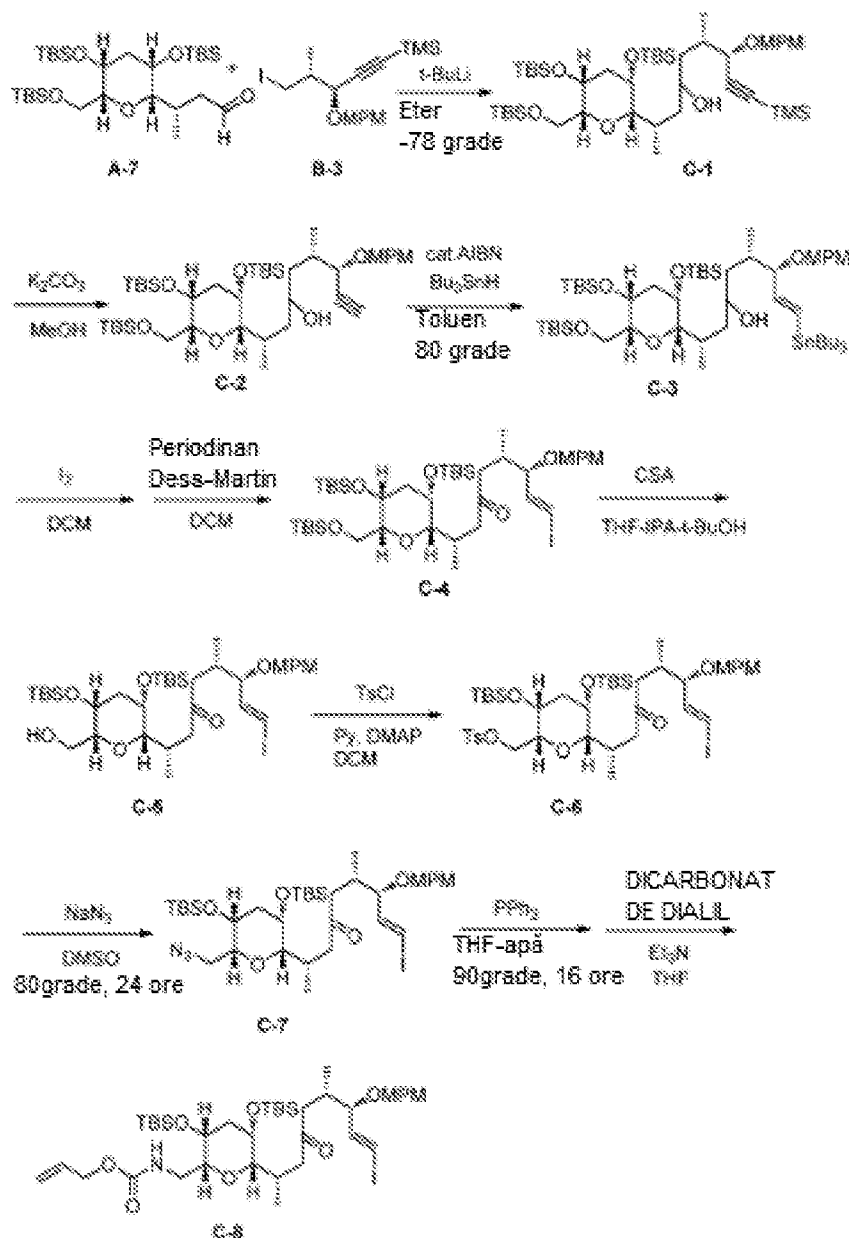
Într-o atmosferă de azot, la soluția de compus **B-2**: (2S,3S)-3-((4-metoxibenzil)oxi)-2-metil-5-(trimetilsilil)pent-4-in-1-il 4-metilbenzensulfonat (17,7 g, 38,4 mmoli) descris în Exemplul 8, în DMF (360 mL), a fost adăugat NaI (7,49 g, 50,0 mmoli) la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost agitat la 80°C timp de 2 ore. Au fost adăugate încă 2,0 g de NaI la amestecul de reacție. Reacția a fost agitată timp de 1,5 ore la 80°C, apoi a fost răcită la temperatura camerei. Amestecul a fost diluat cu dietil eter, a fost spălat cu apă și cu soluție salină, a fost uscat pe MgSO₄, a fost filtrat și a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel (Silica Gel 60, sferic, 40-50 μm, Kanto Chemical) folosind 10% până la 20% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **B-3**, 14,3 g, randament 89%).

5

10

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,21 (s, 9 H) 1,10 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,74 - 1,84 (m, 1 H) 3,30 - 3,37 (m, 2 H) 3,82 (s, 3 H) 3,96 (d, J=7,3 Hz, 1 H) 4,44 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,73 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 6,89 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,30 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

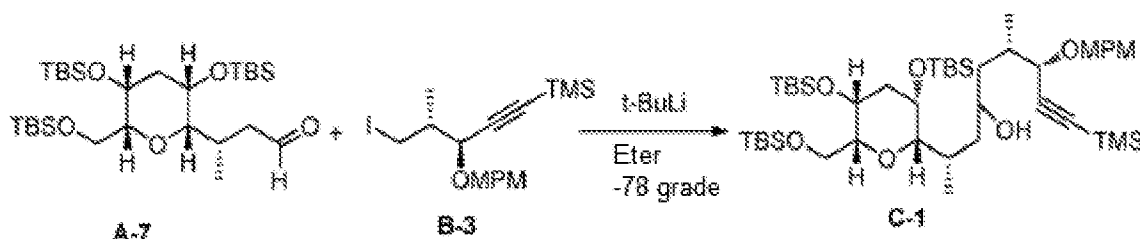
Schema C: Prepararea Compusului C-8



Exemplul 10

(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-9-(trimetilsilil)non-8-in-4-ol (Compusul C-1)

5



Într-o atmosferă de argon, la o soluție de compus **B-3**: ((3S,4R)-5-iodo-3-((4-metoxibenzil)oxi)-4-metilpent-1-in-1-il)trimetilsilan (1408 mg, 3,382 mmoli) descris în Exemplul 9, în dietil eter (25 ml) la -78 °C, A fost adăugat *tert*-butillitiu (1,61 M în pentan, 4,11 mL, 6,62 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la -78 °C timp de 45 min. Compus **A-7**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)butanal (825 mg, 1,47 mmoli) descris în Exemplul 7, în 5,0 ml de dietil eter, a fost adăugat la amestecul de reacție la -78°C. Amestecul de reacție a fost agitat la -78 °C timp de 60 min. Amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de NH₄Cl. Stratul organic a fost spălat cu soluție salină, a fost uscat pe Na₂SO₄, apoi a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 25% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **C-1**, 1167 mg, randament 93%).

10

15

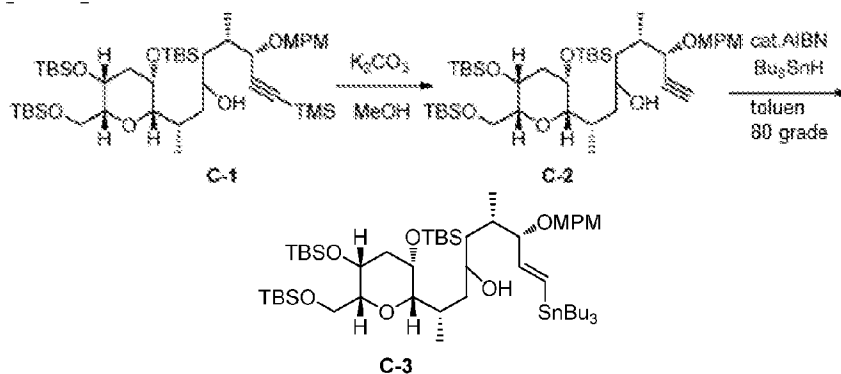
20

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-*d*) δ ppm 0,00 - 0,12 (m, 21 H) 0,15 - 0,24 (m, 6 H) 0,82 - 0,96 (m, 30 H) 1,03 (d, J=6,3 Hz, 3H) 1,38 - 1,55 (m, 1H) 1,68 - 1,99 (m, 4 H) 2,10 - 2,30 (m, 2 H) 2,76 - 2,87 (m, 1 H) 3,15 (d, J=9,75 Hz, 1 H) 3,33 - 3,38 (m, 1 H) 3,56 - 4,02 (m, 9 H) 4,37 - 4,50 (m, 1 H) 4,64 - 4,78 (m, 1 H) 6,83 - 6,88 (m, 2H) 7,23 - 7,35 (m, 2H).

Exemplul 11

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-9-(tributilst anil)non-8-en-4-ol (Compusul C-3)

25



La o soluție de compus **C-1**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-9-(trimetilsilil)non-8-in-4-ol (1165 mg, 1,37 mmoli) descris în Exemplul 10, în MeOH (20 mL) la 20 °C, a fost adăugat K₂CO₃ (189 mg, 1,37 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 20°C timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu EtOAc și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NH₄Cl, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu EtOAc. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe MgSO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel folosind 0% până la 15% EtOAc/heptan a condus la obținerea compusului **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-in-4-ol (1050 mg, randament 98%). ESI-MS (m/z): 801,50 [M+Na]⁺

30

35

40

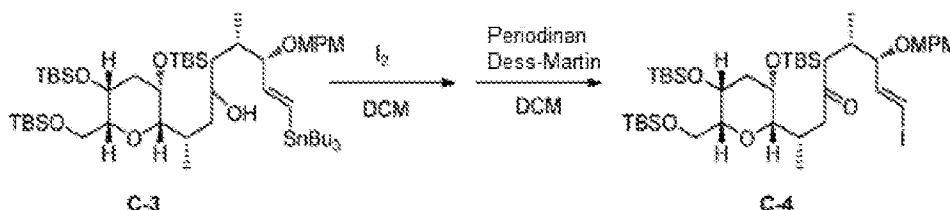
Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-in-4-ol (780 mg, 1,00 mmoli) obținut mai sus, în toluen (15 mL) la 20°C, au fost adăugate hidruță de tri-*n*-butilstaniu (2,5 mL, 9,36 mmoli) și 2,2'-azobis(izobutironitril) (82 mg, 0,50 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 90°C timp de 15 minute. Amestecul de reacție a fost

concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 15% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-3, 970 mg, randament 91%).

^1H RMN (500 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 0,02 - 0,13 (m, 18 H) 0,84 - 0,96 (m, 48 H) 1,22 - 1,37 (m, 6 H) 1,47 - 1,56 (m, 7 H) 1,72 - 1,90 (m, 3 H) 1,95-2,03 (m, 1 H) 2,11 - 2,28 (m, 2 H) 2,82 - 2,86 (m, 1 H) 3,08 - 3,15 (m, 1 H) 3,33 - 3,40 (m, 1 H) 3,43 - 3,53 (m, 1 H) 3,58 - 3,87 (m, 8 H) 4,25 - 4,31 (m, 1 H) 4,49 - 4,54 (m, 1 H) 5,83 (dd, $J=19,3, 7,6\text{Hz}$, 1 H) 6,05 - 6,13 (m, 1 H) 6,83 - 6,90 (m, 2 H) 7,24 (d, $J=8,8\text{ Hz}$, 2 H).

Exemplul 12

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (Compusul C-4)



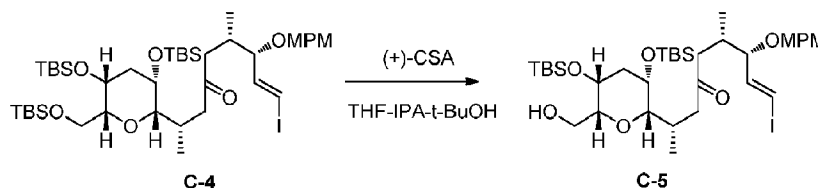
Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus C-3: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-9-(tributylstannil)non-8-en-4-ol (970 mg, 0,91 mmoli), descrisă în Exemplul 11, în 30 mL de DCM la 5°C, a fost adăugat iod (242 mg, 0,95 mmoli) în DCM (6 mL) până când a fost menținută culoarea iodului. Amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de Na_2SO_3 , și straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină. Straturile organice combinate au fost uscate pe Na_2SO_4 , au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 25% EtOAc/heptan a condus la obținerea de (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetililil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-ol (768 mg, randament 93 %).

Într-o atmosferă de azot, la o soluție de (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetililil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-ol (768 mg, 0,85 mmoli) obținut mai sus, în DCM (25 mL) la temperatura camerei, au fost adăugate NaHCO_3 (17,8 mg, 0,21 mmoli) și Periodinan Dess-Martin (485 mg, 1,14 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 4 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu DCM și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO_3 și cu soluție apoasă saturată de Na_2SO_3 , și apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe MgSO_4 , au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 20% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-4, 776 mg, Randament cantitativ).

^1H RMN (500 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 0,00 (s, 3 H) 0,03 - 0,07 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,81 (d, $J=6,3\text{ Hz}$, 3 H) 0,84 (d, $J=6,3\text{ Hz}$, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,80 (dt, $J=15,0, 4,5\text{ Hz}$, 1 H) 1,99 (dt, $J=15,0, 2,5\text{ Hz}$, 1 H) 2,17 (dd, $J=16,6, 10,2\text{ Hz}$, 1 H) 2,20 - 2,29 (m, 2 H) 2,43 - 2,48 (m, 1 H) 2,54 (d, $J=12,7\text{ Hz}$, 1 H) 2,87 (dd, $J=9,0, 1,7\text{ Hz}$, 1 H) 2,99 (dd, $J=16,6, 2,9\text{ Hz}$, 1 H) 3,27 (td, $J=5,8, 2,4\text{ Hz}$, 1 H) 3,50 - 3,56 (m, 1 H) 3,66 - 3,74 (m, 2H) 3,75 - 3,78 (m, 1 H) 3,80 (s, 3 H) 3,81 - 3,85 (m, 1 H) 4,26 (d, $J=11,7\text{ Hz}$, 1 H) 4,50 (d, $J=11,7\text{ Hz}$, 1 H) 6,26 (d, $J=14,6\text{ Hz}$, 1 H) 6,42 (dd, $J=14,6, 7,8\text{ Hz}$, 1 H) 6,87 (d, $J=8,3\text{ Hz}$, 2 H) 7,21 (d, $J=8,3\text{ Hz}$, 2 H). ESI-MS (m/z): 927,39 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Exemplul 13

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (Compusul C-5)



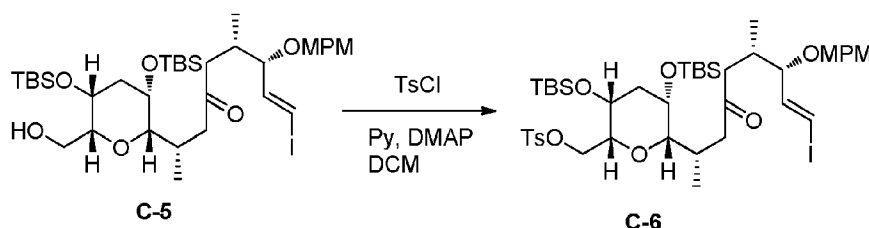
La o soluție de compus C-4: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(((*tert*-butildimetilil)oxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (600 mg, 0,66 mmoli) descrisă în Exemplul 12, în THF (5,0 mL), IPA (5,0 mL) și t-BuOH

(5,0 mL) la 4°C, a fost adăugat acid (1S)-(+)-10-camforsulfonic (154 mg, 0,66 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 4°C timp de 20 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu EtOAc și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu EtOAc. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe MgSO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 35% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-5, 500 mg, randament 95%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,01 (s, 3 H) 0,04 (s, 3 H) 0,07 (s, 3 H) 0,11 (s, 3 H) 0,86 - 0,91 (m, 15 H) 0,93 (s, 9 H) 1,83 (dt, J=14,9, 4,8 Hz, 1 H) 1,93 - 2,00 (dt, J=14,9, 4,8 Hz, 1 H) 2,19 - 2,26 (m, 1 H) 2,29 (dd, J=14,9, 5,6 Hz, 1 H) 2,39 (dd, J=16,6, 8,3 Hz, 1 H) 2,44 - 2,66 (m, 4 H) 2,91 (dd, J=9,5, 1,7 Hz, 1 H) 3,36 - 3,41 (m, 1 H) 3,48 (td, J=11,3, 2,7 Hz, 1 H) 3,59 (t, J=7,1 Hz, 1 H) 3,74 - 3,78 (m, 2 H) 3,80 (s, 3 H) 3,85 (m, 1 H) 4,25 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,46 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 6,28 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,43 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,21 (d, J=8,8 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 813,30 [M+Na]⁺

Exemplul 14

4-metilbenzensulfonat de ((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-4-oxonon-8-en-2-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)metil (Compusul C-6)

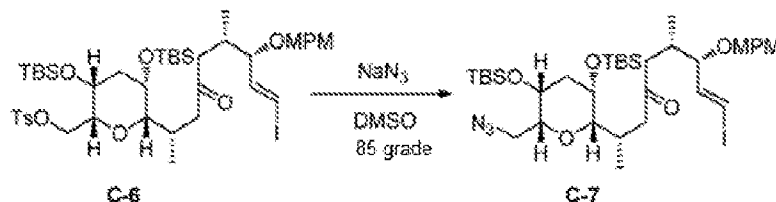


Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus C-5: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (500 mg, 0,63 mmoli) descrisă în Exemplul 13, în DCM (10 mL) la 5 °C, au fost adăugate piridină (2,54 mL, 31,6 mmoli), clorură de *p*-toluensulfonil (723 mg, 3,79 mmoli) și 4-dimetilaminopiridină (77 mg, 0,63 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 24 de ore. Clorura de *p*-toluensulfonil (150 mg, 0,79 mmoli) a fost adăugată la amestecul de reacție la temperatura camerei. Apoi, amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 8 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu DCM și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃, apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 0% până la 25% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-6, 560 mg, randament 94%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,01 (s, 3 H) 0,04 (s, 3 H) 0,08 (s, 3 H) 0,81 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,83 (s, 9 H) 0,86 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 1,81 (dt, J=14,9, 4,5 Hz, 1 H) 1,91 - 1,96 (m, 1 H) 2,15 - 2,32 (m, 3 H) 2,36 - 2,42 (m, 1 H) 2,43 (s, 3 H) 2,57 (d, J=12,7 Hz, 1 H) 2,77 (dd, J=16,6, 3,4 Hz, 1 H) 2,87 (dd, J=9,0, 1,7 Hz, 1 H) 3,53 - 3,58 (m, 2 H) 3,70 - 3,75 (m, 1 H) 3,80 - 3,85 (m, 1H) 3,81 (s, 3 H) 4,06 (dd, J=10,0, 5,0 Hz, 1 H) 4,08 - 4,16 (m, 1 H) 4,28 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,51 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 6,30 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,45 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,88 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,24 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,31 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,76 (d, J=8,3 Hz, 2 H).

Exemplul 15

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(azidometil)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (Compusul C-7)



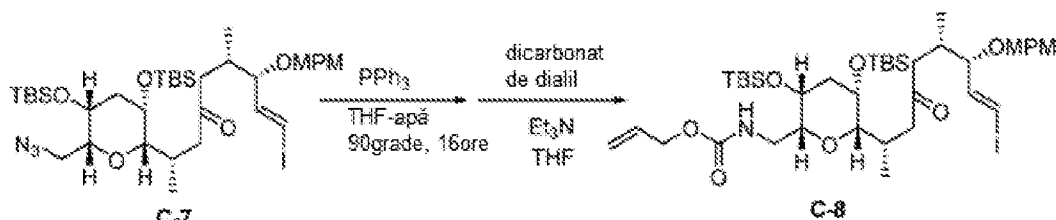
Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus C-6: 4-metilbenzensulfonat de ((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-4-oxonon-8-en-2-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)metil (560 mg, 0,59 mmoli) descris în Exemplul 14, în DMSO (5,6 mL) la 20°C, a fost adăugată azidă de sodiu (385 mg, 5,92 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 85°C. După 2 ore, a fost adăugată azidă de sodiu (100 mg, 1,54 mmoli) la amestecul de reacție, apoi amestecul de reacție a fost agitat la 85°C timp de 14 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu EtOAc și a fost stins

cu H₂O, apoi straturile au fost separate. Extractele organice au fost spălate succesiv cu apă și cu soluție salină. Straturile organice combinate au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă pentru a se obține un reziduu brut. Cromatografia rapidă a reziduurilor pe silicagel utilizând 0% până la 15% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-7, 298 mg, randament 62%).

¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,03 (s, 3 H) 0,06 (s, 3 H) 0,07 (s, 3 H) 0,10 (s, 3 H) 0,84 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,85 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,86 (dt, J=15,0, 4,7 Hz, 1 H) 1,98 (dt, J=15,0, 2,9 Hz, 1 H) 2,19 - 2,32 (m, 3 H) 2,41 - 2,49 (m, 1 H) 2,58 (d, J=12,7 Hz, 1 H) 2,94 (dd, J=16,6, 2,9 Hz, 1 H) 2,98 (dd, J=8,8, 2,0 Hz, 1 H) 3,02 (dd, J=12,7, 2,9 Hz, 1 H) 3,47 (dt, J=8,8, 2,7 Hz, 1 H) 3,49 - 3,54 (m, 1 H) 3,63 (dd, J=12,7, 8,8 Hz, 1 H) 3,69 - 3,73 (m, 1 H) 3,81 (s, 3H) 3,83 - 3,88 (m, 1 H) 4,26 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 4,50 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 6,26 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,42 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,22 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

Exemplul 16

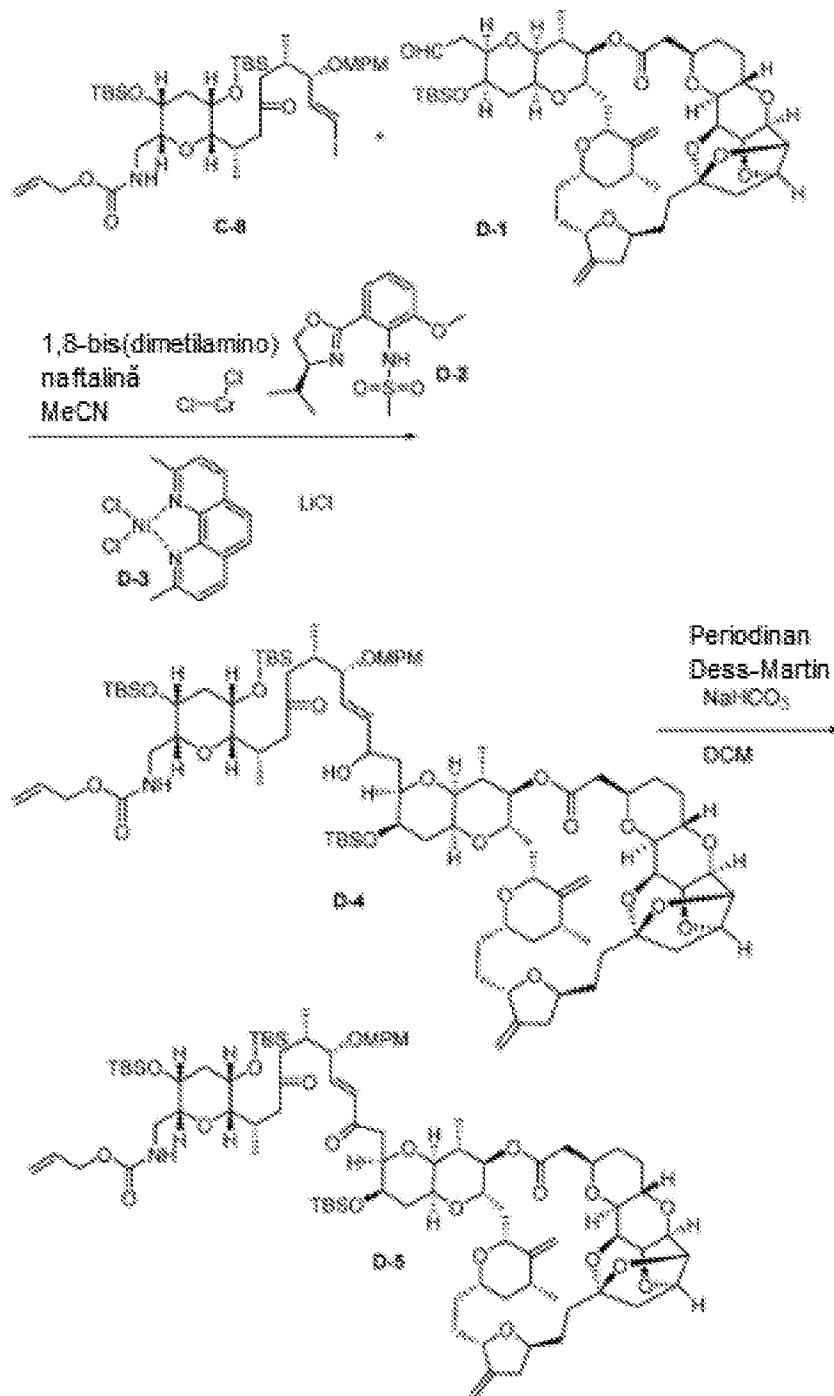
(((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxi benzil)oxi)-6-metil-4-oxonon-8-en-2-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)metil)carbammat (Compusul C-8)

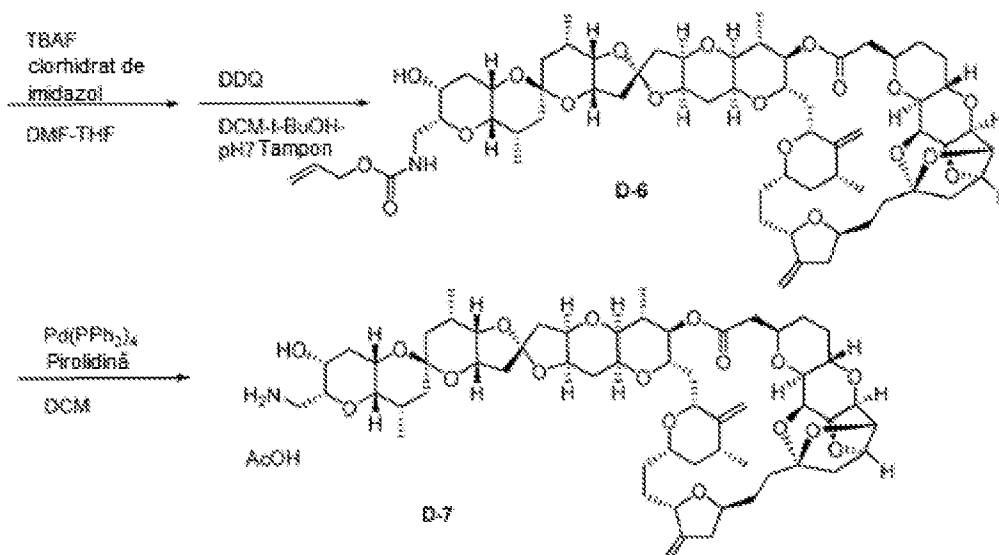


La o soluție de compus C-7: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(azidometil)-3,5-bis((*tert*-butildimetilsilil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metilnon-8-en-4-onă (298 mg, 0,37 mmoli) descrisă în Exemplul 15, în THF (10 mL) și apă (1,0 mL) la 20°C, a fost adăugată trifenilfosfină (1437 mg, 5,478 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la 70°C timp de 1,5 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat la presiune redusă pentru a se obține o amină brută. La o soluție de amină brută obținută mai sus, în THF (10 ml) la 5 °C, au fost adăugate Et₃N (0,51 mL, 3,66 mmoli) și dicarbonat de dialil (341 mg, 1,83 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 60 min. Amestecul de reacție a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduurilor pe silicagel utilizând 0% până la 25% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul C-8, 300 mg, randament 94%).

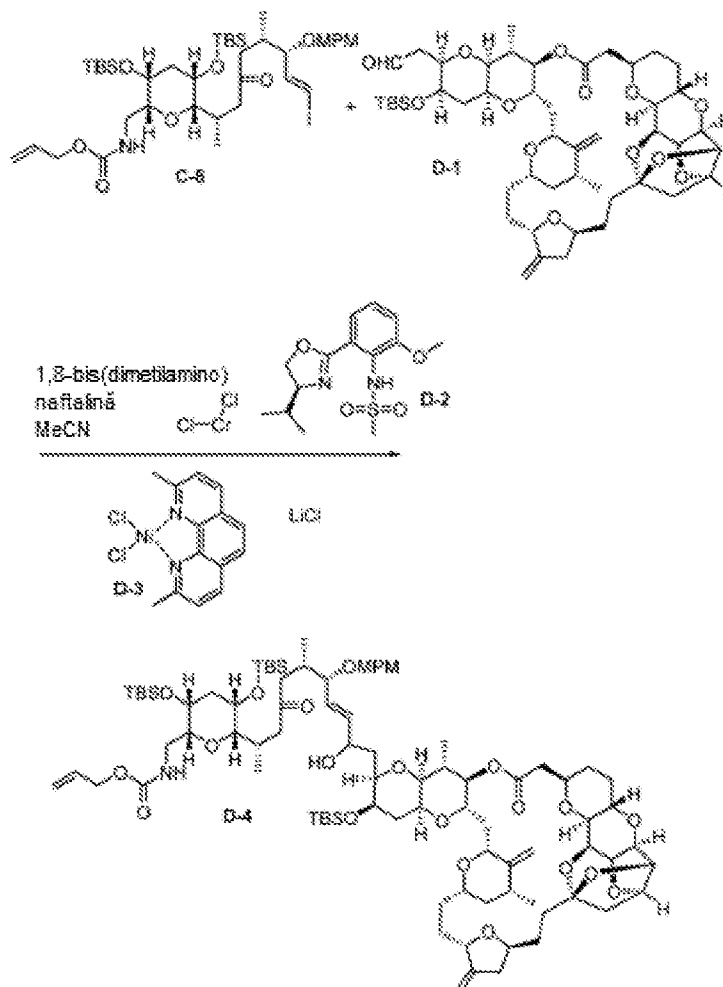
¹H RMN (500 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,05 - 0,07 (m, 9 H) 0,11 (s, 3 H) 0,85 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 0,87 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 0,90 (s, 9 H) 0,93 (s, 9 H) 1,80 (dt, J=15,0, 4,4 Hz, 1 H) 1,96 (dt, J=15,0, 2,8 Hz, 1 H) 2,16 - 2,29 (m, 2 H) 2,32 - 2,39 (m, 1 H) 2,53 - 2,60 (m, 3 H) 2,86 (d, J=7,3 Hz, 1 H) 3,04 - 3,11 (m, 1 H) 3,30 - 3,34 (m, 1 H) 3,38 - 3,48 (m, 1 H) 3,58 (t, J=7,1 Hz, 1 H) 3,70 - 3,76 (m, 1 H) 3,80 (s, 3 H) 3,81 - 3,84 (m, 1 H) 4,25 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,46 (d, J=11,2 Hz, 1 H) 4,53 - 4,63 (m, 2 H) 5,19 (dd, J=10,7, 1,5 Hz, 1 H) 5,32 (d, J=17,1 Hz, 1 H) 5,47 (d, J=6,8 Hz, 1 H) 5,88 - 5,99 (m, 1 H) 6,28 (d, J=14,6 Hz, 1 H) 6,43 (dd, J=14,6, 7,8 Hz, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,21 (d, J=8,8 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 896,34 [M+Na]⁺

Schema D: Prepararea Compusului D-7





Exemplul 17

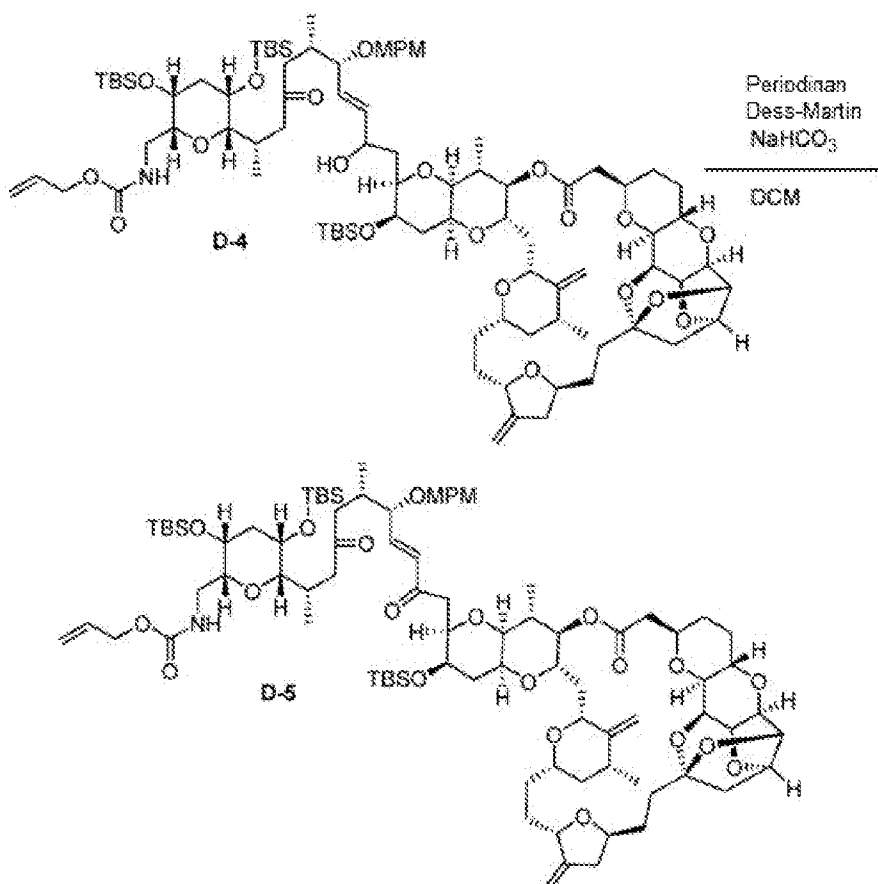
Compusul D-4

- 5 Într-o atmosferă de azot (într-o cameră izolată), la o soluție de compus D-2: (S)-N-(2-(4-izopropil-4,5-dihidroxazol-2-il)-6-metoxifenil)metansulfonamidă (155 mg, 0,497 mmoli) obținută prin metoda scrisă în Organic Letters (2002), 4 (25), 4431-4434 (Nr CAS; 546141-34-8), și 1,8-bis(dimetilamino)naftalină (107 mg, 0,497 mmoli) în MeCN (0,75 mL), a fost adăugată clorură de crom (II) (55,5 mg, 0,452 mmoli) și apoi amestecul rezultat a fost agitat în camera izolată la temperatura camerei timp de 1 oră. Soluția verde rezultată a fost adăugată la un amestec de compus C-8:
- 10

((2R,3R,5S,6S)-3,5-bis(*tert*-butildimetilsilil)oxi)-6-((2S,6S,7S,E)-9-iodo-7-((4-metoxibenzil)oxi)-6-metil-4-oxonon-8-en-2-il)tetrahidro-2H-piran-2-il)metil)carbamat de alil (99,0 mg, 0,113 mmoli) descris în exemplul 16, compus **D-1** (80,0 mg, 0,09 mmoli) obținut prin metoda scrisă în Journal of the American Chemical Society (1992), 114 (8), 3162-3164 (Nr CAS; 157322-23-1), Compus **D-3**: dicloro(2,9-dimetil-1,10-fenantrolină)nicel (0,46 mg, 1,36 μmoli) obținut prin metoda scrisă în Journal of the American Chemical Society (2009), 131(42), 15387 - 15393 (Nr CAS; 21361-04-6) și clorură de litiu (3,83 mg, 0,09 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat în camera izolată la temperatura camerei timp de 60 min. Amestecul de reacție a fost apoi scos din camera izolată, a fost diluat cu dietil eter-EtOAc (5,0 mL - 5,0 mL), apoi Florisil® (1600 mg, 15,94 mmoli) (Nr CAS; 1343-88-0) a fost adăugat la amestec. Apoi amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute. Amestecul a fost filtrat (Celite®), a fost spălat cu EtOAc/Heptan = 2/1, apoi filtratul a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 3% până la 55% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **D-4**, 140 mg, randament 95%).

Exemplul 18

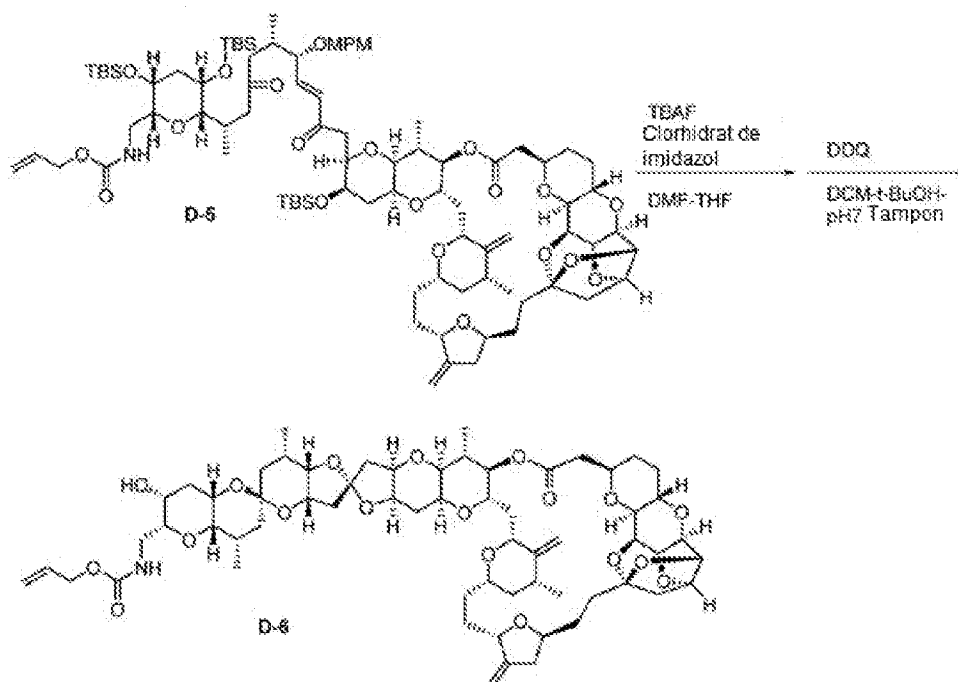
Compusul **D-5**



Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus **D-4** (140 mg, 0,09 mmoli) descrisă în Exemplul 17, în DCM (5,0 mL) la 5 °C, au fost adăugate NaHCO₃ (28,8 mg, 0,34 mmoli) și Periodinan Dess-Martin (72,7 mg, 0,17 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 60 min. Amestecul de reacție a fost diluat cu DCM și a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃ și cu soluție apoasă saturată de Na₂SO₃, și apoi straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM. Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție salină, au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel utilizând 2% până la 60% EtOAc/Heptan a condus la obținerea compusului din titlu (Compusul **D-5**, 120 mg, 86%).

¹H RMN (500 MHz, BENZENE-*d*₆) δ ppm 0,01 - 0,05 (m, 9 H) 0,10 - 0,12 (m, 6 H) 0,15 (s, 3 H) 0,76 (d, J=6,1 Hz, 3 H) 0,96 (s, 9 H) 1,02 (s, 9 H) 1,04 (s, 9 H) 0,95 - 1,10 (m, 7H) 1,20 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,31 - 1,37 (m, 3 H) 1,41 (dd, J=12,8, 4,9 Hz, 1 H) 1,40 - 1,58 (m, 4 H) 1,59 - 1,64 (m, 1 H) 1,69 - 1,89 (m, 3H) 1,90 - 1,99 (m, 2 H) 2,02 - 2,25 (m, 8 H) 2,26 - 2,48 (m, 6 H) 2,49 - 2,70 (m, 6 H) 2,71 - 2,84 (m, 2 H) 3,00 - 3,07 (m, 1 H) 3,12 - 3,30 (m, 4 H) 3,36 (s, 3 H) 3,40 (br.s, 1 H) 3,44 - 3,53 (m, 2 H) 3,65 (dd, J=6,4, 4,0 Hz, 1 H) 3,69 - 3,84 (m, 4H) 3,86 - 4,03 (m, 4H) 4,07 - 4,17 (m, 3 H) 4,27 - 4,29 (m, 1H) 4,27 (d, J=11,0 Hz, 1H) 4,48 - 4,58 (m, 1 H) 4,49 (d, J=11,0 Hz, 1H) 4,65 - 4,70 (m, 2 H) 4,68 (d,

J=5,5 Hz, 1H) 4,74 - 4,86 (m, 2H) 4,78 (s, 1H) 4,93 (s, 1 H) 5,05 (d, J=10,4 Hz, 1 H) 5,09 (s l., 1 H) 5,19 (s l., 1 H) 5,30 (dd, J=17,1, 1,2 Hz, 1 H) 5,82 (d, J=8,0 Hz, 1 H) 5,86 - 5,96 (m, 1 H) 6,46 (d, J=15,9 Hz, 1 H) 6,84 - 6,92 (m, 3 H) 7,31 (d, J=8,6 Hz, 2 H).

Exemplul 19**Compusul D-6**

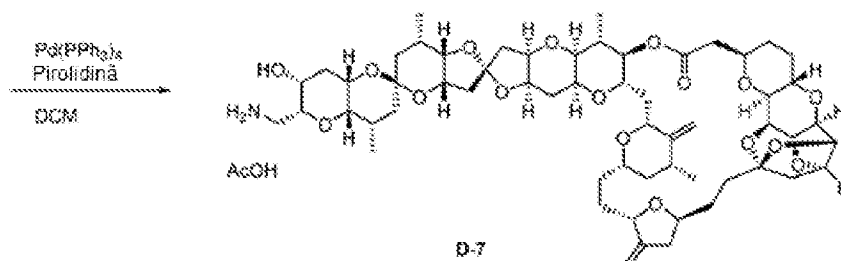
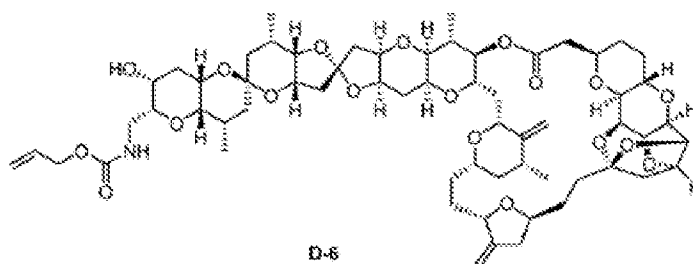
5

Clorhidrat de imidazol (155 mg, 1,48 mmoli) a fost dizolvat în DMF (2,9 mL) pentru a se obține o soluție de clorhidrat de imidazol 0,5 M în DMF. 1,0 mL din această soluție a fost amestecat cu 1,0 mL de TBAF (soluție 1,0 M, THF) pentru a se obține o soluție preamestecată de 0,5 M TBAF și clorhidrat de imidazol 0,25 M în THF-DMF (1:1). Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus **D-5** (80,0 mg, 0,05 mmoli) descris în Exemplul 18, în DMF (7,0 mL) la 20°C, au fost adăugați 0,588 mL de soluție preamestecată de TBAF (0,5 M) și clorhidrat de imidazol (0,25 M) în THF-DMF (1:1) preparată mai sus. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 14 ore. 1,6 g de CaCO₃ și 4,0 g de Dowex® 50WX8 au fost adăugate la amestecul de reacție (formă de hidrogen, 200-400 mesh, SIGMA-ALDRICH). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Apoi amestecul a fost diluat cu EtOAc, apoi a fost filtrat (Celite®), a fost spălat cu EtOAc. Filtratul a fost concentrat la presiune redusă pentru a se obține un reziduu brut. 1000 mg de CaCO₃ și 2,25 g de Dowex® 50WX8 au fost adăugate la soluția de EtOAc (6,0 mL) a reziduiului brut. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 2,5 ore. Apoi amestecul a fost diluat cu EtOAc, a fost filtrat (Celite®), a fost spălat cu EtOAc. Filtratul a fost concentrat la presiune redusă pentru a se obține un reziduu brut (63,0 mg). La o soluție de reziduu brut (63,0 mg) obținut mai sus, în DCM (6,0 mL), t-BuOH (0,6 mL) și tampon fosfat pH 7 (0,6 mL, 1/15 M) la temperatura camerei, a fost adăugat DDQ (111 mg, 0,49 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 45 min. Amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃, apoi a fost diluat cu DCM și straturile au fost separate. Stratul apos a fost extras cu DCM (de 3 ori). Extractele organice combinate au fost uscate pe Na₂SO₄, au fost filtrate și au fost concentrate la presiune redusă. Cromatografia rapidă a reziduiului pe silicagel NH folosind 10% până la 100% EtOAc/Heptan, apoi 10% MeOH/EtOAc a condus la obținerea un compus din titlu aproximativ purificat (Compusul **D-6**, 15,0 mg, 27%).

¹H RMN (500 MHz, METANOL-*d*₄) δ ppm 0,97 (d, J=7,0 Hz, 3 H) 0,97 (d, J=7,0 Hz, 3 H) 1,00 - 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,09 (d, J=6,3 Hz, 3 H) 1,31 - 1,45 (m, 6H) 1,46 - 1,63 (m, 5H) 1,64 - 1,75 (m, 3 H) 1,80 - 1,86 (m, 2 H) 1,87 - 1,93 (m, 2 H) 1,94 - 2,11 (m, 9H) 2,13 - 2,27 (m, 8H) 2,33 (d, J=2,4 Hz, 2 H) 2,39 (dd, J=13,4, 6,1 Hz, 1 H) 2,44 (dd, J=17,6, 2,0 Hz, 1 H) 2,55 (dd, J=17,6, 9,3 Hz, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,97 (dd, J=9,3, 2,0 Hz, 1 H) 3,21 (dd, J=6,6, 4,6 Hz, 1 H) 3,32 (m, 1 H) 3,41 - 3,46 (m, 1 H) 3,57 (s l., 1 H) 3,60 (d, J=11,7 Hz, 1 H) 3,67 - 3,74 (m, 2 H) 3,78 (s l., 1 H) 3,86 - 3,90 (m, 2 H) 3,97 (d, J=2,4 Hz, 1 H) 4,02 - 4,11 (m, 4 H) 4,17 (dd, J=6,6, 4,6 Hz, 1 H) 4,23 (dd, J=11,5, 2,2 Hz, 1 H) 4,29 (br.s, 1 H) 4,31 (td, J=9,3, 3,9 Hz, 1 H) 4,44 (d, J=10,2 Hz, 1 H) 4,51 (d, J=5,4 Hz, 2 H) 4,59 (t, J=4,9 Hz, 1 H) 4,61 (dd, J=7,3, 4,9 Hz, 1 H) 4,69 (t, J=4,6 Hz, 1 H) 4,80 (s, 1 H) 4,85 - 4,87 (m, 1 H) 5,01 (s, 1 H) 5,05 (s, 1 H) 5,16 (dd, J=10,7, 1,0 Hz, 1 H) 5,28 (dd, J=17,1, 2,0 Hz, 1 H) 5,92 (m, 1 H). ESI-MS (m/z): 1172,57 [M+Na]⁺

35

Exemplul 20

Compusul **D-7**

- Într-o atmosferă de azot, la o soluție de compus **D-6** (15,0 mg, 0,013 mmoli) descris în Exemplul 19, pirolidină (10,8 uL, 0,13 mmoli) în DCM (2,0 mL) la temperatura camerei, a fost adăugat tetrakis(trifenilfosfin)paladiu(0) (7,53 mg, 6,52 umoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 min. Amestecul de reacție a fost concentrat la presiune redusă. Cromatografia rapidă a rezidului pe silicagel NH utilizând 50% EtOAc/Heptan, apoi 0% până la 20% MeOH/EtOAc a condus la obținerea unui produs aproximativ purificat. Produsul aproximativ purificat obținut a fost purificat prin HPLC pentru a se obține compusul din titlu (**D-7**, 7,0 mg, 47%, timp de retenție = 13,8 min).

Condiții HPLC:

Coloană: YMC Pak Pro C18 (20 mm × 250 mm)

Lungime de undă de detectare: 200 nm

- 15 Temperatura coloanei: temperatura camerei

Faza mobilă: MeCN-apă (0,05% AcOH)

Debit: 8 ml/min

eluat:

MeCN/Apă 25% (izo, 2 min), apoi

- 20 MeCN/Apă 25% până la 60% (Gradient, 20 min)

- ¹H RMN (500 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 0,99 (d, J=6,7 Hz, 3 H) 1,00 - 1,03 (m, 1 H) 1,04 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,06 (d, J=7,3 Hz, 3 H) 1,10 (d, J=6,1 Hz, 3 H) 1,29 - 1,63 (m, 10 H) 1,65 - 1,78 (m, 3 H) 1,79 - 1,89 (m, 2 H) 1,92 - 2,12 (m, 10 H) 1,93 (s, 3 H) 2,13 - 2,36 (m, 9 H) 2,41 (dd, J=13,5, 6,1 Hz, 1 H) 2,45 (dd, J=17,6, 2,2 Hz, 1 H) 2,56 (dd, J=17,6, 9,8 Hz, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,98 (dd, J=9,8, 1,8 Hz, 1 H) 3,12 (dd, J=12,8, 3,7 Hz, 1 H) 3,22 (dd, J=6,4, 4,6 Hz, 1 H) 3,26 (dd, J=13,2, 7,8 Hz, 1 H) 3,39 (d, J=1,8 Hz, 1 H) 3,61 (d, J=12,8 Hz, 1 H) 3,63 - 3,68 (m, 2 H) 3,68 - 3,76 (m, 2 H) 3,81 - 3,94 (m, 3 H) 4,00 (d, J=2,5 Hz, 1 H) 4,03 - 4,15 (m, 4 H) 4,18 (dd, J=6,4, 4,6 Hz, 1 H) 4,25 (ddd, J=11,0, 4,3, 1,8 Hz, 1 H) 4,27 - 4,36 (m, 2 H) 4,46 (d, J=11,0 Hz, 1 H) 4,57 - 4,65 (m, 2 H) 4,70 (t, J=4,6 Hz, 1 H) 4,81 (d, J=1,2 Hz, 1 H) 5,02 (s 1, 1 H) 5,06 (d, J=1,8 Hz, 1 H). ESI-MS (m/z): 1066,96 [M+H]⁺, 1090,19 [M+Na]⁺

- 30 Compusul (1) (formă fără sare a compusului **D-7**): ¹H RMN (600 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 0,98 (d, J=7,2 Hz, 3 H) 1,00 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, J=6,8 Hz, 3 H) 1,09 (d, J=6,4 Hz, 3 H) 1,28 - 1,45 (m, 5 H) 1,46 - 1,59 (m, 4 H) 1,57 - 1,63 (m, 1 H) 1,65 - 1,71 (m, 1 H) 1,70 - 1,75 (m, 2 H) 1,79 - 1,86 (m, 2 H) 1,91 (dt, J=14,9, 3,1 Hz, 1 H) 1,94 - 2,11 (m, 8 H) 2,14 - 2,34 (m, 9 H) 2,39 (dd, J=13,2, 6,0 Hz, 1 H) 2,44 (dd, J=17,4, 1,9 Hz, 1 H) 2,56 (dd, J=17,6, 9,6 Hz, 1 H) 2,69 (dd, J=13,2, 4,2 Hz, 1 H) 2,79 (ddq, J=15,9, 7,6, 2,0 Hz, 1 H) 2,92 (dd, J=13,2, 8,3 Hz, 1 H) 2,97 (dd, J=9,6, 1,7 Hz, 1 H) 3,21 (dd, J=6,4, 4,9 Hz, 1 H) 3,29 (m, 1 H) 3,34 (dd, J=8,3, 4,15 Hz, 1 H) 3,58 (s l., 1 H) 3,60 (br.d, J=11,3 Hz, 1 H) 3,68 - 3,73 (m, 2 H) 3,80 (s l., 1 H) 3,84 - 3,90 (m, 2 H) 3,98 (d, J=2,3 Hz, 1 H) 4,03 - 4,13 (m, 4 H) 4,17 (dd, J=6,4, 4,9 Hz, 1 H) 4,24 (ddd, J=11,3, 4,5, 1,5 Hz, 1 H) 4,29 (dd, J=4,0, 1,9 Hz, 1

H) 4,32 (td, J=10,2, 4,2 Hz, 1 H) 4,44 (br. d, J=11,0 Hz, 1 H) 4,59 (t, J=4,5 Hz, 1 H) 4,62 (dd, J=7,4, 4,7 Hz, 1 H) 4,69 (t, J=4,7 Hz, 1 H) 4,80 (s l., 1 H) 4,87 (s, 1 H) 5,00 (s l., 1 H) 5,05 (br.d, J=1,1 Hz, 1 H).

ESI-MS (m/z): 1066,57 [M+H]⁺, 1088,55 [M+Na]⁺

Exemple de teste farmacologice

5 Informații generale

Compușii naturali ai halicondrinei și compușii modificați ai acestora sunt cunoscuți în literatură (vezi, *de ex.*, D. Uemura și colab. "Norhalicondrină A: o macrolidă polieterică antitumorală dintr-un burete de mare" J. Am. Chim. Soc., 107, 4796 (1985); Marc Litaudon și colab. "Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge Lissodendoryx sp." J. Org. Chem., 1997, 62, 1868-1871). Cu toate acestea, cele mai multe dintre ele nu sunt ușor disponibile. De exemplu, dr. Uemura și colab. au izolat 12,5 mg de halicondrină B, 35,0 mg de norhalicondrină A și 17,2 mg de homohalicondrină A din până la 600 kg de *Halicondria okadai* Kadota (vezi, *de ex.*, D. Uemura și colab. "Norhalicondrina A: o macrolidă polieterică antitumorală dintr-un burete marin" J. Am. Chim. Soc., 107, 4796 (1985)). Dintre compușii naturali Halicondrină, Halicondrina B prezintă cele mai puternice activități anti-tumorale *in vitro* împotriva celulelor de melanom B-16, și este foarte activ împotriva Leucemiei L-1210 *in vivo* (Vezi, *de ex.*, D. Uemura și colab. "Norhalicondrină A: o macrolidă polieterică antitumorală dintr-un burete marin" J. Am. Chim. Soc., 107, 4796 (1985)). Halicondrina C este, de asemenea, activă *in vivo* în diverse modele, dar este instabilă în soluție apoasă, în comparație cu Halicondrina B. Norhalicondrina B este mult mai slabă decât Halicondrina B nu numai *in vitro* dar și *in vivo*. Vezi, *de ex.*, D. Uemura și colab. "Norhalicondrin A: o macrolidă polieterică antitumorală dintr-un burete marin" J. Am. Chim. Soc., 107, 4796 (1985)). Următoarele teste farmacologice utilizează Halicondrină B (Hali-B) ca compuși de referință, după cum este necesar.

Exemplul 1 de Testare Farmacologică. Test de inhibare a creșterii FaDu

În acest test, a fost măsurată activitatea de inhibare a creșterii de către compușii de testare într-o linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN). Celule FaDu au fost menținute într-un mediu RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 187-02021) care conține 10% ser fetal bovin (FBS: Nichirei, 12D168) și penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu dintr-o placă cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 75 μL de suspensie de celule FaDu ajustate cu mediu de cultură la o concentrație de 4×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 25 μL de compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrația de compus de testare necesară pentru inhibarea cu 50% a creșterii celulare (*adică*, o valoare IC₅₀) a fost calculată și arătată în Tabelul 1.

Tabelul 1

| | FaDu |
|---------------------|-------------------------|
| Compusul de testare | (IC ₅₀ (nM)) |
| Halicondrină B | 0,124 |
| Compus (1) | 0,0714 |

40

Exemplul 2 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii MDA-MB231

În acest test, a fost măsurată activitatea de inhibare a creșterii de către compușii de testare într-o linie celulară de cancer mamar uman MDA-MB231. Celule MDA-MB231 au fost menținute în mediu Dulbecco's Modified Eagle (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 044-29765), mediu care conține 10% ser fetal bovin (FBS: Nichirci, 12D168) și penicilină și streptomycină, într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu dintr-o placă cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 75 μL de suspensie de celule MDA-MB231 ajustați cu mediu de cultură la o concentrație de 4×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 25 μL de compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrația de compus de

50

testare necesară pentru inhibarea cu 50% a creșterii celulare (*adică*, o valoare IC_{50}) a fost calculată și arătată în **Tabelul 2**.

Tabelul 2

| | MDA-MB231 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Compusul de testare | (IC_{50} (nM)) |
| Halicondrină B | 1,000 |
| compus (1) | 0,109 |

Exemplul 3 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii HCC1954

5 În acest test, a fost măsurată activitatea de inhibare a creșterii de către compușii de testare într-o linie celulară de cancer mamar uman HCC1954. Celule HCC1954 au fost menținute într-un mediu RPMI-1640 modificat pentru a conține L-glutamină 2 mM, HEPES 10 mM, piruvat de sodiu 1 mM, 4500 mg/L de glucoză și 1500 mg/L de bicarbonat de sodiu (ATCC 30-2001) care conține 10% ser fetal bovin (FBS: Nichirei, 12D168) și penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO_2 (37 °C). În fiecare godeu al
10 unei plăci cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 75 μ L de suspensie de celule HCC1954 ajustați la o concentrație de 4×10^4 celule/mL cu mediu de cultură, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO_2 (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 25 μ L de compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori., și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO_2 (37 °C). Apoi,
15 viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrația de compus de testare necesară pentru inhibarea cu 50% a creșterii celulare (*adică*, o valoare IC_{50}) a fost calculată și arătată în **Tabelul 3**.

Tabelul 3

| | HCC1954 |
|----------------------------|------------------------------------|
| Compusul de testare | (IC_{50} (nM)) |
| Halicondrină B | 0,154 |
| Compus (1) | 0,0668 |

Exemplul 4 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale în monoterapie în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată la șoareci

25 O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de $4,8 \times 10^7$ celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 7 săptămâni (CAN.N.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). La nouă zile după inocularea celulelor, au fost măsurate la fiecare șoarece
30 diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (șubler Digimatic™, Mitutoyo Corporation), astfel încât să fie calculat volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$35 \text{ Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$40 \text{ Regresia tumorii (\%)} = (1 - \text{RTV minim}) \times 100$$

Pe baza volumelor de tumori obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii să fie substanțial egale între grupuri. Fiecare compus de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată la congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu soluție salină cu 100 μ M de hidroxipropil-P-ciclodextrină.
45 Fiecare probă de evaluare a fost administrată intravenos la o doză maximă tolerabilă (MTD). De altfel, experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 4 șoareci. Regresia tumorii (%) cu fiecare compus de testare a fost arătată în **Tabelul 4**.

Tabelul 4

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Regresia tumorii (%) |
|---------------------|--------------|----------------------|
| Halicondrină B | 0,05 | 0 |
| compus (1) | 0,2 | 43 |

Exemplul 5 de Testare Farmacologică. Activitate antitumorală a monoterapiei împotriva OSC-19 în modelul de xenogrefă subcutanată la șoareci

5 O linie celulară OSC-19 de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care
fusesse cultivată într-un mediu DMEM/Ham's F-12 (1:1) care conținea 10% FBS și penicilină și
streptomycină, a fost ajustată cu PBS la o concentrație de 1×10^8 celule/ml pentru a prepara o suspensie
celulară, și suspensia a fost amestecată cu Matrigel™ (BD Bioscience, #366237) într-un raport de 1:1
10 pentru a prepara o suspensie celulară într-o concentrație de 5×10^7 celule/ml. Suspensia celulară a fost
inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de
5 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La șase zile
după inocularea celulelor, au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai
mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation),
astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

15

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

20

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$\text{Regresia tumorii (\%)} = (1 - \text{RTV minim}) \times 100$$

25

Pe baza volumelor de tumori obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel
încât mediile volumelor tumorii să fie substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe
grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în soluție salină și a fost
administrat intravenos la doze de la 0,06 mg/kg până la 0,18 mg/kg o dată pe săptămână timp de 2
săptămâni (schema Q7D x 2). Regresia tumorii (%) cu fiecare doză de testare este arătată în Tabelul 5.

Tabelul 5

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Regresia tumorii (%) |
|---------------------|--------------|----------------------|
| compus (1) | 0,06 | 59 |
| Compus (1) | 0,18 | 90 |

30

Exemplul 6 de Testare Farmacologică. Activitate antitumorală a monoterapiei împotriva HCC1806 în modelul de xenogrefă subcutanată la șoareci

O linie de celule de cancer mamar uman HCC1806, care fusesse cultivată într-un mediu RPMI-
1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu PBS la o concentrație de $1 \times$
10⁸ celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară, și suspensia a fost amestecată cu Matrigel™ (BD
35 Bioscience, #366237) într-un raport de 1:1 pentru a prepara o suspensie celulară într-o concentrație de $5 \times$
10⁷ celule/ml. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a
coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 5 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles
River Laboratories Japan, Inc.). La douăsprezece zile după inocularea celulelor, au fost măsurate la
fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital
40 electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în
conformitate cu următoarele formule de calcul:

45

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$\text{Regresia tumorii (\%)} = (1 - \text{RTV minim}) \times 100$$

50

Pe baza volumelor de tumori obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel
încât mediile volumelor tumorii să fie substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe
grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în soluție salină și a fost

administrat intravenos la 0,18 mg/kg o dată pe săptămână timp de 2 săptămâni (schema Q7D x 2). Regresia tumorii (%) cu compusul (1) este arătată în **Tabelul 6**.

Tabelul 6

| Compusul de testare | Doza (mg/kg) | Regresia tumorii (%) |
|---------------------|--------------|----------------------|
| compus (1) | 0,18 | 90 |

5 **Exemplul 7 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale ale combinație cu cetuximab în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată la șoareci**

10 O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 7 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrIcrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$Volumul\ tumorii\ (mm^3) = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$20\ \text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$\text{Regresia tumorii (\%)} = (1 - \text{RTV minim}) \times 100$$

25 Pe baza volumelor de tumori obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii să fie substanțial egale între grupuri. Fiecare compus de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată la congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu soluție salină cu 100 μ M de hidroxipropil-P-ciclodextrină. Fiecare compus de testare a fost administrat intravenos în doze de la 1/4 MTD până la 1/2 MTD în combinație cu cetuximab (Erbix, Merck Serono Co., Ltd.). De altfel, experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 4 șoareci. Regresia tumorii (%) în ziua 35 cu fiecare compus de testare este arătată în **Tabelul 7**.

Tabelul 7

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Cetuximab (mg/kg) | Regresia tumorii în ziua 35 (%) |
|---------------------|--------------|-------------------|---------------------------------|
| - | - | 20 | -242 |
| Halicondrină B | 0,0125 | 20 | -38 |
| | 0,025 | 20 | -2 |
| compus (1) | 0,05 | 20 | 38 |
| | 0,1 | 20 | 60 |

35 **Exemplul 8 de Testare Farmacologică. Activitatea antitumorală a combinației cu trastuzumab în modelul de xenogrefă KPL-4 subcutanată la șoareci**

40 O linie celulară KPL-4 de cancer mamar uman HER-2 pozitiv, care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată la o concentrație de 1×10^8 celule/mL cu soluție de sare echilibrată Hank pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 7 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrIcrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La șaisprezece zile după inocularea celulelor, au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$45\ \text{Volumul tumorii (mm}^3) = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$Volumul\ relativ\ al\ tumorii\ (RTV) = Volumul\ tumorii\ (ziua\ X) / Volumul\ tumorii\ (prima\ zi)$

$Regresia\ tumorii\ (%) = (1 - RTV\ minim) \times 100$

5

Pe baza volumelor de tumori obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii să fie substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Fiecare compus de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată la congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare a fost administrat intravenos la 0,09 mg/kg sau 0,18 mg/kg în combinație cu trastuzumab (Herceptin, Genentech, Inc.). Regresia tumorii cu compusul (1) este arătată în **Tabelul 8**.

10

Tabelul 8

| Compusul de testare | Doza (mg/kg) | Trastuzumab (mg/kg) | Regresia tumorii (%) |
|---------------------|--------------|---------------------|----------------------|
| - | - | 10 | 0 |
| compus (1) | 0,09 | - | 43 |
| | 0,09 | 10 | 83 |
| | 0,18 | - | 87 |
| | 0,18 | 10 | 100 |

15

Exemplul 9 de Testare Farmacologică. Efectul asupra vaselor CD31-pozitiv în modelul de FaDu subcutanat la șoareci

O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu PBS la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 7 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, un compus de testare în soluție salină cu 100 μ m de hidroxipropil-P-ciclodextrină a fost administrat intravenos la doze de la 1/2 MTD până la MTD. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 3 șoareci. La cinci zile după administrare, probele de tumoare au fost colectate și fixate cu fixator de zinc IHC (BD Pharmingen) la 4 °C timp de 24 de ore. Țesuturile încorporate în parafină au fost secționare (3 μ m), au fost montate pe lamele încărcate pozitiv și au fost uscate în aer. Colorația imunohistochimică a CD31 a fost efectuată utilizând modelul de colorare automată Ventana Discover XT (Roche Diagnostics), conform protocolului producătorului. Secțiunile au fost deparafinizate, au fost condiționate, și antigenii au fost recuperați cu CCI (Ventana Medical Systems). Lamelele au fost blocate cu Blocker A și Blocker B (kit de blocare a biotinei endogene, Roche Diagnostics). Anticorpul IgG CD31 de șobolan anti-șoarece (Dianova GmbH) a fost aplicat la 2 μ g/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorpul timp de 6 ore, urmată de incubare timp de 32 de minute cu anticorp IgG anti-șobolan biotilnat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) la 2,2 μ g/mL. Detectarea a fost efectuată cu Streptavidin-HRP D timp de 16 minute, urmată de incubare cu DAB D și DAB H₂O₂ D (kit DABMap, Ventana Medical Systems, Inc) timp de 8 min. Lamelele au fost contracolorate cu Hematoxilină II (Roche Diagnostics) timp de 16 minute, urmată de incubare cu reactiv Blueing timp de 4 minute. Secțiunile au fost deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen înlocuit, și au fost acoperite cu DPX (Merck KGaA).

25

30

35

40

45

Lamelele imunocolorate au fost scanate utilizând Sistemul de imagistică automatizată Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Numărul de vase de sânge din întreaga tumoare a fost cuantificat prin numărarea elementelor CD31-pozitive folosind software-ul inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Aria regiunii tumorale a fost măsurată prin evaluarea zonei de colorare cu hematoxilină folosind software-ul inForm 2 (PerkinElmer Inc.) Numărul de vase de sânge a fost normalizat cu aria regiunii tumorale. O rată de creștere a numărului de vase de sânge din grupul cu administrare a compusului de testare a fost calculată cu formula de mai jos și este arătată în **Tabelul 9**.

$Creșterea\ ratei\ numărului\ de\ vase\ de\ sânge\ (%) = ((numărul\ de\ vase\ de\ sânge\ din\ grupul\ cu\ administrare\ a\ compusului\ de\ testare - numărul\ de\ vase\ de\ sânge\ din\ grupul\ de\ control) / numărul\ de\ vase\ de\ sânge\ din\ grupul\ de\ control) \times 100$

50

Tabelul 9

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Creșterea ratei numărului de vase de sânge (%) |
|---------------------|--------------|--|
| Halicondrină B | 0,025 | 31 |
| | 0,05 | 39 |
| compus (1) | 0,10 | 69 |
| | 0,20 | 154 |

Exemplul 10 de Testare Farmacologică. Efectul asupra CAF-urilor în α -SMA pozitiv în modelul FaDu subcutanat

5 O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care
 fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost
 ajustată cu PBS la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia
 celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui
 10 nud, cu vârsta cuprinsă între 5 și 6 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlmu/CrlCrlj, femelă, Charles River
 Laboratories Japan, Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, un compus de testare în soluție salină cu
 100 μ M de hidroxipropil-p-ciclodextrină a fost administrat intravenos la 1/2 MTD și la MTD.
 Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 3 șoareci. La două zile după administrare,
 probele tumorale au fost colectate și fixate cu fixator de zinc IHC (BD Pharmingen) la 4 °C timp de 24 de
 15 ore. Țesuturile încorporate în parafină au fost secționare (3 μ m), au fost montate pe lamele încărcate
 pozitiv și au fost uscate în aer timp de 6 ore. Colorarea imunohistochimică a α -SMA a fost efectuată
 utilizând modelul de colorare automată Ventana Discover XT (Roche Diagnostics). Secțiunile au fost
 deparafinizate, au fost condiționate, și antigenii au fost extrași cu tampoane brevetate, EZPrep și CC1
 (Ventana Medical Systems). Anticorpul monoclonal anti- α -SMA de șoarece conjugat cu fosfatază
 20 alcalină (clona 1A4, Sigma) a fost aplicat la 5 μ g/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorpul timp de 6
 ore. Detectarea a fost efectuată cu kitul RedMap (Ventana Medical Systems, Inc). Secțiunile au fost
 deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen înlocuit, și au fost acoperite cu DPX (Merck
 KGaA). Lamelele cu tumori în serie au fost deparafinate și colorate cu hematoxilină Mayer (Muto Pure
 Chemicals) timp de 1 min. Secțiunile au fost deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen
 înlocuit, și au fost acoperite cu DPX (Merck KGaA).

25 Lamelele imunocolorate au fost scanate utilizând Sistemul de imagistică automatizată Vectra 2
 (Perkin Elmer Inc.). Aria regiunii α -SMA-pozitive din întreaga tumoare a fost cuantificată prin numărarea
 elementelor α -SMA-pozitive folosind software-ul inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Aria regiunii tumorale a
 fost măsurată prin evaluarea ariei de colorare cu hematoxilină, utilizând software-ul inForm 2
 (PerkinElmer Inc.). Aria regiunii α -SMA pozitive a fost normalizată cu aria regiunii tumorale. O rată de
 30 suprimare a ariei α -SMA pozitive din grupul cu administrare a compusului de testare a fost calculată cu
 formula de mai jos și este arătată în Tabelul 10.

Tabelul 10

| Compusul de testare | Doza (mg/kg) | Rata de suprimare a ariei α -SMA pozitive (%) |
|---------------------|--------------|--|
| Halicondrină B | 0,025 | 7 |
| | 0,05 | 3 |
| compus (1) | 0,10 | 21 |
| | 0,20 | 28 |

35
$$\text{Rata de suprimare a ariei } \alpha\text{-SMA pozitive (\%)} = - ((\text{aria } \alpha\text{-SMA pozitiv din grupul cu administrare a compusului de testare} - \text{aria } \alpha\text{-SMA pozitiv din grupul de control}) / \text{aria } \alpha\text{-SMA pozitiv din grupul de control}) \times 100$$

Exemplul 11 de Testare Farmacologică. Model de șoarece cu transplant ortotopic HSC-2

40 Celule HSC-2-Luc transduse cu luciferază au fost stabilite prin transfer de genă mediat de
 retrovirus. Mai întâi, fragmentul de ADN care codifică luciferaza de licurici a fost obținut din plasmida de
 amplificare pGL3 (GenBank#:U47297) și a fost subclonat în vectorul retroviral pCX4pur (GenBank#:
 AB086386). Apoi, retrovirusuri recombinare fără ajutor au fost produse prin transfectarea vectorului de
 expresie retroviral de mai sus împreună cu plasmide pGP și pE-Ampho (Takara Bio; Shiga, Japonia), în
 celule 293T (ATCC; Manassas, SUA). Apoi, celule HSC-2 au fost infectate cu retrovirusuri recombinare

și au fost cultivate timp de două săptămâni în prezența puromicinei (2 µg/mL). Celulele infectate au fost selectate dintr-o populație proliferativă policlonală a culturii.

Sub anestezie, linia celulară SCCHN umană, HSC-2-Luc, a fost inoculată în limba șoarecilor nuzi femele (1×10^6 celule în 50 uL de PBS) cu vârstă de 6 săptămâni (șoareci CANN.Cg-Foxnlmu/CrlCrlj; Charles River, Inc.; Shizuoka, Japonia). La șapte zile după transplant, volumul tumorii a fost analizat utilizând semnalul de bioluminescență de la celulele HSC-2-Luc. Pentru imagistică de bioluminescență, 0,1 ml de 15 mg/ml D-luciferină (Promega, Madison, WI) a fost injectat intraperitoneal în șoareci nuzi sub anestezie prin inhalare de izofluran 1% până la 2%. Semnalul de bioluminescență a fost monitorizat utilizând seria IVIS SPECTRUM (PerkinElmer, Waltham, MA), constând dintr-o cameră cu dispozitiv cuplată cu încărcare, răcită, foarte sensibilă. Software-ul Living Image (PerkinElmer, Waltham, MA) a fost utilizat pentru a reda datele imagistice și pentru a integra semnalul de bioluminescență totală în fiecare regiune de interes (ROI). Toate imaginile de bioluminescență au fost achiziționate cu o expunere de 1 secundă. Datele au fost analizate utilizând emisie totală de flux de fotoni (fotoni/secundă) în ROI.

Pe baza emisiei totale de flux de fotoni obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile emisiei totale de flux de fotoni au fost substanțial egale între grupuri. Compusul (1) sau cisplatină a fost administrată intravenos cu sau fără cetuximab (Erbix, Merck Serono Co., Ltd.) o dată pe săptămână timp de 3 săptămâni (schema Q7D×3). Două experimente au fost efectuate folosind procedura identică, și toate datele au fost colectate din experimente. Fiecare grup a fost format din 16 șoareci.

Datele imagistice au arătat că numai tratamentul cu compusul (1) și cu cetuximab a redus în mod clar semnalul de bioluminescență la toți șoarecii după Ziua 14 (Figura 6A-6B). Timpul mediu de supraviețuire (MST) a fost calculat pentru fiecare grup de tratament ca mediană a zilelor decesului. Creșterea duratei de viață (ILS) a fost calculată prin următoarea formulă: $ILS (\%) = (MST \text{ al animalelor tratate cu Compusul de testare} - MST \text{ al animalelor de control}) / MST \text{ al animalelor de control} \times 100$. ILS (%) cu fiecare compus de testare este arătat în Tabelul 11.

Tabelul 11

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Cetuximab (mg/kg) | ILS (%) |
|---------------------|--------------|-------------------|---------|
| - | - | 5 | 231 |
| Cisplatină | 5 | - | 0 |
| | 5 | 5 | 150 |
| compus (1) | 0,09 | - | 238 |
| | 0,09 | 5 | >1150 |

Exemplul 12 de Testare Farmacologică. Model de xenogrefă FaDu s.c. în combinație cu radiații

Celule FaDu-Luc transduse cu luciferază au fost stabilite prin transfer de genă mediat de retrovirus. În primul rând, fragmentul de ADN care codifică luciferaza de licurici a fost obținut din plasmida de amplificare pGL3 (GenBank#:U47297) și a fost subclonat în vectorul retroviral pCX4pur (GenBank#: AB086386). Apoi, retrovirusuri recombinat fără ajutor au fost produse prin transfectarea vectorului de expresie retroviral de mai sus împreună cu plasmide pGP și pE-Ampho (Takara Bio; Shiga, Japonia), în celule 293T (ATCC; Manassas, SUA). Apoi, celulele FaDu au fost infectate cu retrovirusuri recombinat și au fost cultivate timp de două săptămâni în prezența puromicinei (2 µg/mL). Celulele infectate au fost selectate dintr-o populație proliferativă policlonală a culturii.

O linie celulară SCCHN umană transdusă cu luciferază FaDu-Luc, care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hank la o concentrație de 5×10^7 celule/mL pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată într-un volum de 100 µL într-o parte subcutanată a coapsei drepte a șoarecilor nuzi, în vârstă de 6 săptămâni (CANN.Cg-Foxnlmu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La treisprezece zile după inocularea celulelor, volumul tumorii a fost analizat utilizând semnalul de bioluminescență de la celulele FaDu-Luc. Pentru imagistica de bioluminescență, 0,1 ml de 15 mg/ml D-luciferină (Promega, Madison, WI) a fost injectat intraperitoneal în șoareci nuzi sub anestezie prin inhalare de izofluran 1% până la 2%. Semnalul de bioluminescență a fost monitorizat utilizând seria IVIS SPECTRUM (PerkinElmer, Waltham, MA), constând dintr-o cameră cu dispozitiv cuplată cu încărcare, răcită, foarte sensibilă. Software-ul Living Image (PerkinElmer, Waltham, MA) a fost utilizat pentru a reda datele imagistice și pentru a integra semnalul de bioluminescență totală în fiecare regiune de interes (ROI). Toate imaginile de bioluminescență au fost achiziționate cu o expunere de 1 secundă. Datele au fost analizate utilizând emisia totală de flux de fotoni (fotoni/secundă) în ROI. Emisia totală de flux de fotoni a fost calculată în conformitate cu următoarele formule de calcul:

Nivel de bioluminescență relativă = Emisia totală de flux de fotoni (ziua X)/Emisia totală de flux de fotoni (prima zi)

Regresia tumorii (%) = (1 - Nivel minim de bioluminescență relativă) x 100

5

Pe baza emisiei totale de flux de fotoni obținute în prima zi de administrare, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile emisiei totale de flux de fotoni să fie substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Compusul (1) a fost administrat prin injecție în vena cozii în zilele 1 și 8. Iradierea a fost efectuată 18 Gy în ziua 4 și în ziua 11. Regresia tumorii cu compusul (1) este arătată în Tabelul 12.

10

Tabelul 12

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Radiații (Gy) | Regresia tumorii (%) |
|---------------------|--------------|---------------|----------------------|
| - | - | 18 | 16 |
| compus (1) | 0,09 | - | 0 |
| | 0,09 | 18 | 97 |

Exemplul de Testare Farmacologică 13. Activitate antitumorală în modelul identic genetic subcutanat CT26 în combinație cu anticorp anti-mPD-1 la șoareci

15

O linie celulară de carcinom de colon murin nediferențiat CT26, care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină și streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hank la o concentrație de 2×10^7 celule/mL pentru a prepara o suspensie celulară. În ziua 1, suspensia celulară a fost inoculată într-un volum de 100 μ L într-o parte a flancului drept al șoarecelui BALB/c cu vârsta de 6 săptămâni (BALB/cAnNCrIrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La două zile după inocularea celulelor, șoarecii au fost împărțiți aleatoriu în patru grupuri, și fiecare grup este format din 8 șoareci. Au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarea formulă de calcul:

20

$Volumul\ tumorii\ (mm^3) = Diametrul\ cel\ mai\ mare\ (mm) \times diametrul\ cel\ mai\ mic\ (mm) \times diametrul\ cel\ mai\ mic\ (mm)/2$

$T/C = (volumul\ mediu\ al\ tumorii\ în\ grupul\ tratat)/(volumul\ mediu\ al\ tumorii\ în\ grupul\ de\ control)$

25

$Inhibarea\ creșterii\ tumorii\ (%) = (1 - T/C) \times 100$

30

Compusul de testare a fost administrat intravenos la 0,09 mg/kg în zilele 3 și 11. Anticorp anti-mPD-1 (BE0146, Bio X Cell) a fost administrat intravenos la 10 mg/kg în zilele 3, 7, 11 și 15. Inhibarea creșterii tumorii în ziua 15 (%) cu fiecare compus de testare este arătată în Tabelul 13.

Tabelul 13

| Compusul de testare | Doză (mg/kg) | Anticorp anti-mPD-1 (mg/kg) | Inhibarea creșterii tumorii în ziua 15 (%) |
|---------------------|--------------|-----------------------------|--|
| - | - | 10 | 32 |
| compus (1) | 0,09 | - | 30 |
| | 0,09 | 10 | 62 |

35

Exemplul 14 de Testare Farmacologică. Efectul *in vitro* asupra polimerizării tubulinei (Figura 10A)

40

Kitul de testare a polimerizării tubulinei a fost achiziționat de la Cytoskeleton, Inc. (Cat. # BK011P). Kitul a conținut 1 sticlă de proteină tubulină liofilizată purificată din creier de porc, 3 tuburi de GTP liofilizat, 2 sticle de tampon de analiză liofilizat și 1 sticlă de tampon de tubulină glicerol. Tamponul de testare a fost preparat prin dizolvarea conținutului în 10 ml de apă deionizată și sterilizată. Această soluție conține 80 mmol/L de sare de sesquisodiu piperazină-*N,N'*-bis[acid 2-etansulfonic], 2,0 mmol/L de clorură de magneziu, 0,5 mmol/L de acid etilenglicol-bis(2-amino-etil eter) *N,N,N',N'*-tetra-acetic, pH 6,9 și 10 μ mol/L de reporter de fluorescență. Tamponul a fost depozitat la -70 °C până la utilizare. Tamponul tubulină glicerol a constat din 80 mmol/L de sare de sesquisodiu-piperazină *N,N'*-bis[acid 2-etansulfonic], 2,0 mmol/L de clorură de magneziu, 0,5 mmol/L de acid etilenglicol-bis(2-amino-etil eter) *N,N,N',N'*-tetra-acid și glicerol 60% v/v, pH 6,9. A fost depozitat la 4 °C până la utilizare. Soluția stoc de GTP a fost preparată prin dizolvarea conținutului fiecărui tub în 100 μ L de apă deionizată și sterilizată pentru a se obține o concentrație de 100 mmol/L de GTP. Alicote din acest stoc au fost depozitate la -70 °C până la

45

utilizare. Soluția stoc de tubulină (10 mg/mL) a fost preparată prin dizolvarea pulberii de tubulină, adăugând 1,1 ml de amestec de tampon de testare și soluție stoc de GTP (100:1, v/v). Alicotele au fost congelate în azot lichid și apoi au fost depozitate la -70 °C până la utilizare.

În testul de polimerizare a tubulinei, amestecul de reacție a fost preparat prin amestecarea a 820 μL de tampon de analiză, 17,6 μL de soluție stoc GTP și 600 μL de tampon de tubulină glicerol. Amestecul de reacție (1015 μL) a fost combinat cu 240 μL de soluție stoc de tubulină. Această soluție a fost numită amestec de reacție cu tubulină și a fost utilizată pentru măsurarea godeurilor de testare și de control. Niciun amestec de reacție cu tubulină nu a fost preparat prin amestecarea a 89,85 μL de amestec de reacție și 21,25 μL de tampon de testare pentru măsurarea godeurilor de control. Soluție de compus (1) (6,25-100 μmol/L; concentrații finale 0,625-10 μmol/L) sau vehicul a fost adăugat la 5 μL în godeurile individuale ale unei plăci de microtitrare cu jumătate din suprafață având 96 de godeuri. Amestecul de reacție cu tubulină sau niciun amestec de reacție cu tubulină a fost adăugat la 45 μL în fiecare godeu al plăcii. Emisia de fluorescență la 460 nm (lungime de undă de excitare la 360 nm) a fost măsurată la fiecare 2 minute timp de 90 de minute folosind Cititorul de microplăci SpectraMax[®] M5e (Dispozitive moleculare). Polimerizarea tubulinei a fost urmată de îmbunătățirea fluorescenței datorită încorporării unui reporter de fluorescență în microtubuli pe măsură ce a avut loc polimerizarea. Testul a fost efectuat în dublu exemplar. Testul a demonstrat că Compusul (1) a inhibat polimerizarea tubulinei într-o manieră dependentă de concentrație. Intensitatea fluorescenței la fiecare moment de timp a fost calculată prin următoarele formule:

20

Intensitatea fluorescenței = măsurătoarea fluorescenței medii a godeurilor de testare sau a godeurilor de control - măsurătoarea fluorescenței medii a godeurilor goale; godeuri goale: cu vehicul fără tubulină; godeuri de control: cu vehicul și cu tubulină; godeuri de testare: cu compus și tubulină

25 **Exemplul 15 de Testare Farmacologică. Testul dinamicii microtubulilor pe bază de celule (Figura 10B)**

Un test de dinamică a microtubulilor (MT) pe bază de celule a fost efectuat cu linia celulară de osteosarcom U2OS-EB3-AG, în care proteina de fuziune a EB3 (un microtubul plus proteină de legare la capăt) și Azami-Green (EB3-AG) a fost exprimată stabil. Celule U2OS-EB3-AG au fost cultivate în mediu RPMI-1640 care conține 10% FBS și penicilină-streptomycină, la 37 °C într-o atmosferă umidificată de 5% CO₂. Dinamica MT în celulele vii poate fi vizualizată ca mișcare a structurilor asemănătoare cometei a EB3-AG. Celule U2OS-EB3-AG placate pe plăci de cultură pe bază de sticlă (placă EZVIEW, AGC Techno Glass, Japonia) au fost tratate cu compus (1) la concentrația indicată, și dinamica microtubulilor a fost monitorizată prin imagini la intervale de timp, folosind un microscop cu lentila obiectivului cu mărire de 60 de ori imersată în ulei (BZ-X710, KEYENCE, Japonia). Imaginile statice la momentele de timp indicate au fost prezentate în Figura 10B. Vederi cu o mărire mai mare ale zonelor încadrate au fost afișate la admisie. Atunci când este tratat cu compus (1) la 0,5 nM (valoare IC₅₀ pentru activitatea antiproliferativă în celulele U2OS-EB3-AG), structurile asemănătoare cometei au devenit greu de observat la aproximativ 60 de minute după adăugarea compusului. Aceste rezultate au demonstrat în mod clar că compusul (1) a avut capacitatea de a suprima dinamica MT.

40

Exemplul 16 de Testare Farmacologică. Activitatea antiproliferativă in vitro (Figura 11)

Testele antiproliferative *in vitro* pentru compusul (1) au fost efectuate folosind un mic panou de linii de celule canceroase, incluzând carcinom uman cu celule scuamoase al esofagului (OE21, TE-8), adenocarcinom uman al esofagului (OE33) și sarcomul uterin uman (MES-SA, MES-SA-Dx5-Rx1). Toate liniile celulare au fost cultivate în mediu RPMI-1640 care conține 10% FBS și penicilină-streptomycină (mediu de cultură), într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu dintr-o placă cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 75 μL de suspensie celulară ajustată cu mediu de cultură la o concentrație de 4×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 25 μL de compus (1) suspendat în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 72 de ore într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo[®] (Promega) cu 2013 EnVision[™] Multilabel Reader (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrația de compus (1) necesară pentru inhibarea creșterii celulare cu 50% (*adică*, o valoare IC₅₀) a fost calculată și este arătată în Figura 11. Susceptibilitatea P-gp a fost calculată ca raport dintre valoarea IC₅₀ în celulele MES-SA-Dx5-Rx1, care supraexprimă P-gp, și valoarea IC₅₀ în celulele MES-SA.

50

60 **Exemplul 17 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale cu monoterapie în modelele de xenogrefă KPL-4 la soareci; Efecte antitumorale cu monoterapie în modelele de xenogrefă COLO-704 la soareci (Figura 12)**

O linie celulară KPL-4 de cancer mamar uman HER-2 pozitiv, care fusese cultivată într-un DMEM care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de 1×10^8 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 8 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). Unsprezece zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$\text{Greutatea corporală relativă (RBW)} = \text{Greutatea corporală (ziua X)}/\text{Greutatea corporală (prima zi)}$$

Pe baza volumelor de tumori obținute în ziua 1, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din șase șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos o dată pe săptămână la 20 μ g/kg, 60 μ g/kg sau 180 μ g/kg timp de 2 săptămâni (în Ziua 1 și Ziua 8). Regresia tumorii a fost observată în grupurile tratate cu 60 μ g/kg și 180 μ g/kg, și administrarea la 180 μ g/kg a eradicat complet în ziua 15 tumorile de xenogrefe la toți șoarecii.

O linie de celule de cancer ovarian uman COLO-704, care fusese cultivată într-un RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de 1×10^8 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 5 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). La nouă zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

$$\text{Greutatea corporală relativă (RBW)} = \text{Greutatea corporală (ziua X)}/\text{Greutatea corporală (prima zi)}$$

Pe baza volumelor de tumori obținute în ziua 1, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din șase șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos o dată pe săptămână la 20 μ g/kg, 60 μ g/kg sau 180 μ g/kg timp de 2 săptămâni (în Ziua 1 și în Ziua 8). Tratamentul cu compus a indus regresia tumorii la 180 μ g/kg și întârzierea creșterii tumorii la 60 μ g/kg. Administrarea la 180 μ g/kg a eradicat complet în ziua 22 tumorile de xenogrefă la toți șoarecii.

Exemplul 18 de Testare Farmacologică. Efectul asupra vaselor CD31-pozitiv în modelul subcutanat FaDu la șoareci (Figura 13)

O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină (mediu de cultură), a fost ajustată cu mediu de cultură la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 6 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Fiecare compus de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu

ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos la 20 µg/kg, 60 µg/kg sau 180 µg/kg. La cinci zile după administrarea unică, probele tumorale au fost colectate și fixate cu fixator de zinc IHC (BD Pharmingen) la 4 °C timp de 24 de ore. Țesuturile încorporate în parafină au fost secționare (3 µm), au fost montate pe lamele încărcate pozitiv și au fost uscate în aer. Colorația imunohistochimică a CD31 a fost efectuată utilizând modelul de colorare automată Ventana Discover XT (Roche Diagnostics), conform protocolului producătorului. Secțiunile au fost deparafinizate, au fost condiționate, și antigenii au fost recuperați cu CC1 (Ventana Medical Systems). Lamelele au fost blocate cu Blocker A și Blocker B (kit de blocare a biotinei endogene, Roche Diagnostics). Anticorpul IgG CD31 de șobolan anti-șoarece (Dianova GmbH) a fost aplicat la 2 µg/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorpul timp de 6 ore, urmate de 32 de minute de incubare cu anticorp IgG anti-șobolan biotinitat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) la 2,2 µg/mL. Detectarea a fost efectuată cu Streptavidin-HRP D timp de 16 minute, urmată de incubare cu DAB D și DAB H₂O₂ D (kit DABMap, Ventana Medical Systems, Inc.) timp de 8 minute. Lamelele au fost contracolorate cu Hematoxilină II (Roche Diagnostics) timp de 16 minute, urmată de incubare cu reactiv Blueing timp de 4 minute. Secțiunile au fost deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen înlocuit, și au fost acoperite cu DPX[®] (Merck KGaA). Lamelele imunocolorate au fost scanate folosind Sistem automat de imagistică cu diapozitive Vectra[®] 2 (Perkin Elmer Inc.). Numărul de vase de sânge din întreaga tumoare a fost cuantificat prin numărarea elementelor CD31-pozitive folosind software-ul inform 2 (PerkinElmer Inc.) Aria regiunii tumorale a fost măsurată prin evaluarea zonei de colorare cu hematoxilină folosind software-ul inform 2 (PerkinElmer Inc.). Numărul de vase de sânge a fost normalizat cu aria regiunii tumorale. Administrarea unică a compusului de testare la doze de 20, 60 și 180 µg/kg a crescut numărul vaselor de sânge în tumoare. Rapoartele dintre numărul vaselor de sânge din grupurile cu administrare a compusului de testare în comparație cu grupul netratat, au fost calculate cu formula de mai jos:

25 *Raportul vaselor din tumoare = numărul de vase de sânge din grupul cu administrare a compusului de testare/ numărul de vase de sânge din grupul netratat*

Exemplul 19 de Testare Farmacologică. Efectul asupra CAF-urilor în α-SMA pozitiv în modelul subcutanat FaDu la șoareci (Figura 14)

30 O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină (mediu de cultură), a fost ajustată cu mediu de cultură la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 µL într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 6 săptămâni (CAN.N.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 5 șoareci. Fiecare compus de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos la 20 µg/kg, 60 µg/kg sau 180 µg/kg. La două zile sau la 5 zile după administrarea unică, probele tumorale au fost colectate și fixate cu fixator de zinc IHC (BD Pharmingen) la 4 °C timp de 24 de ore. Țesuturile încorporate în parafină au fost secționare (3 µm), au fost montate pe lamele încărcate pozitiv și au fost uscate în aer. Secțiunile au fost deparafinate, au fost condiționate, și antigenii au fost extrași folosind microunde cu 1 mM EDTA la pH 6,0. Secțiunile au fost blocate cu 1% BSA în TBS. Anticorpul monoclonal anti-α-SMA de șoarece conjugat cu fosfatază alcalină (clona 1A4, Sigma) a fost aplicat la 5 µg/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorpul timp de 2,5 ore. Detectarea a fost efectuată cu kit-ul de substrat Fast red II (Nichirei Bioscience Inc.). Secțiunile au fost contracolorate cu Hematoxilină Mayer (Muto Pure Chemicals) timp de 50 de secunde. Secțiunile au fost deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen înlocuit, și au fost acoperite cu DPX (Merck KGaA). Lamelele imunocolorate au fost scanate utilizând Sistemul de imagistică automatizată Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Aria regiunii α-SMA-pozitivă din întreaga tumoare a fost cuantificată prin numărarea elementelor α-SMA-pozitive folosind software-ul inform 2 (PerkinElmer Inc.) Aria regiunii tumorale a fost măsurată prin evaluarea zonei de colorare cu hematoxilină folosind software-ul inform 2 (PerkinElmer Inc.). Aria regiunii α-SMA pozitive a fost normalizată cu aria regiunii tumorale. Administrarea unică a compusului de testare a redus semnificativ aria α-SMA pozitivă la doze de 60 și 180 µg/kg în ziua 3, și la o doză de 180 µg/kg în ziua 6. O rată de suprimare a zonei α-SMA pozitive din grupul cu administrare a compusului de testare a fost calculat cu formula de mai jos:

60 *Raportul α-SMA = aria α-SMA din grupul cu administrare a compusului de testare/aria α-SMA din grupul netratat*

Exemplul 20 de Testare Farmacologică. Efecte asupra tenascinei-C și EDA-fibronectinei în modelul subcutanat FaDu la șoareci (Figura 15)

O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină (mediu de cultură), a fost ajustată cu mediu de cultură la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 6 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan, Inc.). La zece zile după inocularea celulelor, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 5 șoareci. Compusul (1) a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Compusul (1) (180 μ g/kg) și Cetuximab (CTX, Erbitux[®], Merck Serono Co. Ltd.) (10 mg/kg) a fost diluat cu ser fiziologic și a fost injectat intravenos în ziua 1. La cinci zile după administrarea unică, probele tumorale au fost colectate și fixate cu fixator de zinc IHC (BD Pharmingen) la 4 °C timp de 24 de ore. Țesuturile încorporate în parafină au fost secționare (3 μ m), au fost montate pe lamele încărcate pozitiv și au fost uscate în aer. Secțiunile au fost deparafinate, au fost condiționate și antigenii au fost extrași folosind microunde cu 1 mM EDTA la pH 6,0 pentru Tenascină-C. Pentru EDA-fibronectină, procedura de extragere a antigenilor nu a fost necesară. Secțiunile au fost incubate cu BLOXALL Blocking Solution (Vector Labs) timp de 10 minute pentru a bloca peroxidaza endogenă și cu Mouse on Mouse Ig Blocking Reagent (Vector Labs) timp de 1 oră, și apoi cu 2,5% ser normal de cal timp de 30 de minute. Pentru colorarea imunohistochimică a Tenascinei-C, anticorpul monoclonal anti-Tenascină-C de șoarece (clona 4C8MS, IBL) a fost aplicat la 5 μ g/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorp peste noapte la 4 °C. Pentru colorarea imunohistochimică a EDA-fibronectinei, a fost aplicat anticorp monoclonal anti-EDA-fibronectină de șoarece (clona IST-9, Abcam) la 1,5 μ g/mL. Secțiunile au fost incubate cu anticorpul timp de 1 oră la temperatura camerei. Detectarea a fost efectuată cu kit de polimeri de peroxidază Mouse On Mouse ImmPRESS[™] (Vector Labs). Secțiunile au fost contracolorate cu Hematoxilina Mayer (Muto Pure Chemicals) timp de 50 de secunde. Secțiunile au fost deshidratate în etanoli clasificați, au fost degresate cu xilen înlocuit, și au fost acoperite cu DPX (Merck KGaA). Lamelele imunocolorate au fost scanate utilizând Sistemul de imagistică automatizată Vectra 2 (Perkin Elmer Inc.). Nivelurile de expresie a Tenascină-C și ED-A fibronectină au fost reduse în tumorile tratate cu compus (1) și CTX, în comparație cu tumorile de control.

Exemplul 21 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale ale combinației cu cetuximab în modelul de xenogrefă FaDu subcutanată la șoareci (Figura 16)

O linie celulară FaDu de carcinom cu celule scuamoase umane de cap și gât (SCCHN), care fusese cultivată într-un mediu RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de 5×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecilor atimici (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, 7 săptămâni, Charles River Japan Inc.). La zece zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece lungimea și lățimea unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarea formulă de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

Pe baza TV, șoarecii au fost grupați aleatoriu (Ziua 1). Fiecare grup a fost format din șase șoareci. Compusul (1) a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Compusul (1) (20, 60 sau 180 μ g/kg) și Cetuximab (CTX, Erbitux[®], Merck Serono Co., Ltd.) (10 mg/kg) a fost diluat cu soluție salină și a fost injectat intravenos în ziua 1. Modificările RTV ale fiecărui grup au fost arătate în Figura 16. La doze de 180 μ g/kg și 60 μ g/kg, eficacitatea antitumorală a compusului (1) cu CTX a fost mai puternică decât cea a monoterapiei cu CTX, cu regresie tumorală. Eficacitatea antitumorală a compusului (1) la doze de 20 μ g/kg în combinație cu CTX a avut tendința de a fi mai puternică decât cea a monoterapiei cu CTX.

Exemplul 22 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale ale monoterapiei în modelele de xenogrefă de sarcom de țesut moale la șoareci (Figura 17)

MES-SA

O linie celulară de sarcom uterin uman MES-SA, care fusese cultivată într-un RPMI-1640 care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de 2×10^8 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară, și suspensia a fost amestecată cu Geltrex[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., #A1413202) într-un raport de 1:1, pentru a prepara o suspensie

celulară într-o concentrație de 1×10^8 celule/ml. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 6 săptămâni (CAN.N.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). La șase zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

Pe baza volumelor de tumori obținute în ziua 1, șoarecii au fost grupați, astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din 6 șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos o dată pe săptămână la 180 μ g/kg timp de 2 săptămâni (în Ziua 1 și în Ziua 8). Activitatea antitumorală a fost observată ca întârziere a creșterii tumorii în grupul tratat.

HT-1080

O linie celulară de fibrosarcom uman HT-1080, care fusese cultivată într-un E-MEM care conținea 10% FBS, NEAA și antibiotice, a fost ajustată cu mediu la o concentrație de 3×10^7 celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecilor atimici (CAN.N.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, 6 săptămâni, Charles River Japan Inc.). La șase zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece lungimea și lățimea unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarea formulă de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

Pe baza TV, șoarecii au fost grupați aleatoriu (Ziua 1). Fiecare grup a fost format din șase șoareci. Compusul (1) a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Compusul (1) (180 μ g/kg) a fost diluat cu soluție salină și a fost injectat intravenos în Ziua 1 și în Ziua 8. Modificările RTV ale fiecărui grup au fost arătate în Figura 17. Activitatea antitumorală a fost observată ca regresie a tumorii în grupul tratat.

CTG-2041

Fragmente de tumoare de angiosarcom uman CTG-2041 au fost implantate s.c. În coapsa stângă a șoarecilor femele. Creșterea tumorii a fost monitorizată de două ori pe săptămână folosind un șubler digital, astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarea formulă de calcul:

$$\text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} / 2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)} / \text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

Atunci când volumul tumorilor a ajuns la aproximativ 200 mm^3 , animalele sunt potrivite după volumul tumorii în grupuri de tratament sau de control și administrarea este inițiată în Ziua 1. Fiecare grup a fost format din cinci șoareci. Compusul (1) a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Compusul (1) (100 μ g/kg) a fost diluat în soluție salină și a fost injectat intravenos în Ziua 1 și Ziua 8. Modificările RTV ale fiecărui grup au fost arătate în Figura 17. Activitatea antitumorală a fost observată ca regresie a tumorii în grupul tratat.

Exemplul 23 de Testare Farmacologică. Efecte antitumorale ale monoterapiei în modelele de xenogrefă de sarcom de cancer endometrial la șoareci (Figura 18)

HEC-108

O linie de celule de cancer endometrial uman HEC-108, care fusese cultivată într-un E-MEM care conținea 15% FBS și antibiotice, a fost ajustată cu mediu la o concentrație de $7,14 \times 10^7$ celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 150 μ L într-o laterală a coapsei drepte a șoarecilor atimici (CAN.N.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, în vârstă de 6 săptămâni, Charles River Japan Inc.). La treisprezece zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost

măsurate la fiecare șoarece lungimea și lățimea unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarea formulă de calcul:

$$5 \quad \text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

$$\text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

10 Pe baza TV, șoarecii au fost grupați aleatoriu (Ziua 1). Fiecare grup a fost format din șase șoareci. Compusul (1) a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Compusul (1) (180 μg/kg) a fost diluat în soluție salină și a fost injectat intravenos în Ziua 1 și Ziua 8. Modificările RTV ale fiecărui grup au fost prezentate în Figura 18. Activitatea antitumorală a fost observată ca întârziere a creșterii tumorii în grupul tratat.

15 AN3CA

O linie de celule de cancer endometrial uman AN3CA, care fusese cultivată într-un E-MEM care conținea 10% FBS și penicilină-streptomycină, a fost ajustată cu soluție de sare echilibrată Hanks la o concentrație de $1,4 \times 10^8$ celule/ml pentru a prepara o suspensie celulară, și suspensia a fost amestecată cu Geltrex® (Thermo Fisher Scientific Inc., #A1413202) într-un raport de 1:1 pentru a prepara o suspensie celulară într-o concentrație de 7×10^7 celule/ml. Suspensia celulară a fost inoculată subcutanat într-un volum de 100 μL într-o laterală a coapsei drepte a șoarecelui nud cu vârstă de 6 săptămâni (CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj, femelă, Charles River Laboratories Japan Inc.). Douăsprezece zile după inocularea celulelor (Ziua 1), au fost măsurate la fiecare șoarece diametrul cel mai mic și diametrul cel mai mare ale unei tumori, folosind un șubler digital electronic (Digimatic™ șubler, Mitutoyo Corporation), astfel încât să se calculeze volumul tumorii în conformitate cu următoarele formule de calcul:

$$25 \quad \text{Volumul tumorii (mm}^3\text{)} = \text{diametrul cel mai mare (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)} \times \text{diametrul cel mai mic (mm)}/2$$

$$30 \quad \text{Volumul relativ al tumorii (RTV)} = \text{Volumul tumorii (ziua X)}/\text{Volumul tumorii (prima zi)}$$

Pe baza volumelor de tumori obținute în ziua 1, șoarecii au fost grupați astfel încât mediile volumelor tumorii au fost substanțial egale între grupuri. Experimentul a fost efectuat pe grupuri formate fiecare din cinci șoareci. Compusul de testare a fost dizolvat în DMSO, și o soluție a fost depozitată în congelator înainte de utilizare. Imediat înainte de administrare, soluția stoc a fost diluată cu ser fiziologic. Compusul de testare în soluție salină a fost administrat intravenos o dată pe săptămână la 180 μg/kg timp de 2 săptămâni (în Ziua 1 și în Ziua 8). Activitatea antitumorală a fost observată ca regresie a tumorii în grupul tratat.

40 Exemplul 24 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii NCI-N87 și MKN-28

În acest test, au fost măsurate activitățile de inhibare a creșterii ale compușilor de testare în liniile celulare de cancer gastric uman NCI-N87 și, respectiv, MKN-28. Celulele NCI-N87 și MKN-28 au fost menținute în mediu RPMI-1640 care conține 10% FBS, penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 100 μL de suspensie de celule NCI-N87 sau MKN-28 ajustate cu mediu de cultură la o concentrație de 3×10^4 celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 100 μL de Compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrațiile compusului de testare necesare pentru inhibarea creșterii celulare cu 50% (*adică*, o valoare IC₅₀) au fost calculate și sunt arătate în Tabelul 14.

Tabelul 14

| Compusul de testare | NCI-N87 (IC ₅₀ (nM)) | MKN-28 (IC ₅₀ (nM)) |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Halicondrină B | 0,007 | 0,017 |
| compus (1) | 0,002 | 0,015 |

Exemplul 25 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii HuTu 80

În acest test, au fost măsurate activitățile de inhibare a creșterii ale compușilor de testare din linia celulară de cancer de intestin subțire uman HuTu 80, care a fost izolată din țesutul duodenal. Celule HuTu 80 au fost menținute în mediu EMEM care conține 10% FBS, penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 100 μL de suspensie de celule HuTu80 ajustate cu mediu de cultură la o concentrație de 3×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 100 μL de Compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrațiile compușilor de testare necesare pentru inhibarea creșterii celulare cu 50% (*adică*, o valoare IC₅₀) au fost calculate și sunt arătate în **Tabelul 15**.

Tabelul 15

| Compusul de testare | HuTu 80 (IC ₅₀ (nM)) |
|---------------------|---------------------------------|
| Halicondrină B | 0,031 |
| compus (1) | 0,019 |

Exemplul 26 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii SW780

În acest test, au fost măsurate activitățile de inhibare a creșterii ale compușilor de testare în linia celulară de cancer urotelial uman SW780. Celule SW780 au fost menținute în mediu RPMI-1640 care conține 10% FBS, penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 100 μL de suspensie de celule SW780 ajustate cu mediu de cultură la o concentrație de 3×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 100 μL de Compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrațiile compușilor de testare necesare pentru inhibarea creșterii celulare cu 50% (*adică*, o valoare IC₅₀) au fost calculate și sunt arătate în **Tabelul 16**.

Tabelul 16

| Compusul de testare | SW780 (IC ₅₀ (nM)) |
|---------------------|-------------------------------|
| Halicondrină B | 0,032 |
| compus (1) | 0,017 |

Exemplul 27 de Testare Farmacologică. Testul de inhibare a creșterii HS-SY-II

În acest test, au fost măsurate activitățile de inhibare a creșterii ale compușilor de testare în linia celulară de sarcom sinovial uman HS-SY-II. Celule SH-SY-II au fost menținute într-un mediu DMEM care conține 10% FBS, penicilină și streptomycină într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri (Becton, Dickinson and Company, 353219), au fost adăugați 100 μL dintr-o suspensie celulară de HS-SY-II ajustată cu mediu de cultură la o concentrație de 3×10⁴ celule/mL, și celulele au fost incubate peste noapte într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). În ziua următoare, în fiecare godeu au fost adăugați 100 μL de Compus (1) sau Halicondrină B suspendată în mediu de cultură, în serii de diluții de trei ori, și rezultatul a fost incubat timp de 3 zile într-un incubator cu 5% CO₂ (37 °C). Apoi, viabilitatea celulară a fost determinată prin Testul de viabilitate celulară cu luminescență CellTiter-Glo® (Promega) cu cititor de etichete multiple EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Valoarea godeurilor care conțin celule fără compuși de testare adăugați a fost definită ca 100% și valoarea godeurilor care nu conțin celule a fost definită ca 0%. Concentrațiile compușilor de testare necesare pentru inhibarea creșterii celulare cu 50% (*adică*, o valoare IC₅₀) au fost calculate și sunt arătate în **Tabelul 17**.

Tabelul 17

| Compusul de testare | HS-SY-II (IC ₅₀ (nM)) |
|---------------------|----------------------------------|
|---------------------|----------------------------------|

| Compusul de testare | HS-SY-II (IC ₅₀ (nM)) |
|---------------------|----------------------------------|
| Halicondrină B | 0,010 |
| compus (1) | 0,002 |

ECHIVALENȚI ȘI SFERA DE ÎNTINDERE

În revendicări, articole, cum ar fi "o", "un", și "-ul" pot însemna unu sau mai multe, cu excepția cazului în care este indicat contrariul, sau este altfel evident din context. Revendicările sau descrierile care includ "sau" între unu sau mai mulți membri ai unui grup sunt considerate satisfăcute dacă unul, mai mulți membri sau toți membrii grupului sunt prezenți, sunt folosiți, într-un anumit produs sau proces, sau sunt relevanți în alt mod pentru un anumit produs sau proces, cu excepția cazului în care este indicat contrariul, sau este altfel evident din context. Invenția include variante de realizare în care exact un membru al grupului este prezent într-un anumit produs sau proces, este folosit sau relevant în alt mod pentru un anumit produs sau proces. Invenția include variante de realizare în care mai mult decât unul sau toți membrii grupului sunt prezenți într-un anumit produs sau proces, sunt utilizați sau sunt relevanți în alt mod pentru un anumit produs sau proces.

Mai mult, invenția include toate variațiile, combinațiile și permutările în care una sau mai multe limitări, elemente, clauze și termeni descriptivi din una sau mai multe dintre revendicările enumerate sunt introduse într-o altă revendicare. De exemplu, orice revendicare care depinde de o altă revendicare poate fi modificată pentru a include una sau mai multe limitări găsite în orice altă revendicare care este dependentă de aceeași revendicare de bază. Ar trebui să se înțeleagă că, în general, atunci când invenția sau aspectele invenției sunt menționate ca cuprinzând elemente și/sau caracteristici particulare, anumite variante de realizare ale invenției sau aspecte ale invenției constau din sau constau, în principal, din astfel de elemente și/sau caracteristici. Din motive de simplitate, acele variante de realizare nu au fost prezentate în mod specific *in haec verba* aici. De asemenea, se remarcă faptul că termenii "care cuprinde" și "care conține" se intenționează să fie deschiși și să permită includerea unor elemente sau etape suplimentare. Acolo unde sunt date intervale, sunt incluse punctele finale. În plus, cu excepția cazului în care se indică altfel sau nu se evidențiază altfel din contextul și înțelegerea unei persoane cu calificare obișnuită în domeniu, valorile care sunt exprimate ca intervale pot lua orice valoare sau sub-interval specific din intervalele menționate în diferite variante de realizare a invenției, până la zecime din unitatea limitei inferioare a intervalului, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar altfel.

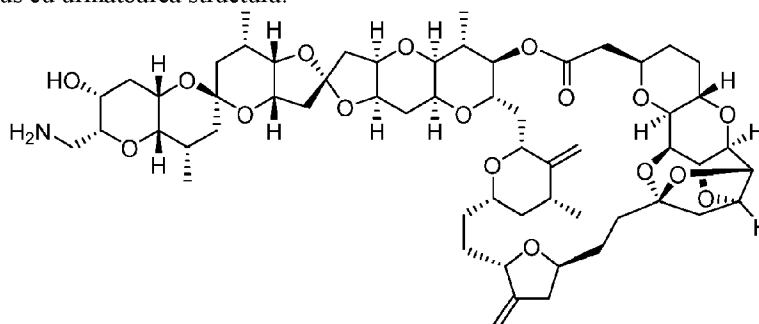
Specialiștii în domeniu vor recunoaște sau vor fi capabili să stabilească, folosind nu mai mult decât experimente de rutină, mulți echivalenți cu variantele de realizare specifice descrise aici. Sfera de întindere a prezentelor variante de realizare descrise aici nu se intenționează să fie limitată la Descrierea de mai sus, ci mai degrabă este așa cum este prezentată în revendicările anexate. Persoanele cu calificare obișnuită în domeniu vor aprecia că pot fi făcute diferite schimbări și modificări la această descriere fără îndepărtare de la sfera de întindere a prezentei invenții, așa cum este definită în revendicările următoare.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- FRANCIS G. FANG ET AL: "Synthetic Studies Towards Halichondrins: Synthesis of the Left Halves of Norhalichondrins and Homohalichondrins", TETRAHEDRON LETTERS, vol. 33, no. 12, 1 March 1992 (1992-03-01), pages 1557-1560, XP055479520, AMSTERDAM, NL ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)91673-3
- US-A1- 2006 104 984
- HICKFORD S J H ET AL: "Antitumour polyether macrolides: Four new halichondrins from the New Zealand deep-water marine sponge *Lissodendoryx* sp", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 17, no. 6, 15 March 2009 (2009-03-15), pages 2199-2203, XP025981916, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/J.BMC.2008.10.093 [retrieved on 2008-11-19]
- US-B1- 9 938 288
- KENZO YAHATA ET AL: "Unified, Efficient, and Scalable Synthesis of Halichondrins: Zirconium/Nickel-Mediated One-Pot Ketone Synthesis as the Final Coupling Reaction", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 56, no. 36, 28 August 2017 (2017-08-28), pages 10796-10800, XP055480022, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201705523

(57) Revendicări:

1. Un compus cu următoarea structură:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2. O compoziție farmaceutică care cuprinde compusul din revendicarea 1, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, într-un purtător acceptabil farmaceutic.

3. Compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform revendicării 1, pentru utilizare în inhibarea creșterii unei tumori sau cancer **caracterizat prin** angieneză, invazie sau metastază.

4. Compusul sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestuia conform revendicării 1, pentru utilizare în tratamentul unei tumori sau cancer **caracterizat prin** angieneză, invazie sau metastază.

5. Compusul pentru utilizare conform revendicării 3 sau 4, în care cancerul este cancer de cap și gât, cancer mamar, cancer esofagian, cancer uterin, cancer ovarian, cancer colorectal, cancer endometrial, cancer gastric, cancer de intestin subțire, cancer de vezică urinară, sau un sarcom.

6. Compusul pentru utilizare conform revendicării 5, în care cancerul este:

- (a) cancer de cap și gât, preferabil, în care cancerul este carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN) sau carcinom adenoid chistic; sau
- (b) cancer mamar, preferabil, în care cancerul mamar este (i) cancer mamar HER2-positiv sau (ii) cancer mamar HER2-negativ sau (iii) cancer mamar triplu negativ; sau
- (c) cancer colorectal; sau
- (d) cancer esofagian, preferabil, în care cancerul esofagian este adenocarcinom esofagian; sau
- (e) cancer uterin; sau
- (f) cancer ovarian; sau
- (g) un sarcom, preferabil, în care sarcomul este sarcom uterin, fibrosarcom, sarcom sinovial, sarcom de țesut moale, sau angiosarcom; sau
- (h) cancer gastric; sau
- (i) cancer de intestin subțire, preferabil, în care cancerul de intestin subțire este adenocarcinom de intestin subțire; sau
- (j) cancer de vezică urinară; sau
- (k) cancer urotelial.

7. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 4-6, pentru utilizare în combinație cu un anticorp de proteină 1 de moarte celulară programată (PD-1).

8. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 4-6, pentru utilizare în combinație cu un anticorp de proteină L1 de moarte celulară programată (PD-L1).

9. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 4-6, pentru utilizare în combinație cu un anticorp anti-EGFR (receptor al factorului de creștere epidermică), preferabil, în care anticorpul anti-EGFR este un mAb anti-EGFR și/sau cancerul este cancer de cap și gât, preferabil, în care cancerul este carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN), și/sau mAb anti-EGFR este cetuximab.

10. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 4-6, pentru utilizare în combinație cu un anticorp de HER2 (receptor al factorului uman de creștere epidermică), preferabil, în care anticorpul de HER2 este un mAb de HER2 și/sau cancerul este cancer mamar, și/sau mAb de HER2 este trastuzumab.

11. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 4-10 la un subiect, în care compusul sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este într-un purtător acceptabil farmaceutic.

12. Compusul conform revendicării 1, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare conform revendicării 6, în care, la un subiect, cancerul este cancer mamar HER2-negativ sau carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (SCCHN).

13. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 5-10 și 12, pentru utilizare în combinație cu radioterapie.

14. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 5-10 și 12-13, pentru utilizare în combinație cu intervenție chirurgicală.

15. Compusul pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 5-10 și 12-14, în care subiectul este un om.

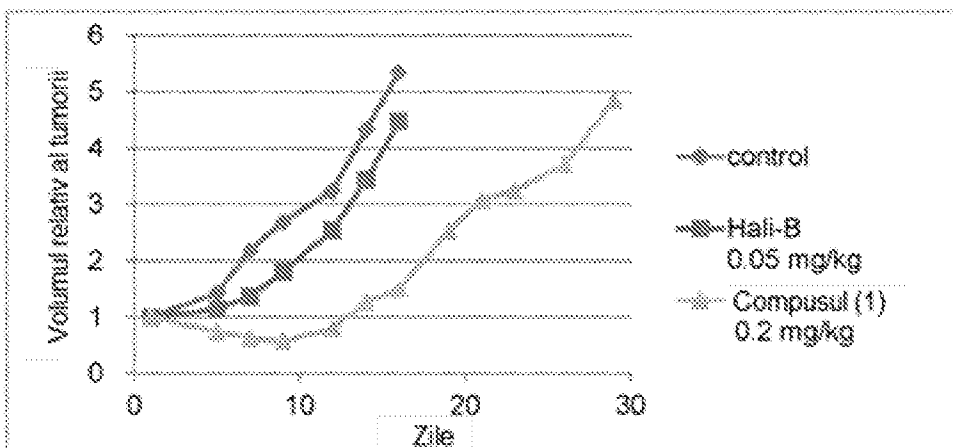


Figura 1

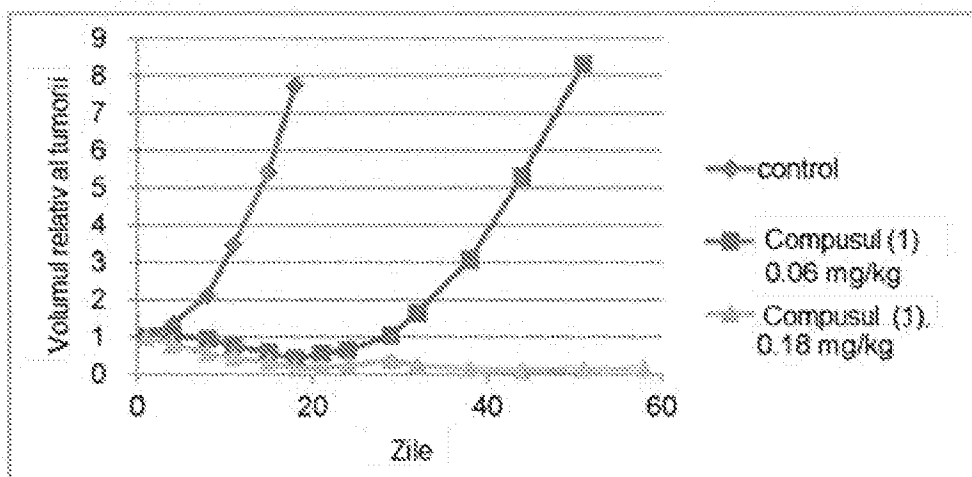


Figura 2

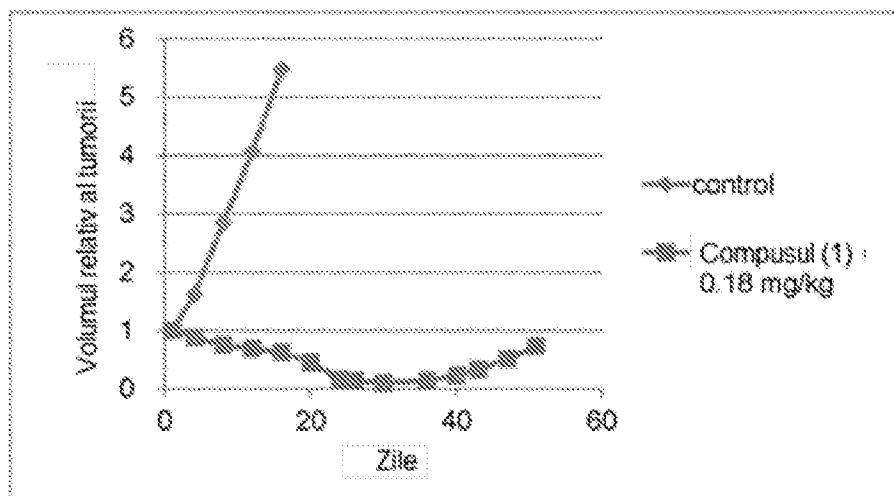


Figura 3

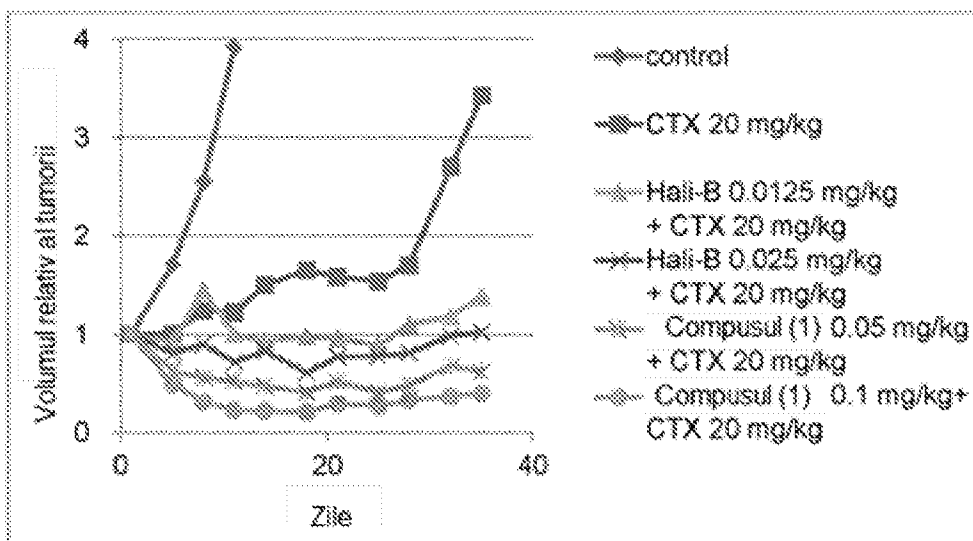


Figura 4

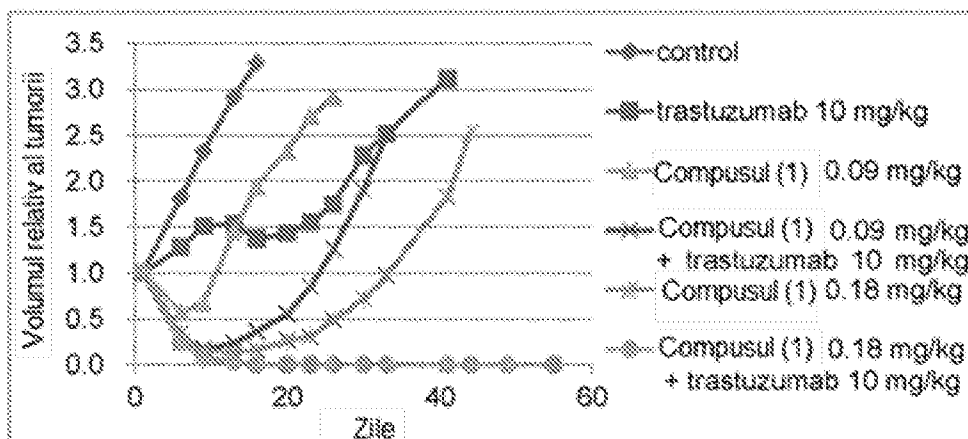


Figura 5

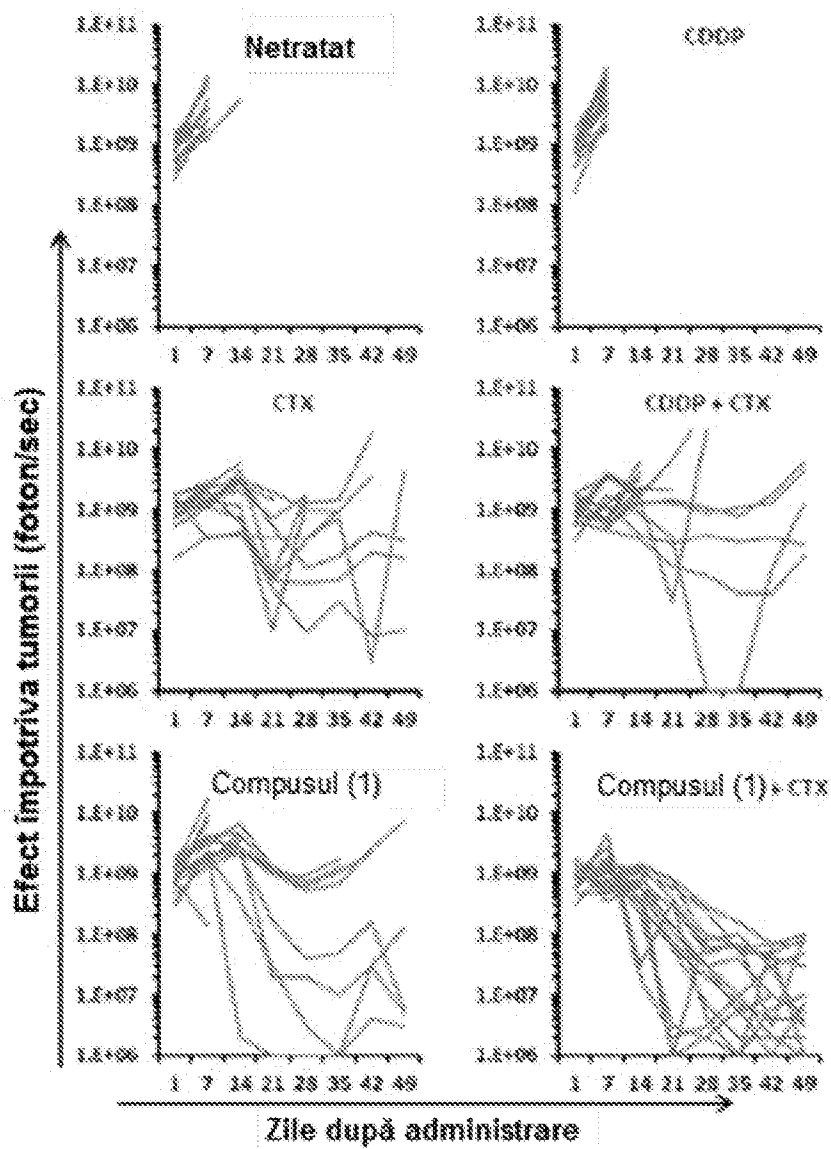


Figura 6A

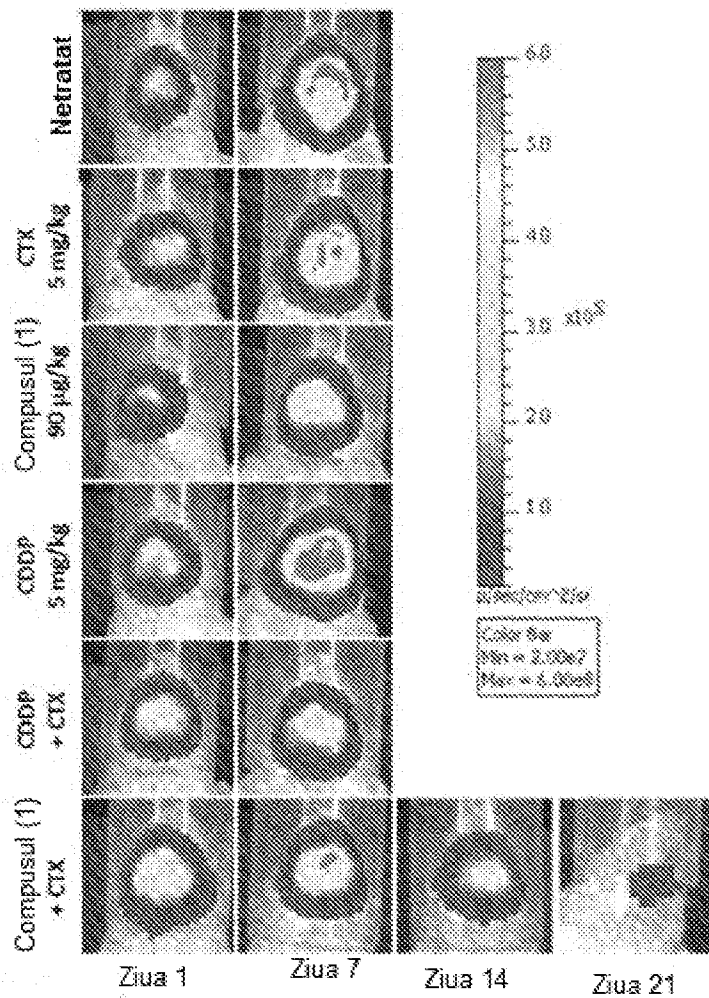


Figura 6B

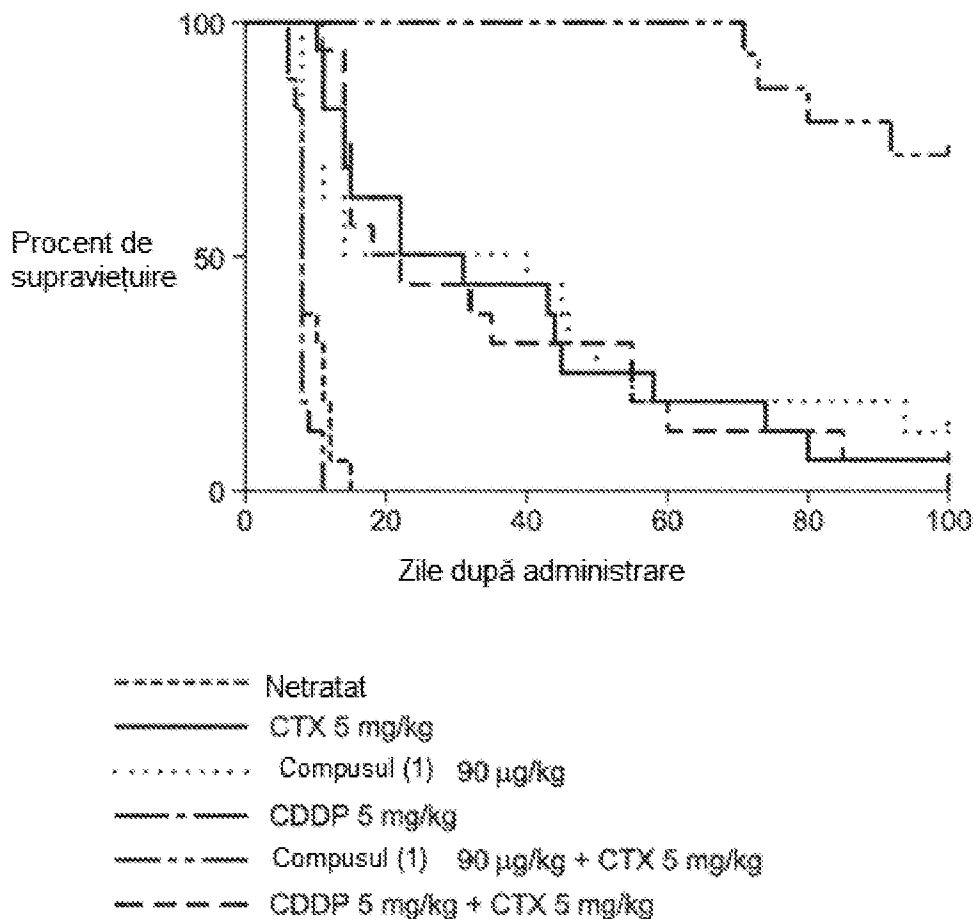


Figura 7A

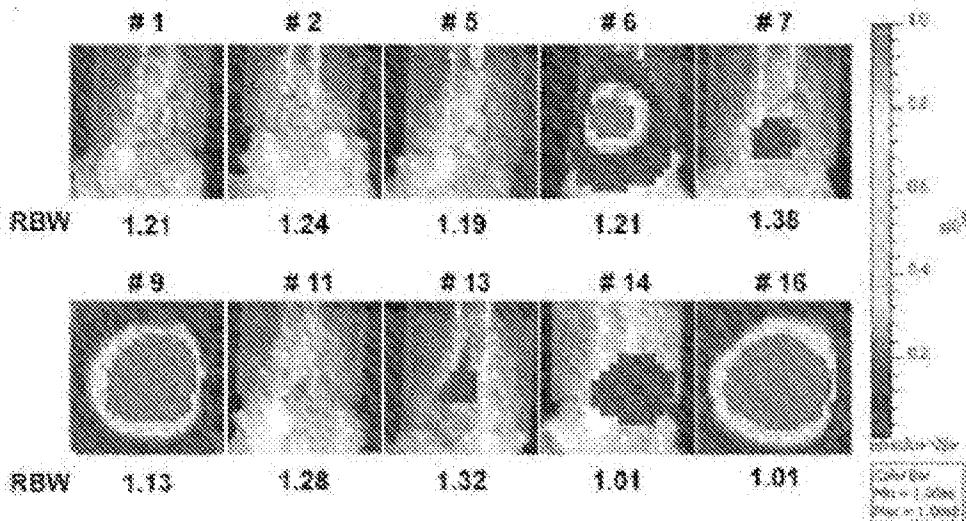


Figura 7B

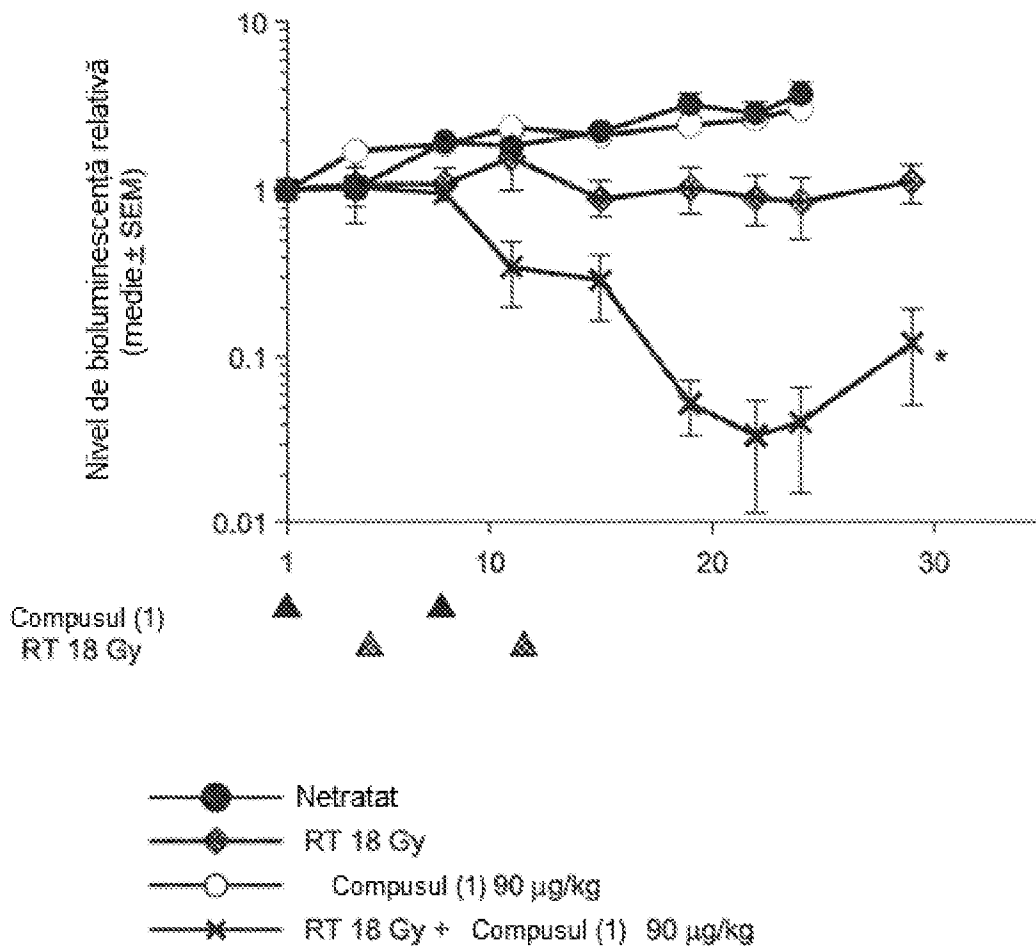


Figura 8A

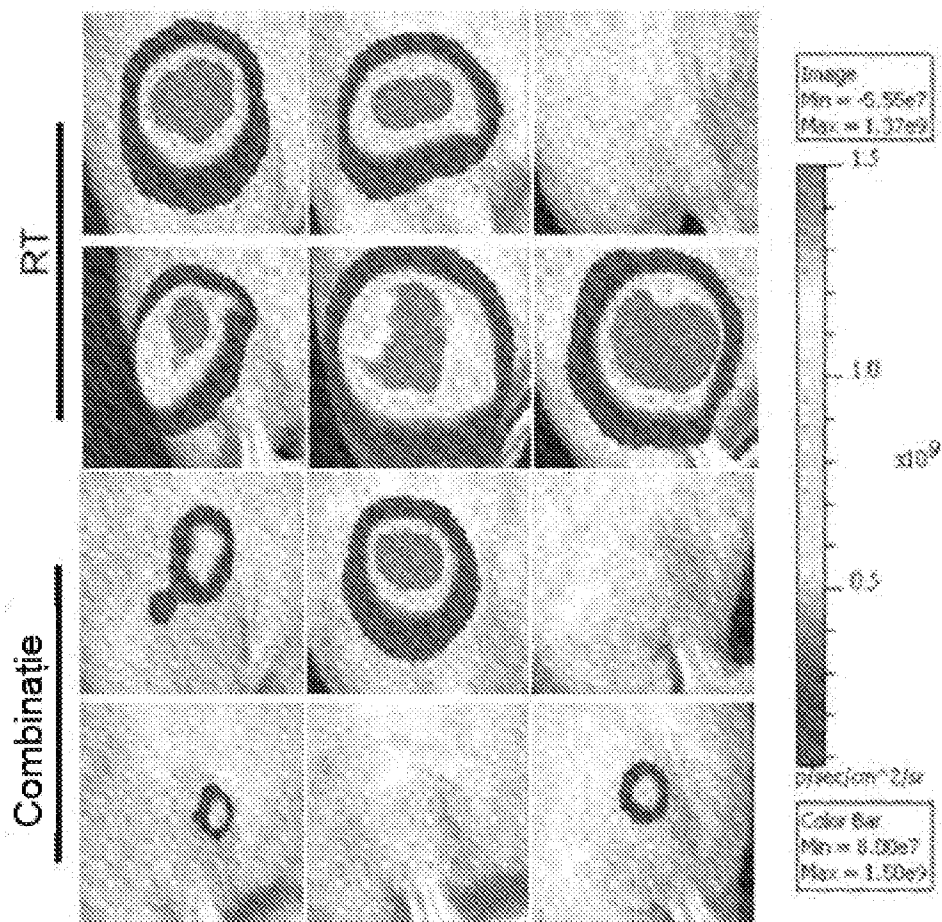


Figura 8B

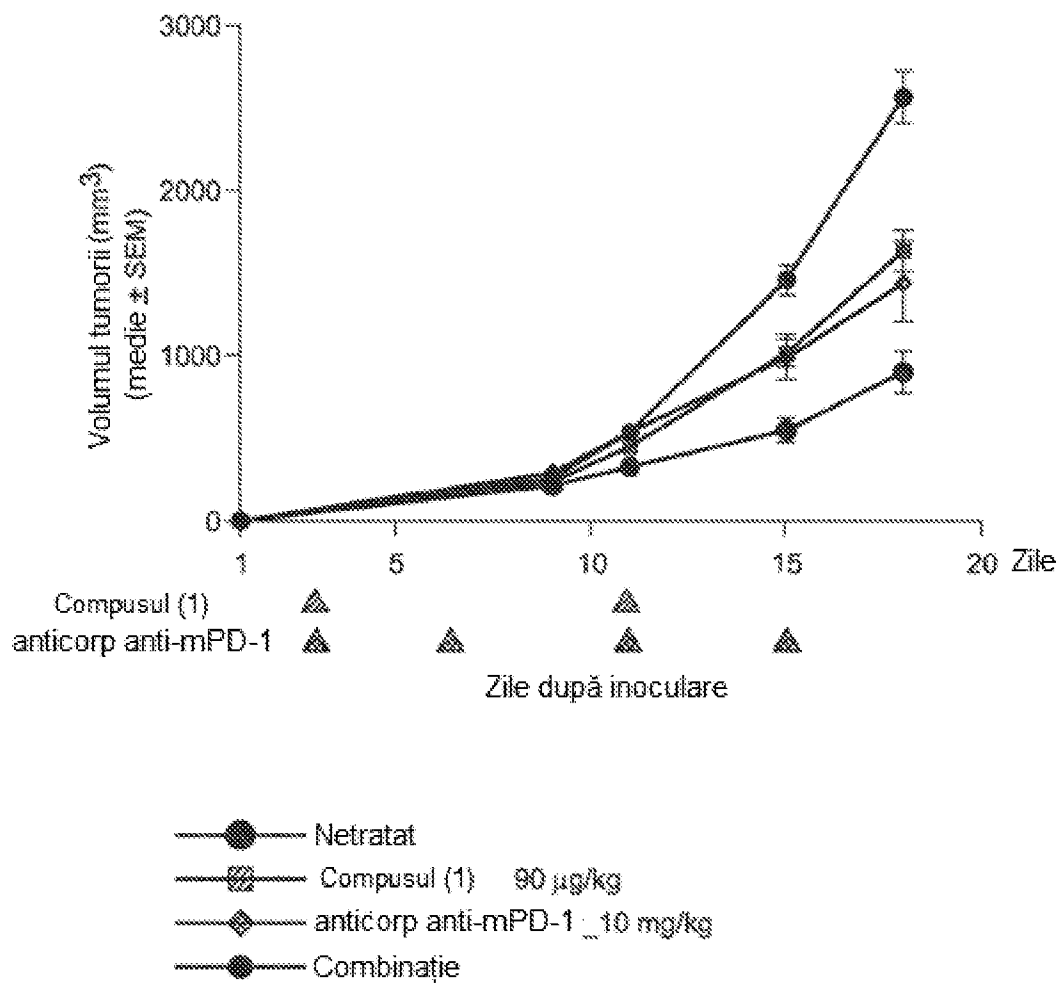


Figura 9

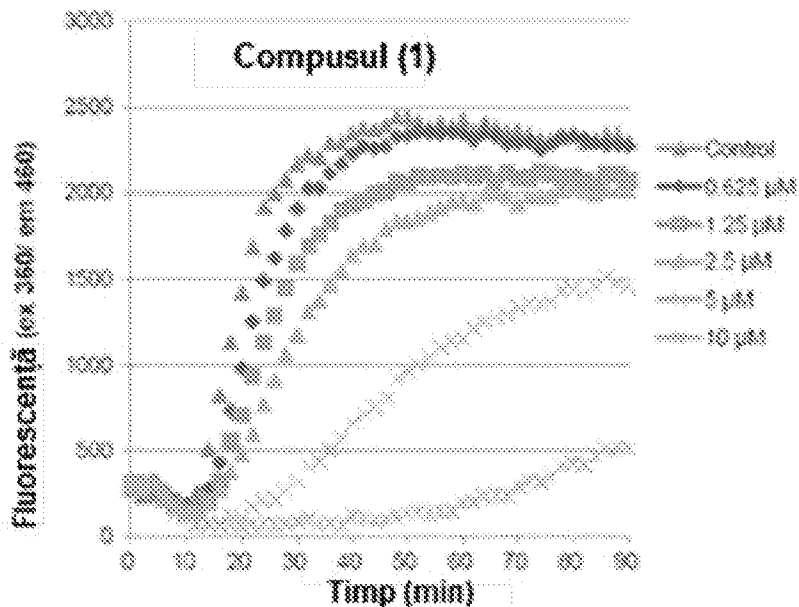


Figura 10A

Compusul (1): 0.5 nM (IC₅₀)

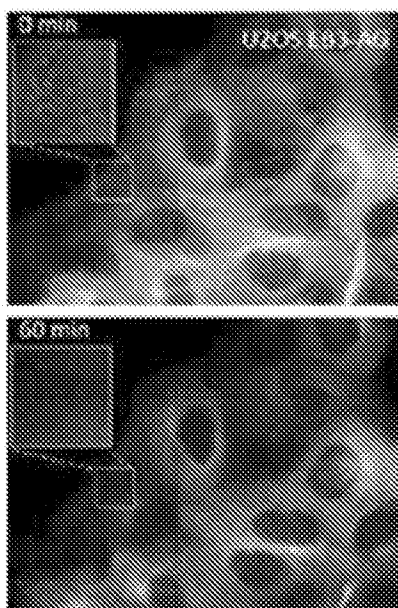


Figura 10B

IC₅₀ de inhibare a creșterii celulare in vitro (nM)

| Compus | Cancer esofagian | | | Sarcom uterin | | Susceptibilitate P-gp |
|--------------|------------------|------|-------|---------------|---------------|-----------------------|
| | OE21 | OE32 | TE-8 | ME6-04 | ME6-SAD-4-Rvt | |
| Compusul (1) | 0.061 | 0.28 | 0.005 | 0.078 | 0.7 | 123 |

Figura 11

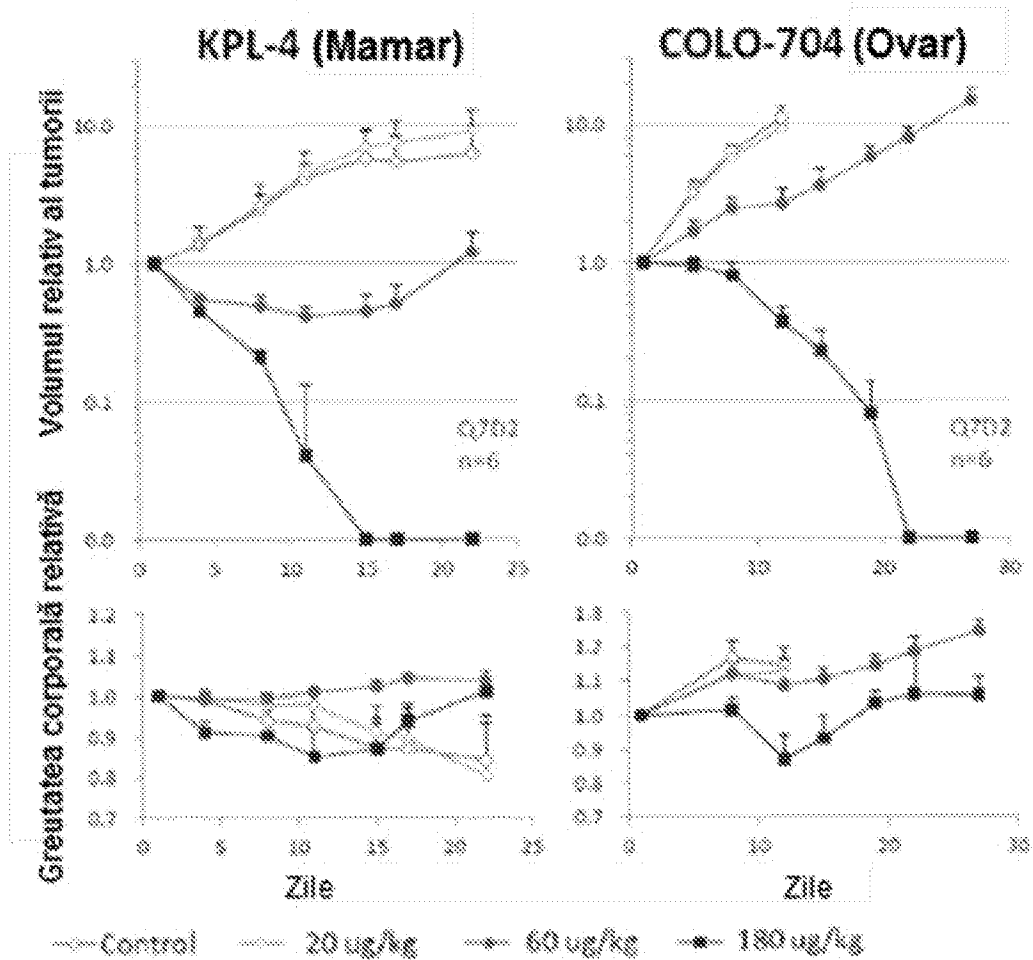


Figura 12

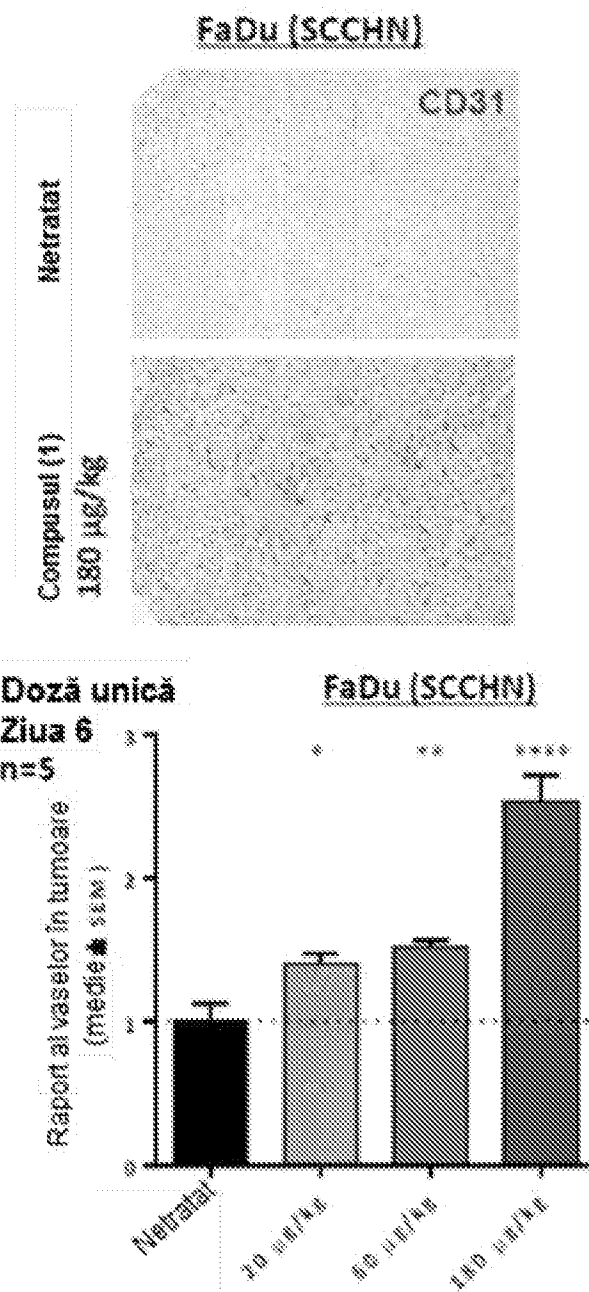


Figura 13

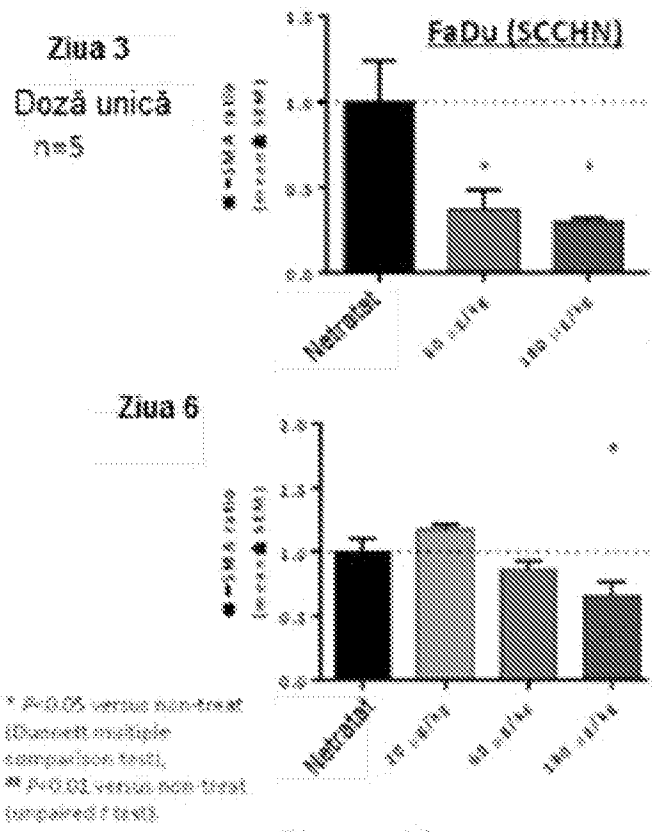
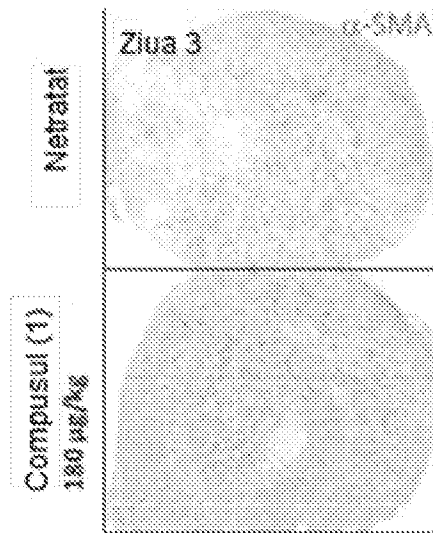


Figura 14

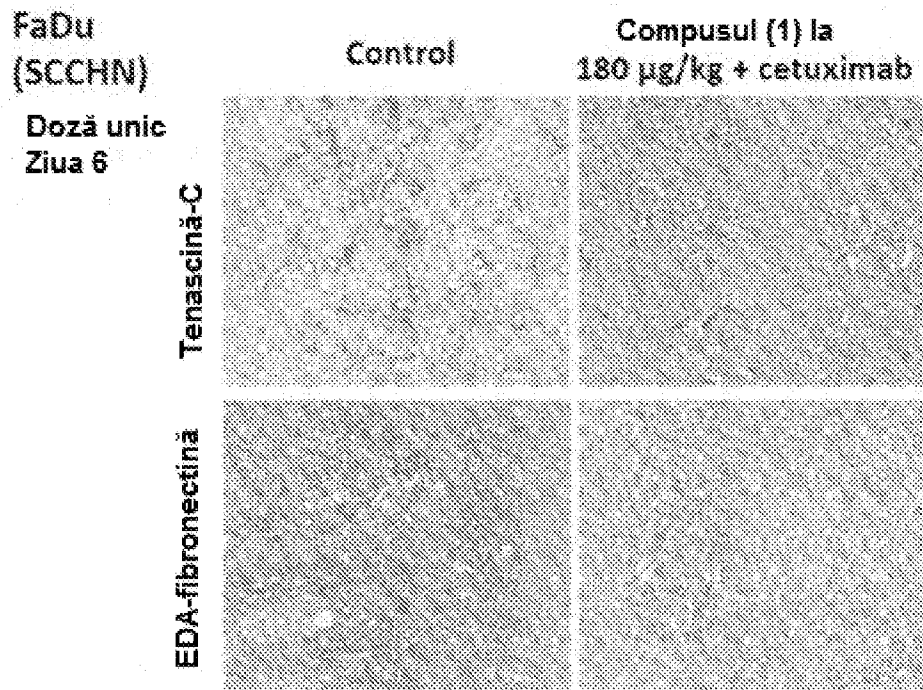


Figura 15

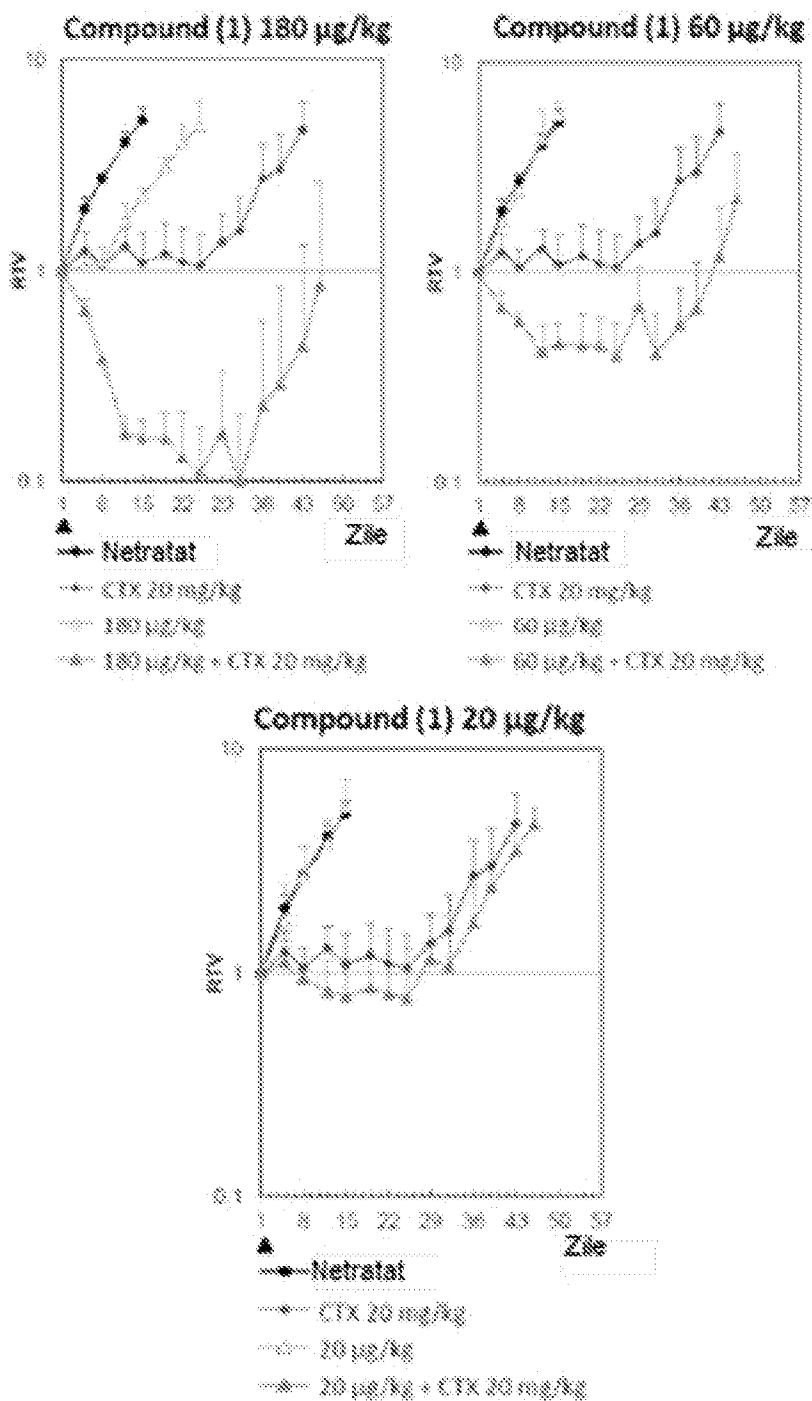


Figura 16

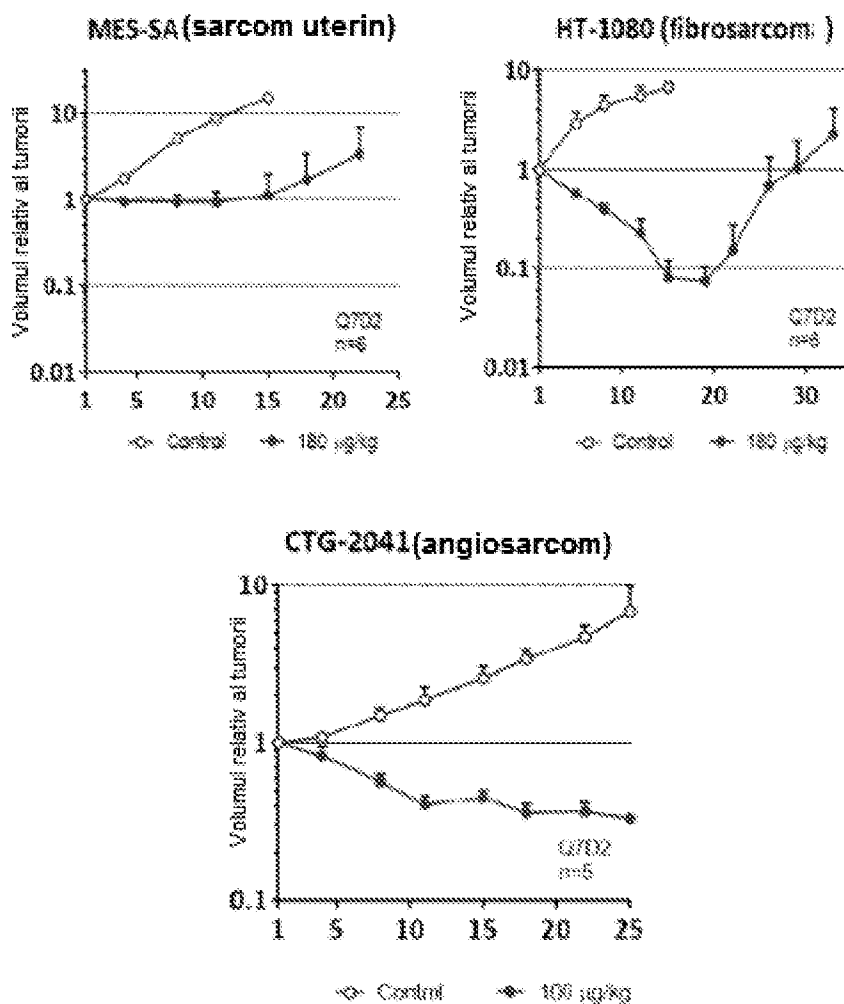


Figura 17

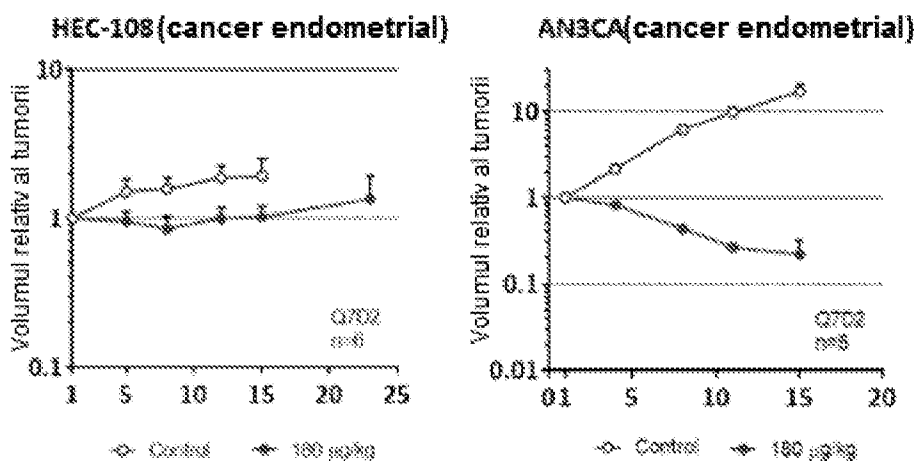


Figura 18