



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I863657 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：112141425 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 03 日

(51)Int. Cl. : C07D493/22 (2006.01) A61K31/335 (2006.01)
A61K31/357 (2006.01) A61K31/365 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01) A61K31/34 (2006.01)
A61K31/35 (2006.01)

(30)優先權：2017/04/05 美國 62/482,030
2017/06/29 美國 62/526,677
2017/11/15 美國 15/814,105
2017/11/15 美國 62/586,416

(71)申請人：哈佛大學校長及研究員協會 (美國) PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (US)
美國
日商衛材 R & D 企管股份有限公司 (日本) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：岸 義人 KISHI, YOSHITO (US) ; 吉良和信 KIRA, KAZUNOBU (JP) ; 伊藤憲 ITO, KEN (JP)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：
TW I781163B WO 2016/003975A1
WO 2016/176560A1

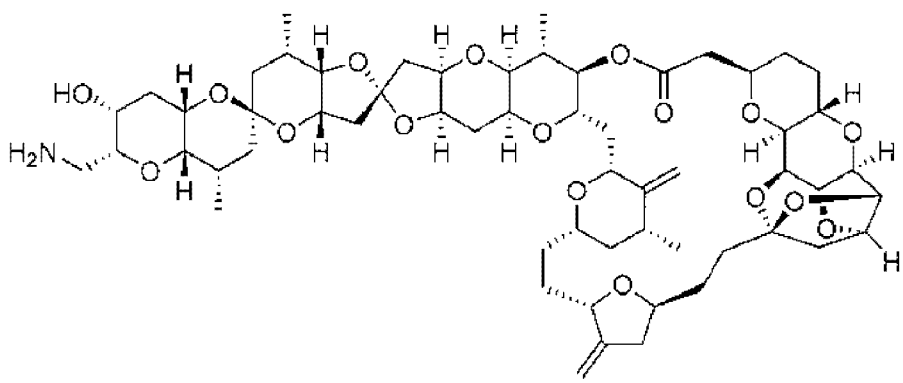
審查人員：謝敏哲

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：18 共 113 頁

(54)名稱
巨環化合物及其用途

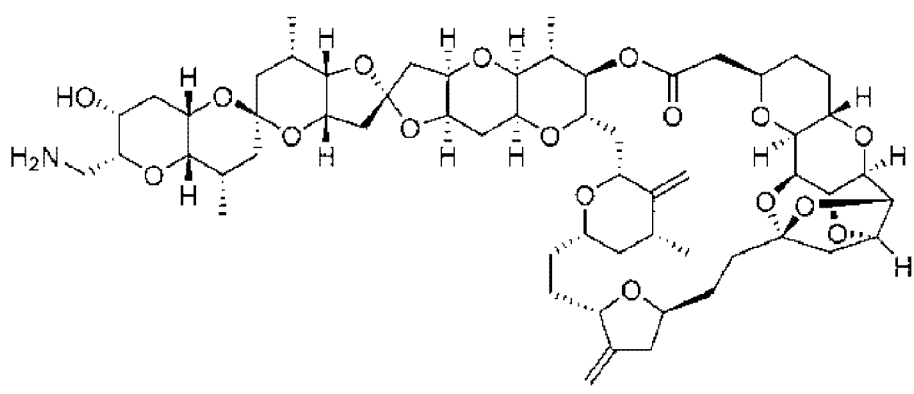
(57)摘要

本發明提供具有腫瘤血管重塑效應及/或抗 CAF (癌症相關纖維母細胞)活性之新穎化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽，其視情況於醫藥上可接受之載劑中；及其醫學用途。



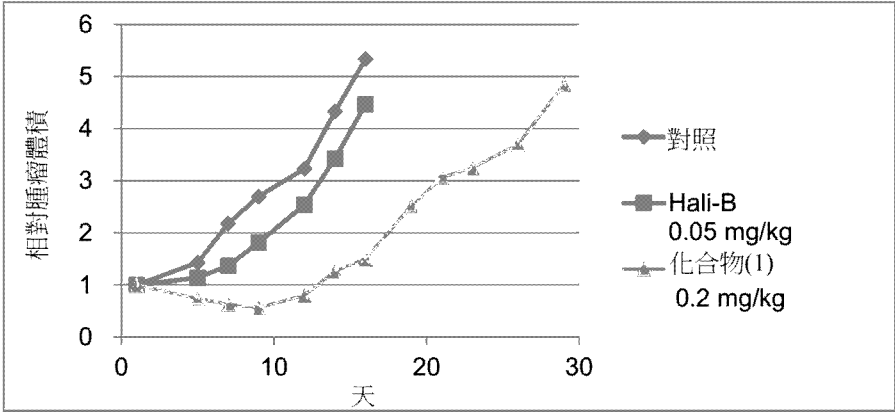
化合物(1)

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 carrier, and medical uses thereof.



Compound (1)

指定代表圖：

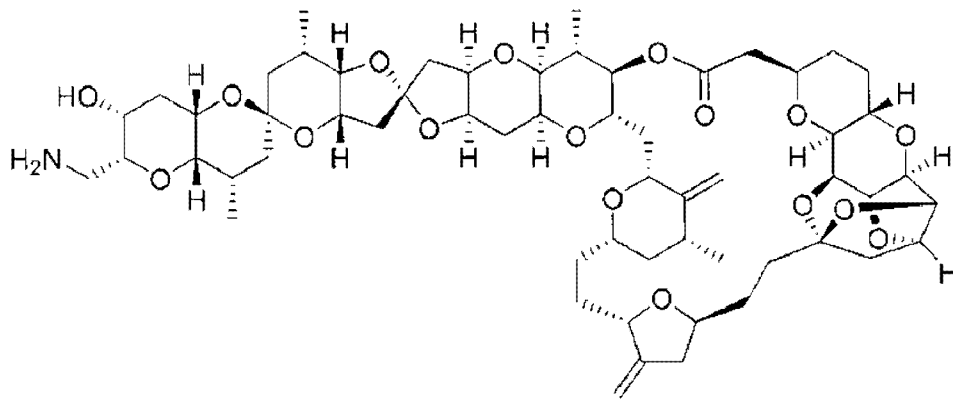


【圖1】

特徵化學式：

I863657

TW I863657 B





I863657

【發明摘要】

【中文發明名稱】

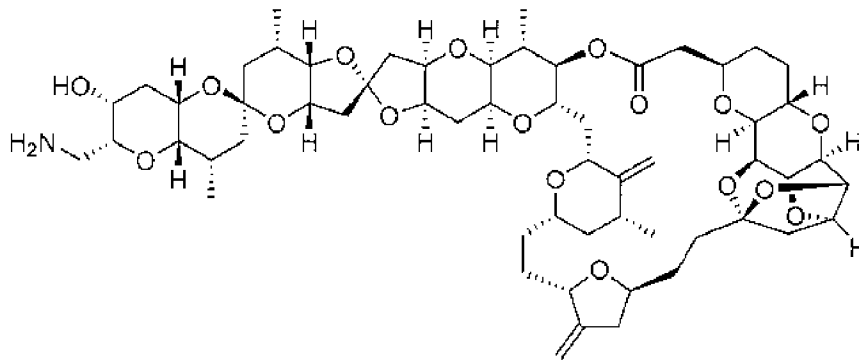
巨環化合物及其用途

【英文發明名稱】

MACROCYCLIC COMPOUND AND USES THEREOF

【中文】

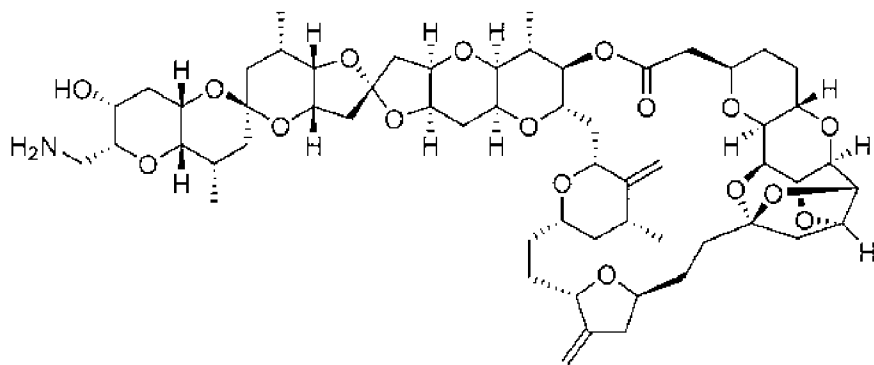
本發明提供具有腫瘤血管重塑效應及/或抗CAF (癌症相關纖維母細胞)活性之新穎化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽，其視情況於醫藥上可接受之載劑中；及其醫學用途。



化合物(1)

【英文】

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 carrier, and medical uses thereof.



Compound (1)

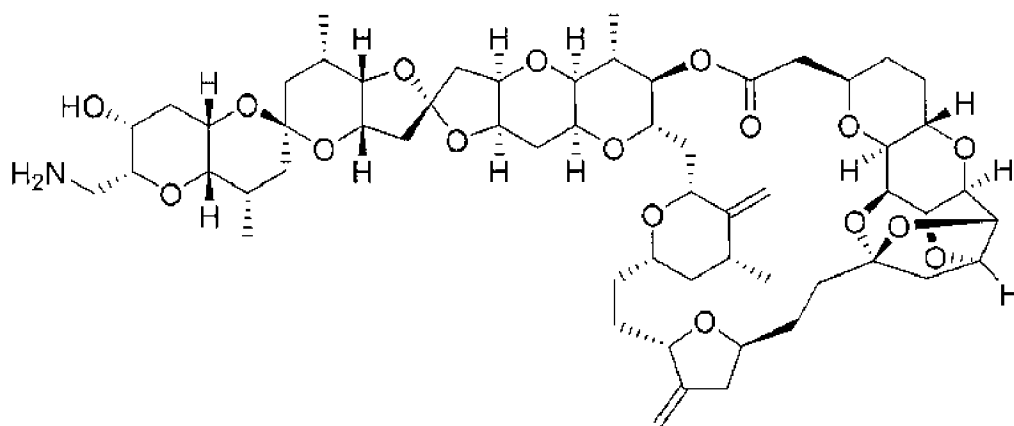
【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

巨環化合物及其用途

【英文發明名稱】

MACROCYCLIC COMPOUND AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明提供具有腫瘤血管重塑效應及抗CAF（癌症相關纖維母細胞）活性之新穎巨環化合物。該化合物可用於治療癌症或抑制個體中之腫瘤生長。

【先前技術】

軟海綿素(例如軟海綿素B)係最初自海綿黑色軟海綿(*Halichondria okadai*)分離出之抗癌劑(例如，參見D. Uemura等人，「Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge」 J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985))，且隨後在小軸海綿屬(*Axinella* sp.)、棕扁海綿(*Phakellia carteri*)及扁矛海綿屬(*Lissondendryx* sp.)中發現。軟海綿素B之全合成發表於1992年(例如，參見Y. Kishi等人，「Total Synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin B」 J. Am. Chem. Soc., 114, 3162 (1992))。軟海綿素B已展示在活體外抑制微管蛋白聚合、微管組裝、 β 5-微管蛋白交聯、GTP及長春鹼結合至微管蛋白及微管蛋白依賴性GTP水解，且已顯示活體外及活體內之抗癌性質(例如，參見Y. Hirata等人，「Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge」 Pure Appl. Chem., 58, 701 (1986)；Fodstad等人，「Comparative antitumor activities of halichondrins and vinblastine

against human tumor xenografts」 J. of Experimental Therapeutics Oncology 1996; 1: 119, 125)。

基於軟海綿素B開發之甲磺酸埃雷布林(eribulin mesylate，Halaven™) (例如，參見於1999年12月23日公開之國際公開案第WO 1999/065894號；於2005年12月15日公開之國際公開案第WO 2005/118565號；及W. Zheng等人，「Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B」 Bioorganic Medicinal Chemistry Letters 14, 5551-5554 (2004))目前在許多國家臨床使用以用於治療(例如)轉移性乳癌及晚期脂肪肉瘤。

其他闡述軟海綿素之專利公開案包括1995年7月25日頒予Kishi等人之美國專利第5,436,238號；1994年8月16日頒予Kishi等人之美國專利第5,338,865號；及由Kishi等人提出申請之WO 2016/003975，所有專利均受讓給哈佛學院的校長與教職員(President and Fellows of Harvard College)。

亦參見(例如)美國專利第5,786,492號；美國專利第8,598,373號；美國專利第9,206,194號；美國專利第9,469,651號；WO/2009/124237A1；WO/1993/017690A1；WO/2012/147900A1；美國專利第7,982,060號；美國專利第8,618,313號；美國專利第9,303,050號；美國專利第8,093,410號；美國專利第8,350,067號；美國專利第8,975,422號；美國專利第8,987,479號；美國專利第8,203,010號；美國專利第8,445,701號；美國專利第8,884,031號；美國專利第RE45,324號；美國專利第8,927,597號；美國專利第9,382,262號；美國專利第9,303,039號；WO/2009/046308A1；WO/2006/076100A3；WO/2006/076100A2；WO/2015/085193A1；

WO/2016/176560A1；美國專利第9,278,979號；美國專利第9,029,573號；WO/2011/094339A1；WO/2016/179607A1；WO/2009/064029A1；WO/2013/142999A1；WO/2015/066729A1；WO/2016/038624A1；及WO/2015/000070A1。

在多種實體腫瘤中廣泛發現之癌症相關纖維母細胞(CAF)係基質細胞。眾所周知，CAF在血管生成、侵襲及轉移方面起重要作用。據報導，在(例如)侵襲性乳癌(例如，參見M. Yamashita等人，「Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome」Breast Cancer 19, 170, 2012)及食管腺癌(例如，參見T. J. Underwood等人，「Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in esophageal adenocarcinoma」Journal of Pathol., 235, 466, 2015)中，CAF之量與臨床預後之間存在緊密關聯。亦已報導，CAF在諸如乳癌(例如，參見P. Farmer等人，「A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer」Nature Medicine., 15(1), 68, 2009)及頭頸癌(例如，參見S. Schmitz 等人，「Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer」Oncotarget, 6 (33), 34288, 2015；Y. Matsuoka等人，「The tumor stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma」APMIS 123(3), 205, 2015)等多種腫瘤中與抗性相關聯。

已由此觀察到腫瘤血管重塑效應及抗CAF活性使得癌症微環境改

良，此有助於腫瘤治療。血管對於腫瘤之生長至關重要。腫瘤中之重構血管除達成減輕低氧以外，亦可將抗癌劑遞送至腫瘤。據報導，埃雷布林誘導之異常腫瘤血管系統重塑產生更具功能性之微環境，其可因消除內部腫瘤低氧而降低腫瘤之侵犯性。由於異常腫瘤微環境增強抗藥性及轉移兩者，因此埃雷布林明顯逆轉該等侵襲性特徵之能力可有助於其臨床益處(例如，參見Y. Funahashi等人，「Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models」Cancer Sci. 105 (2014), 1334-1342)。截至今日，尚未報導具有腫瘤血管重塑效應及抗CAF活性之抗癌藥物。

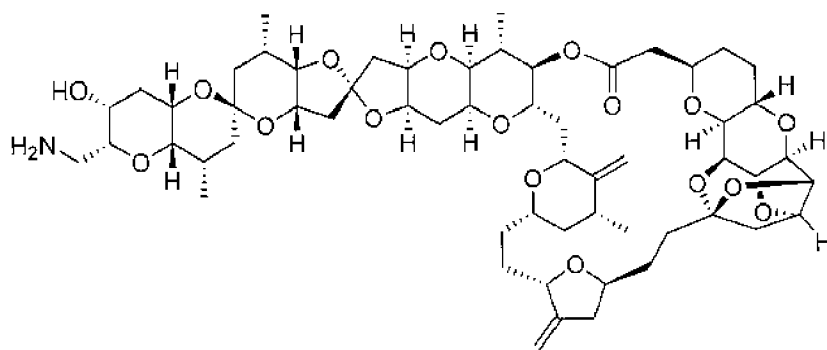
儘管已取得進展，但仍需要其他化合物來促進對腫瘤及癌症之研究及醫療照護。

【發明內容】

本發明係關於具有腫瘤血管重塑效應及抗CAF活性之巨環化合物(例如化合物(1))及其醫藥上可接受之鹽及其經同位素標記之衍生物以及其醫藥組合物。

本發明亦包括使用化合物(1)治療癌症之方法、可逆或不可逆地抑制細胞有絲分裂之方法及在活體外、活體內或個體中抑制腫瘤生長之方法。在另一態樣中，本發明提供套組，其包含化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或其醫藥組合物。

在一態樣中，本發明之特徵在於為化合物(1)之化合物：



化合物(1)，

及其醫藥上可接受之鹽；及其經同位素標記之衍生物。

在一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物。該等醫藥組合物可包含一或多種醫藥上可接受之賦形劑或載劑。該等醫藥組合物可進一步包含一或多種呈組合、交替或其他種類之同步療法之額外治療劑以達成治療之期望目標。

本發明之特徵亦在於製備化合物(1)或其中間體之方法。在本文中亦提供合成中間體作為本發明之一部分。

已發現，化合物(1)對腫瘤血管重塑具有有利的效應且具有抗CAF活性，如圖及實例中所展示。因此，化合物(1)在癌症(例如頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、乳癌、食管癌、子宮癌、卵巢癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、胃癌、小腸癌、膀胱癌、肉瘤、罕見癌症)之治療中具有潛在用途。

在另一態樣中，本發明提供利用化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物抑制個體、通常人類之將對具有腫瘤血管重塑效應及/或抗CAF活性之化合物有反應之任何腫瘤生長或癌症之方法。

化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其組合物可與為患者提供有益結果之任何其他活性劑組合投與。在某些實施例中，化合物(1)係與抗體(例如單株抗體)組合使用。在一個實施例中，化合物(1)係與免疫療法以組合、交替或其他同步療法方式使用，該免疫療法

係例如抗EGFR (表皮生長因子受體)抗體、抗HER2 (人類表皮生長因子受體)抗體、抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體，如下文中更詳細地闡述。

舉例而言，提供治療有需要之個體、通常人類之頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)之方法，其包含向該個體投與與抗EGFR (表皮生長因子受體)單株抗體(mAb)療法組合之有效量之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其組合物。在某些實施例中，抗EGFR (表皮生長因子受體) mAb係西妥昔單抗(cetuximab)。

作為另一實例，提供治療有需要之個體、通常人類之乳癌之方法，其包含向該個體投與與HER2 (人類表皮生長因子受體) mAb療法組合之有效量之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其組合物。在某些實施例中，HER2 (人類表皮生長因子受體) mAb係曲妥珠單抗(trastuzumab)。在其他實施例中，化合物(1)可與傳統化學療法(例如阿德里黴素(adriamycin)、環磷醯胺、紫杉醇等)或抗雌激素(例如選擇性雌激素調節劑(SERM)、選擇性雌激素降解劑(SERD)、部分或全部雌激素抑制劑(例如氟維司群(fulvestrant)))或CDK 4/6抑制劑(例如帕博西尼(palbociclib)(Pfizer))組合用於治療乳癌。

本發明之另一態樣提供化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，其在套組(可係劑型包裝)中可呈水合物、溶劑合物、多晶型物或其組合物之形式。本文所闡述之套組可包括單一劑量或多個劑量之該化合物或其醫藥組合物。本發明之套組可包括使用所提供治療性劑型之說明書(例如包括於該套組中之使用化合物或醫藥組合物之說明書)。

因此，本發明至少包括以下特徵：

(i) 化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，其

可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式；

(ii) 治療方法，其包括向個體(例如人類)投與有效量之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)以治療頭頸癌(例如頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、腺樣囊性癌)、乳癌(例如HER2陰性乳癌、三陰性乳癌)、食管癌(例如食管腺癌)、子宮癌(例如子宮肉瘤)、卵巢癌、結腸直腸癌、肉瘤(例如滑膜肉瘤、血管肉瘤、軟組織肉瘤、纖維肉瘤、子宮肉瘤)、膀胱癌(例如尿路上皮癌)、胃癌、小腸癌(例如小腸腺癌)、子宮內膜癌或罕見癌症；

(iii) 治療方法，其包括向個體(例如人類)投與有效量之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)以用於治療對血管重塑效應及/或抗CAF活性有反應之醫學病症(例如癌症或腫瘤)；

(iv) 化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)，其用於治療頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)、乳癌、食管癌、子宮癌、卵巢癌、結腸直腸癌、肉瘤、膀胱癌、胃癌、小腸癌、子宮內膜癌或罕見癌症；

(v) 化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)，其用於治療對血管重塑效應及/或抗CAF活性有反應之醫學病症(例如癌症或腫瘤)；

(vi) 化合物(1)之氙化衍生物；

(vii) 製造意欲用於治療或預防對血管重塑效應及/或抗CAF活性有反應之病症(例如癌症或腫瘤)之治療性用途之藥劑的方法，其特徵在於在

製造中使用上文所闡述之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)或活性化合物之實施例；

(viii) 呈實質上純(例如至少90%或95%)形式之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物；

(ix) 於醫藥上可接受之載劑或賦形劑中之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)之醫藥上可接受之組合物；

(x) 視情況於醫藥上可接受之載劑或賦形劑中之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物(其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式)之醫藥上可接受之劑型；

(xi) 治療本文所闡述病症之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，其中其藉助除血管重塑效應及/或抗CAF作用活性以外之機制起作用；及

(xii) 製造本文所闡述化合物及合成中之中間體之方法。

【圖式簡單說明】

併入本說明書中並構成本說明書之一部分之隨附圖式圖解說明本發明之若干實施例，並與該說明一起提供本發明之非限制性實例。

圖1顯示化合物(1)作為如藥理學測試實例4中所闡述之單一療法在小鼠中之FaDu皮下異種移植物模型(頭頸癌)中之抗腫瘤效應。

圖2顯示化合物(1)作為如藥理學測試實例5中所闡述之單一療法針對小鼠中之OSC-19皮下異種移植物模型(頭頸癌)之抗腫瘤活性。

圖3顯示化合物(1)作為如藥理學測試實例6中所闡述之單一療法針對

小鼠中之HCC-1806皮下異種移植(乳癌)模型之抗腫瘤活性。

圖4顯示化合物(1)如藥理學測試實例7中所闡述與西妥昔單抗組合在小鼠中之FaDu皮下異種移植模型中之抗腫瘤效應。

圖5顯示化合物(1)如藥理學測試實例8中所闡述與曲妥珠單抗組合在小鼠中之KPL-4皮下異種移植模型(乳癌)中之抗腫瘤活性。

圖6A-6B顯示化合物(1)在HSC-2正位移植小鼠模型中之抗腫瘤效應。圖6A. 裸小鼠在舌中植入螢光素酶轉導之HSC-2 (1×10^6 個細胞/點)。使用活體內成像系統(IVIS)分析螢光素酶轉導之HSC-2之量。數據顯示每一小鼠舌中之生物發光值。圖6B. 16隻小鼠之代表性生物發光影像。CDDP、CTX、CDDP+CTX係用作比較物，其目前用於SCCHN癌症患者治療之治療中。CDDP=順鉑，CTX=西妥昔單抗。

圖7A-7B顯示化合物(1)與西妥昔單抗組合在HSC-2正位移植小鼠模型中之存活優點。圖7A. 裸小鼠在舌中植入螢光素酶轉導之HSC-2 (1×10^6 個細胞/點)。數據顯示直至藥物治療後第100天之存活曲線(n=16)。* $P < 0.0001$ ，相對於單獨之化合物(1)或CTX (對數秩(Mantel-Cox)測試)。圖7B. 使用活體內成像系統(IVIS)分析螢光素酶轉導之HSC-2之量。在第100天化合物(1) + CTX組合組之10隻存活小鼠之生物發光影像。RBW=相對體重。CDDP=順鉑，CTX=西妥昔單抗。

圖8A-8B顯示化合物(1)與放射療法組合在FaDu小鼠異種移植模型中之抗腫瘤效應。圖8A. 裸小鼠在右大腿中皮下植入螢光素酶轉導之FaDu (5×10^6 個細胞/點)。接種後13天，將小鼠隨機分配(n=6)，且在第1天及第8天以90 $\mu\text{g/kg}$ 靜脈內注射化合物(1)，且在第4天及第11天有或沒有18 Gy之RT。使用活體內成像系統(IVIS)分析螢光素酶轉導之FaDu之量。數據

顯示第1天之平均相對生物發光值及SEM (n=6)。SEM=平均值之標準誤差。* $P < 0.05$ ，相對於在第29天未經治療（不成對t-測試）。圖8B. 在第29天每一群組6隻小鼠之代表性生物發光影像。RT=放射療法。

圖9顯示化合物(1)與抗mPD-1抗體組合之抗腫瘤活性。將CT26 s.c. 同基因小鼠模型(結腸癌)用化合物(1)及抗mPD-1抗體分別以Q7D時間表及一週兩次時間表治療3週。結果顯示腫瘤體積(mm^3)之平均值 $\pm$ SEM (n=8)。

圖10A顯示無細胞微管蛋白聚合分析。化合物(1)對微管蛋白聚合具有抑制活性。圖10B顯示微管動力學分析。化合物(1)對微管動力學亦具有抑制活性。

圖11顯示化合物(1)在食管癌(OE21、OE33及TE-8)及子宮癌(MES-SA、MES-SA/Dx5-Rx1)細胞系中係強效抗增殖劑。

圖12顯示化合物(1)作為單一療法在乳癌及卵巢癌(分別KPL-4及COLO-704)之皮下異種移植物模型中具有強效抗腫瘤活性。

圖13顯示化合物(1)對腫瘤微環境之效應。如所示，化合物(1)增加微血管密度。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$ ，相對於未經治療(鄧尼特(Dunnett)多重比較測試)。

圖14顯示化合物(1)對腫瘤微環境之效應。如所示，化合物(1)降低 α -SMA陽性CAF。

圖15顯示化合物(1)在FaDu皮下異種移植物模型中減少來自CAF之ECM蛋白。在第1天單次投與化合物(1) 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +西妥昔單抗之後，在第6天收集FaDu異種移植物腫瘤。

圖16顯示化合物(1)在FaDu皮下異種移植物模型中展現與西妥昔單抗

之劑量依賴性組合效應。單一劑量， $n = 6$ 。在第1天在FaDu異種移植物模型中投與化合物(1)及西妥昔單抗(CTX)。

圖17顯示作為單一療法在小鼠中之軟組織肉瘤異種移植物模型中之抗腫瘤效應。顯示MES-SA (人類子宮肉瘤)、HT-1080 (人類纖維肉瘤)及CTG-2041 (人類血管肉瘤)。

圖18顯示作為單一療法在小鼠中之子宮內膜癌異種移植物模型中之抗腫瘤效應。顯示HEC-108及AN3CA (子宮內膜癌)。

【實施方式】

相關申請案

本申請案根據35 U.S.C. § 119(e)主張於2017年4月5日提出申請之美國臨時專利申請案U.S.S.N. 62/482,030、於2017年6月29日提出申請之美國臨時專利申請案U.S.S.N. 62/526,677及於2017年11月15日提出申請之美國臨時專利申請案U.S.S.N. 62/586,416且根據35 U.S.C. § 120主張於2017年11月15日提出申請之美國專利申請案U.S.S.N. 15/814,105之優先權，其每一者之全部內容均係以引用的方式併入本文中。

定義

如本文所使用，術語「鹽」係指任何及所有鹽，且涵蓋醫藥上可接受之鹽。術語「醫藥上可接受之鹽」意指在合理醫學判斷範圍內適用於接觸人類及較低級動物組織而無過度毒性、刺激、過敏性反應及諸如此類且與合理益處/風險比相稱之彼等鹽。醫藥上可接受之鹽為業內所熟知。舉例而言，Berge等人在*J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19 (其係以引用的方式併入本文中)中詳細闡述醫藥上可接受之鹽。本發明化合物之醫藥上可接受之鹽包括衍生自適宜無機及有機酸及鹼之彼等。醫藥上可接

受之無毒酸加成鹽之實例係胺基與無機酸(例如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸及過氯酸)或與有機酸(例如乙酸、草酸、馬來酸、酒石酸、檸檬酸、琥珀酸或丙二酸)或藉由使用業內已知之其他方法(例如離子交換)形成之鹽。其他醫藥上可接受之鹽包括己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天門冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、富馬酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、葡萄糖酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、新戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、對甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及諸如此類。衍生自適當鹼之鹽包括鹼金屬鹽、鹼土金屬鹽、銨鹽及 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4^-$ 鹽。代表性鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽包括鈉鹽、鋰鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽及諸如此類。在適當時，其他醫藥上可接受之鹽包括無毒銨、四級銨及胺陽離子，其係使用諸如鹵離子、氫氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低碳數烷基磺酸根及芳基磺酸根等相對離子來形成。亦提供化合物(1)且可作為游離鹼投與。

亦應理解，具有相同分子式但其原子之鍵結的性質或順序不同或其原子空間排列不同之化合物係稱為「異構物」。原子空間排列不同之異構物係稱為「立體異構物」。

術語「組合物」與「調配物」可互換使用。

預期投與之「個體」係指人類(即，任何年齡組之男性或女性，例如小兒個體(例如嬰兒、兒童或青少年)或成年個體(例如年輕人、中年人或老年人))或非人類動物。在某些實施例中，非人類動物係哺乳動物(例如靈長類動物(例如食蟹猴(*cynomolgus monkey*)或恒河猴(*rhesus monkey*))、商業有關哺乳動物(例如牛、豬、馬、綿羊、山羊、貓或狗)或禽類(例如商業有關禽類，例如雞、鴨、鵝或火雞))。在某些實施例中，非人類動物係魚類、爬行動物或兩棲動物。非人類動物可係處於任何發育階段之雄性或雌性。非人類動物可係轉基因動物或經遺傳改造動物。術語「患者」係指需要治療疾病之人類個體。

術語「投與(administer、administering或administration)」係指將本文所闡述之化合物或其組合物植入、吸收、攝取、注射、吸入或以其他方式引入至個體中或個體上。

術語「治療(treatment、treat及treating)」係指逆轉、減輕、延遲本文所闡述疾病之發作或抑制其進展。在一些實施例中，治療可在已出現或已觀察到疾病之一或多種徵象或症狀之後投與。在其他實施例中，治療可在不存在疾病之徵象或症狀下投與。舉例而言，治療可在症狀發作之前投與易感個體。亦可在症狀已解決後繼續治療以(例如)延遲或阻止復發。

本文所闡述化合物之「有效量」係指足以引發期望生物學反應之量。本文所闡述化合物之有效量可端視於諸如以下等因素而有所變化：期望生物學終點、化合物之藥物動力學、所治療之病狀、投與模式及個體之年齡及健康狀況。在某些實施例中，有效量係治療有效量。或者，在單獨之方法或用途中，在經指示且有效之情形下，本發明可用作預防性治療。在某些實施例中，有效量係本文所闡述之化合物於單一劑量中之量。在某

些實施例中，有效量係本文所闡述之化合物於多個劑量中之組含量。

本文所闡述化合物之「治療有效量」係足以在病狀之治療中提供治療益處或足以延遲或使與該病狀相關之一或多種症狀最小化之量。化合物之治療有效量意指治療劑單獨或與其他療法組合在病狀之治療中提供治療益處之量。術語「治療有效量」可涵蓋改良總體療法、降低或避免病狀之症狀、徵象或病因及/或增強另一治療劑之治療效能之量。在某些實施例中，治療有效量係足以治療所闡述之任何疾病或病狀之量。

如本文所使用，「抑制(inhibition、inhibiting、inhibit)」及「抑制劑」及諸如此類係指化合物降低、減緩、停止或阻止生物過程(例如腫瘤生長)之活性的能力。在某些實施例中，抑制係約45%至50%。在某些實施例中，抑制係約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99.9%或100%。

術語「贅瘤」及「腫瘤」在本文中可互換使用且係指異常組織團塊，其中該團塊之生長超過正常組織之生長且與正常組織之生長不協調。贅瘤或腫瘤可係「良性」或「惡性」的，此取決於以下特徵：細胞分化之程度(包括形態學及功能性)、生長速率、局部侵襲及轉移。「良性贅瘤」通常分化良好，具有在特性上慢於惡性贅瘤之生長且保持侷限於起源部位。另外，良性贅瘤不具有浸潤、侵襲或轉移至遠處部位之能力。相比之下，「惡性贅瘤」通常分化不良(退行發育)且在特性上具有伴隨進行性浸潤、侵襲及破壞周圍組織之快速生長。此外，惡性贅瘤通常具有轉移至遠處部分之能力。術語「轉移(metastasis、metastatic或metastasize)」係指癌細胞自原發性或原始腫瘤擴散或遷移至另一器官或組織，且通常可藉由

原發性或原始腫瘤之組織類型之「繼發性腫瘤」或「繼發性細胞團塊」之存在而非該繼發性(轉移)腫瘤所在之器官或組織來鑑別。

術語「癌症」係指一類特徵在於不受控制地增殖且具有浸潤及破壞正常身體組織之能力的異常細胞發育之疾病。

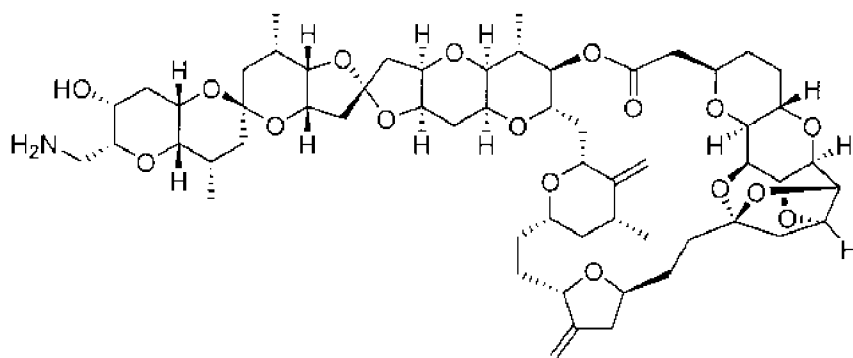
術語「罕見癌症」係指在相對較少數量之患者中發生之癌症。罕見癌症包括(但不限於)肉瘤(例如軟組織肉瘤、脂肪肉瘤、子宮肉瘤、平滑肌肉瘤、黏液性纖維肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、尤恩氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、滑膜肉瘤、橫紋肌肉瘤)、惡性淋巴瘤、胸腺癌(例如胸腺瘤)、間皮瘤、胃腸基質瘤(GIST)、神經內分泌癌、眼癌、腦瘤、骨軟組織瘤、皮膚癌及生殖細胞瘤。

術語「抗癌劑」係指可用於治療個體之癌症(例如抑制個體之癌症或腫瘤生長)之任何治療劑。抗癌劑涵蓋生物治療抗癌劑以及化學治療劑。

某些實施例之詳細說明

下文將參照本發明之實施例及諸如此類來詳細地闡述本發明。本發明提供化合物(例如化合物(1))，及其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，及其醫藥組合物。本發明亦提供抑制個體中之腫瘤生長及/或治療癌症之方法，其包含向該個體投與有效量之本文中所提供之化合物或組合物。該化合物或組合物可作為單一療法或與另一療法組合投與，如本文所闡述。在另一態樣中，本發明提供製備化合物(1)之方法及可用於該目的之合成中間體。

本發明包括以下結構之化合物：



化合物(1)，

或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，其可視情況呈水合物、溶劑合物或多晶型物之形式，其視情況於醫藥上可接受之載劑或賦形劑中。

化合物(1)可作為晶體多晶型物存在，且本發明之化合物可呈單晶形式或兩種或更多種晶體形式之混合物中之任一者。化合物(1)可呈非晶型，或可係酸酐或溶劑合物，例如水合物。

本發明包括化合物(1)之經同位素標記之衍生物及其醫藥上可接受之鹽。經同位素標記之化合物等效於化合物(1)，唯一或多個原子由具有與自然界中所通常發現之彼等不同之原子質量或質量數之原子替代。可併入至本發明化合物中之同位素之實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟、碘、溴及氯之同位素，例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{123}I 及 ^{125}I 。

經同位素標記之化合物(例如併入諸如 ^3H 及/或 ^{14}C 等放射性同位素之化合物)可用於藥物及/或基質之組織分佈分析。同位素 ^3H 及 ^{14}C 視為可用的，此乃因該等同位素可易於製備並檢測。同位素 ^{11}C 及 ^{18}F 可用於PET (正電子發射斷層攝影術)中。同位素 ^{125}I 視為可用於SPECT (單光子發射電腦斷層攝影)中，且可用於腦成像中。由較重同位素(例如 ^2H)替代由於其較高之代謝穩定性在治療(例如，延長活體內半衰期或降低必需劑量)方面產生一些優點，且因此在給定情況下視為係可用的。經同位素標記之化合

物可藉由使用容易獲得之經同位素標記之試劑而非未經同位素標記之試劑並藉由實施下文中所闡述方案及/或實例中所揭示之製程類似地製備。

化合物(1)可用作用於捕獲具生物活性之低分子量化合物之靶蛋白的化學探針。具體而言，本發明之化合物可藉由*J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.* 第51卷, 第5, 2003期, 第492-498頁、W02007/139149或諸如此類中所闡述之方法，藉由將標記基團、連接體或諸如此類引入至除化合物之活性表現所必需之結構部位以外的部分中而轉變成親和層析探針、光親和性探針或諸如此類。

此一化學探針中所使用之標記基團、連接體或諸如此類之實例包括屬以下群組(1)至(5)之基團。(1) 蛋白質標記基團，例如光親和性標記基團(例如苯甲醯基、二苯甲酮基團、疊氮基團、羰基疊氮基團、二氮雜環丙烷基團、烯酮基團、重氮基團及硝基)及化學親和性基團(例如其中 α 碳原子由鹵素原子取代之酮基、胺甲醯基、酯基、烷硫基、 α,β -不飽和酮、酯或諸如此類之邁克爾(Michael)受體及環氧乙烷基團)；(2) 可裂解之連接體，例如S-S、O-Si-O、單醣(例如葡萄糖基或半乳糖基)及二醣(例如乳糖)以及可由酶反應裂解之寡肽連接體；(3) 採捕標籤(fishing tag)基團，例如生物素及3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮雜-4-硼-s-二環戊二烯并苯-3-基)丙醯基；(4) 放射性標記基團，例如 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^3H 及 ^{14}C ；螢光標記基團，例如螢光黃、玫瑰紅、丹磺醯基、傘形酮、7-硝基呋啉基及3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮雜-4-硼-s-二環戊二烯并苯-3-基)丙醯基；化學發光基團，例如螢光素及發光胺；及能夠檢測重金屬離子(例如鑷系金屬離子及鐳離子)之標記物；及(5) 鍵結至諸如玻璃珠粒、玻璃床、微升板、瓊脂糖珠粒、瓊脂糖床、聚苯乙烯珠粒、聚苯乙烯床、耐綸

珠粒及耐綸床等固相載劑之基團。

藉由上文所提及之文獻或諸如此類中之任一者中所闡述之方法藉由將選自上文所述群組(1)至(5)之標記基團或諸如此類引入至本發明之化合物中所製備之探針可用作用於鑑別可用於研究新穎潛在藥物靶標之標記物蛋白之化學探針。

本文中所使用「鹽」之實例包括與無機酸之鹽、與有機酸之鹽及與酸性胺基酸之鹽，且尤其醫藥上可接受之鹽較佳。此外，本發明之化合物之鹽囊括其醫藥上可接受之鹽之酸酐及醫藥上可接受之鹽之溶劑合物(例如水合物)。與無機酸之鹽之較佳實例包括與鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及諸如此類之鹽，且與有機酸之鹽之較佳實例包括與乙酸、琥珀酸、富馬酸、馬來酸、酒石酸、檸檬酸、乳酸、硬脂酸、苯甲酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、對甲苯磺酸及諸如此類之鹽。與酸性胺基酸之鹽之較佳實例包括與天冬胺酸及麩胺酸及諸如此類之鹽。

在其中本發明之化合物(1)係作為化合物(1)之鹽或化合物(1)之水合物獲得之情形下，該鹽及該水合物可藉由習用方法轉化成化合物(1)之游離體。

醫藥組合物、套組及投與

本發明提供醫藥組合物，其包含化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物，及醫藥上可接受之賦形劑。在某些實施例中，本文所闡述之化合物或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物係以有效量提供於醫藥組合物(例如治療有效量)中。

本文所闡述之醫藥組合物可藉由藥理學技術所已知之任何方法來製備。一般而言，此等製備方法包括使化合物(1) (即，「活性成分」)與載

劑或賦形劑及/或一或多種其他輔助性成分締合，且然後若需要及/或期望，則將產品成型及/或包裝成期望單一劑量或多劑量單元。本發明之醫藥組合物可根據已知方法來製備，例如日本藥典(*Japanese Pharmacopoeia*)第16版、美國藥典(*United States Pharmacopoeia*)及歐洲藥典(*European Pharmacopoeia*)第9版之製備一般規則中所闡述之方法。端視劑型而定，本發明之醫藥組合物可適當地投與患者。

醫藥組合物可以散裝、作為單一單位劑量及/或作為複數個單一單位劑量來製備、包裝及/或出售。「單位劑量」係包含預定量之活性成分之醫藥組合物之離散量。活性成分之量通常等於將向個體投與之活性成分之劑量及/或此一劑量之便捷分率(例如此一劑量之二分之一或三分之一)。

本文所闡述醫藥組合物中之活性成分、醫藥上可接受之賦形劑及/或任何其他成分之相對量將端視於所治療個體之屬性(identity)、體型及/或狀況且進一步端視於組合物之投與途徑而有所變化。組合物可包含介於0.1%與100% (w/w)之間之活性成分。

所提供醫藥組合物之製造中所使用之醫藥上可接受之賦形劑包括惰性稀釋劑、分散劑及/或造粒劑、表面活性劑及/或乳化劑、崩解劑、黏合劑、防腐劑、緩衝劑、潤滑劑及/或油。組合物中亦可存在賦形劑(例如可可脂及栓劑蠟)、著色劑、包衣劑、甜味劑、矯味劑及芳香劑。

本文中所提供之化合物通常調配為劑量單位形式以便於投與及統一劑量。然而，應理解，本文所闡述組合物之總日用量將由醫師在合理之醫學判斷範圍內確定。任何特定個體或生物體之具體治療有效劑量將取決於多種因素，包括所治療之疾病及病症之嚴重程度；所用特定活性成分之

活性；所用特定組合物；個體之年齡、體重、一般健康狀況、性別及飲食；所用特定活性成分之投與時間、投與途徑及排泄速度；治療之持續時間；與所用特定活性成分組合或同時使用之藥物；以及醫學技術中所熟知之類似因素。

本文中所提供之本發明之化合物(化合物(1))及其組合物可藉由任何途徑投與，包括經腸(例如經口)、非經腸、靜脈內、肌內、動脈內、髓內、鞘內、皮下、室內、經皮、皮膚內、經直腸、陰道內、腹膜內、局部(如藉由粉末、軟膏劑、乳霜劑及/或滴劑)、經黏膜、經鼻、經頰、舌下；藉由氣管內滴注、支氣管滴注及/或吸入；及/或作為經口噴霧劑、經鼻噴霧劑及/或氣溶膠。具體涵蓋之途徑係經口投與、靜脈內投與(例如，全身性靜脈內注射)、經由血液及/或淋巴供應之局部投與及/或直接投與至受影響部位。一般而言，最適當之投與途徑將取決於多種因素，包括藥劑之性質(例如，其在胃腸道環境中之穩定性)及/或個體之狀況(例如，個體是否能夠耐受經口投與)。

達成有效量所需之化合物(1)之準確量將在個體之間有所不同，此取決於(例如)個體之物種、年齡及一般狀況、副作用或病症之嚴重程度、具體化合物之屬性、投與模式及諸如此類。有效量可包括於單一劑量(例如單一經口劑量)或多個劑量(例如多個經口劑量)中。在某些實施例中，當將多個劑量投與個體或施加至組織或細胞時，該多個劑量中之任兩個劑量包括不同或實質上相同量之本文所闡述之化合物。在某些實施例中，當將多個劑量投與個體或施加至組織或細胞時，在非限制性實例中，向個體投與多個劑量或將多個劑量施加至組織或細胞之頻率可係一天三劑、一天兩劑、一天一劑、每隔一天一劑、每隔兩天一劑、每週一劑、每兩週一劑

週、每三週一劑或每四週一劑或甚至使用藥物遞送裝置在選定時間段內緩慢劑量控制遞送。在某些實施例中，向個體投與多個劑量或將多個劑量施加至組織或細胞之頻率係每天一劑。在某些實施例中，向個體投與多個劑量或將多個劑量施加至組織或細胞之頻率係每天兩劑。在某些實施例中，向個體投與多個劑量或將多個劑量施加至組織或細胞之頻率係每天三劑。在某些實施例中，當將多個劑量投與個體或施加至組織或細胞時，該多個劑量之第一劑與最後一劑之間之持續時間係約或至少一天、兩天、四天、一週、兩週、三週、一個月、兩個月、三個月、四個月、六個月、九個月、一年、兩年、三年、四年、五年、七年、十年、十五年、二十年或個體、組織或細胞之壽命。在某些實施例中，該多個劑量之第一劑與最後一劑之間之持續時間係約或至少三個月、六個月或一年。在某些實施例中，該多個劑量之第一劑與最後一劑之間之持續時間係個體、組織或細胞之壽命。在某些實施例中，本文所闡述之劑量(例如多個劑量之單一劑量或任何劑量)獨立地包括介於0.001 mg/kg與0.01 mg/kg之間、介於0.01 mg/kg與0.1 mg/kg之間或介於0.1 mg/kg與1 mg/kg之間之化合物(1) (包括端值)。實例係在劑型中具有至少約0.01 mg、0.05 mg、0.1 mg、0.5 mg、1 mg、1.5 mg、2 mg、2.5 mg、3 mg、3.5 mg、4 mg、4.5 mg、5 mg、10 mg、5 mg、20 mg、25 mg或50 mg之活性化合物或其鹽之劑型。

如本文所闡述之劑量範圍提供向成人投與所提供之醫藥組合物之指導。欲投與(例如)兒童或青少年之量可由開業醫師或熟習此項技術者確定，且可低於投與成人之量或與投與成人之量相同。

本揭示內容亦涵蓋套組(例如醫藥包裝)。所提供之套組可包含醫藥組合物或化合物(1)及容器(例如小瓶、安瓿(ampule)、瓶、注射器及/或分配

器包裝或其他適宜容器)。在一些實施例中，所提供之套組可視情況進一步包括第二容器，其包含用於稀釋或懸浮醫藥組合物或化合物(1)之醫藥賦形劑。在一些實施例中，將第一容器及第二容器中所提供之醫藥組合物或化合物(1)組合以形成一個單位劑型。本文所闡述之套組可包括一或多種本文所闡述之額外醫藥劑作為單獨之組合物。

治療方法及用途

如本文中所示，化合物(1)具有顯著之腫瘤血管重塑效應及抗CAF活性，且因此，其具有用於治療癌症及/或抑制腫瘤生長之潛在用途。

本文中提供治療個體之癌症之方法，該方法包含向該個體投與有效量之化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物。本發明亦提供化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物，其用於治療個體之癌症。本發明亦提供化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物之用途，其用於製造用於治療癌症之藥劑。

本文中亦提供抑制個體中腫瘤生長之方法，該方法包含向該個體投與化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物。本文中亦提供化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物，其用於抑制個體中之腫瘤生長。本發明亦提供化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物之用途，其用於製造用於抑制腫瘤生長之藥劑。

在本文中所提供之方法及用途之某些實施例中，癌症係頭頸癌、乳癌、食管癌、子宮癌、卵巢癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、胃癌、小腸癌、膀胱癌或肉瘤。

在本文中所提供之方法及用途之某些實施例中，癌症係頭頸癌(例如頭頸部鱗狀細胞癌、口腔癌、喉癌、唾液腺癌症、舌癌、腺樣囊性癌)。在某些實施例中，癌症係頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)。在某些實施例中，癌症係腺樣囊性癌。在某些實施例中，癌症係乳癌(例如HER2陽性乳癌、三陰性乳癌)。在某些實施例中，癌症係HER2陽性乳癌。在某些實施例中，癌症係三陰性型乳癌。在某些實施例中，癌症係結腸直腸癌(例如結腸癌)。在某些實施例中，癌症係結腸癌。在某些實施例中，癌症係食管癌(例如食管腺癌)。在某些實施例中，癌症係食管腺癌。在某些實施例中，癌症係子宮癌(例如子宮肉瘤)。在某些實施例中，癌症係子宮肉瘤。在某些實施例中，癌症係卵巢癌。在某些實施例中，癌症係肉瘤(例如子宮肉瘤、纖維肉瘤、血管肉瘤、滑膜肉瘤、軟組織癌)。在某些實施例中，癌症係纖維肉瘤。在某些實施例中，癌症係血管肉瘤。在某些實施例中，癌症係滑膜肉瘤。在某些實施例中，癌症係軟組織癌。在某些實施例中，癌症係胃癌。在某些實施例中，癌症係腸癌(例如小腸癌、小腸腺癌)。在某些實施例中，癌症係小腸癌。在某些實施例中，癌症係小腸腺癌。在某些實施例中，癌症係膀胱癌(例如尿路上皮癌)。在某些實施例中，癌症係尿路上皮癌。在某些實施例中，癌症係子宮內膜癌。在某些實施例中，癌症係罕見癌症。

組合療法

除作為單一療法投與以外，化合物(1)可與其他治療劑或治療方式組合投與。在某些實施例中，額外治療劑係抗體。在某些實施例中，額外治療劑係單株抗體。本發明之化合物可與另一治療劑組合投與，該另一治療劑係例如抗EGFR療法、抗HER2療法、抗PD-1療法、抗PD-L1療法或輻

照療法。

在某些實施例中，化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物係與抗EGFR療法(例如抗EGFR單株抗體(mAb)，例如西妥昔單抗)組合投與。在某些實施例中，抗EGFR療法係抗EGFR抗體。舉例而言，本文中提供治療個體之頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)之方法，其包含向該個體投與化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物與抗EGFR(表皮生長因子受體)mAb療法之組合。在某些實施例中，抗EGFR mAb係西妥昔單抗(CTX)。

在某些實施例中，化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物係與抗HER2療法(例如抗HER2單株抗體(mAb)，例如曲妥珠單抗)組合投與。在某些實施例中，抗HER2療法係抗HER2抗體。舉例而言，本文中提供治療有需要之個體之乳癌的方法，其包含向該個體投與化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其組合物與HER2(人類表皮生長因子受體)mAb療法之組合。在某些實施例中，抗HER2 mAb係曲妥珠單抗。

在某些實施例中，化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物係與抗PD-1或抗PD-L1療法(例如抗PD-1或抗PD-L1單株抗體)組合投與。在某些實施例中，抗PD-1或抗PD-L1療法係抗體。舉例而言，本文中提供治療有需要之個體之結腸直腸癌的方法，其包含向該個體投與化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其組合物與抗PD-1或抗PD-L1療法(例如mAb療法)之組合。

在某些實施例中，化合物(1)或其醫藥上可接受之鹽或經同位素標記之衍生物或其醫藥組合物係與放射療法(RT)組合使用。在某些實施例中，

化合物係與手術組合投與。

實例

化合物(1)之合成

一般程序及方法

根據本發明之化合物可藉由下文實例中所闡述之方法來產生。然而，該等實例僅係出於說明性目的，且根據本發明之化合物並不以任何方式限於下文所提及之具體實例。

在實例中，除非另有明確提及，否則藉由使用矽膠管柱層析進行純化之矽膠係Hi-Flash™管柱(矽膠，30 μm 60 Å或40 μm 60 Å, Yamazen Corporation)，藉由使用NH矽膠管柱層析進行純化之矽膠係Chromatorex NH矽膠(Fuji Silysia Chemical LTD)。分析型薄層層析(TLC)係以TLC矽膠60 F₂₅₄，層厚度0.25mm (Merck KGaA)或Chromatorex TLC NH矽膠F₂₅₄，層厚度0.25mm (Fuji Silysia Chemical LTD)來實施。藉由利用對甲氧基苯甲醛染色劑、磷鉬酸染色劑或Hanessian染色劑染色來使TLC板可視化。

所有濕度敏感性反應均係在惰性氛圍下進行。除非另有註明，否則試劑及溶劑為市售等級且係如所供應來使用。

NMR光譜係在JEOL ECZ500R (500 MHz)、JEOL ECZ400S (400 MHz)、Varian Inova 500 (500 MHz)、Varian Mercury 400 (400 MHz)或Bruker Avance (600 MHz)光譜儀上記錄。化學位移係以百萬分率(ppm)報告。對於¹H NMR光譜(CDCl₃、C₆D₆及/或CD₃OD)，殘餘溶劑峰係用作內部參考(於CDCl₃中7.27 ppm；於C₆D₆中7.16 ppm；於CD₃OD中3.31 ppm)。

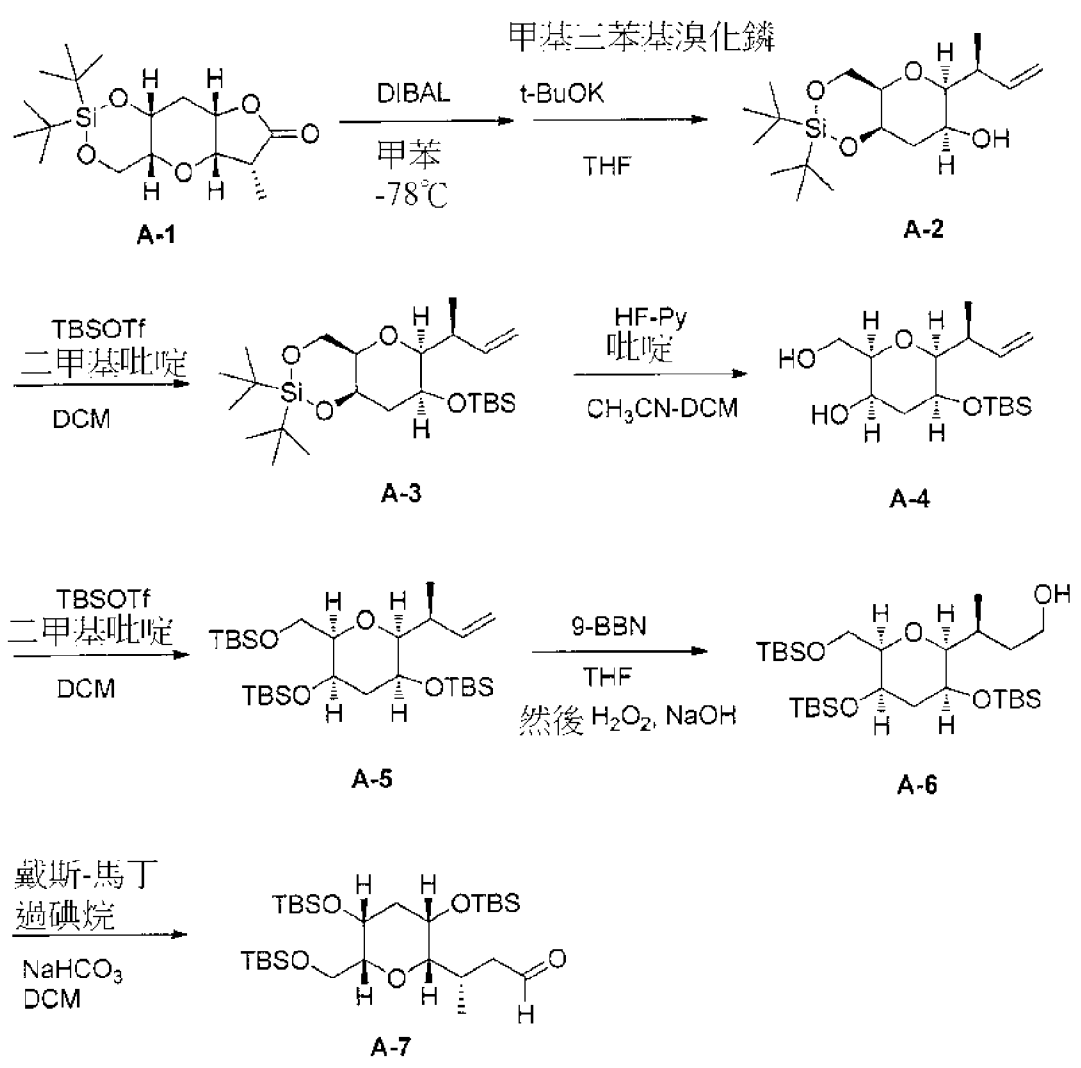
分析型質譜(MS)結果係使用配備有單一四極檢測器(SQ檢測器2)或LTQ Orbitrap XL™ (ThermoScientific)之Waters Acquity UPLC獲得。

高效液相層析(HPLC)係利用Shimadzu LC-10AD在UV分光光度檢測器(200 nm, Shimadzu SPD-10A)上實施。

本文中所使用之縮寫如下：AIBN：2,2'-偶氮雙(異丁腈)；9-BBN：9-硼雜雙環[3.3.1]壬烷；Bu₃SnH：三正丁基錫氫化物；(+)-CSA：(1S)-(+)-10-樟腦磺酸；DMAP：4-二甲基胺基吡啶；DCM：二氯甲烷；DDQ：2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌；DIBAL：二異丁基氫化鋁；DMF：*N,N*-二甲基甲醯胺；DMSO：二甲亞砜；Et₃N：三乙胺；EtOAc：乙酸乙酯；HF-吡啶：氟化氫吡啶；HPLC：高效液相層析；IPA：異丙醇；MeCN：乙腈；MeOH：甲醇；MPM：對甲氧基苄基；PPh₃：三苯基膦；*t*-BuOH：第三丁基醇；*t*BuLi：第三丁基鋰；TBME：甲基第三丁基醚；TBAF：四丁基氟化銨；TBS：第三丁基二甲基矽基；THF：四氫呋喃；TMS：三甲基矽基；Ts：對甲苯磺醯基。

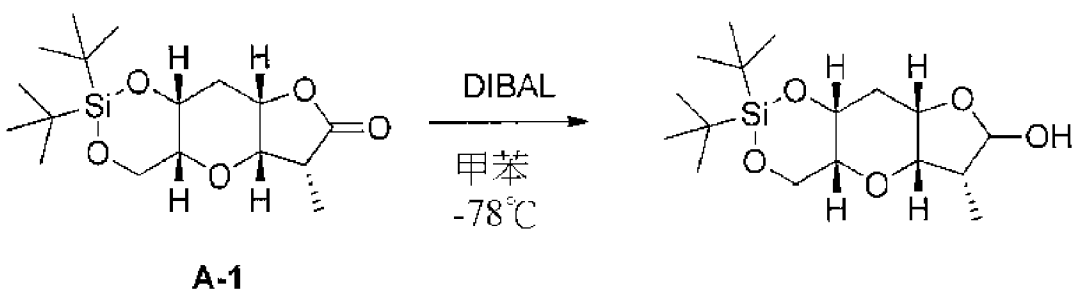
本文中所揭示之合成中間體視為本發明之一部分。

方案A；化合物A-7之製備



實例1

(4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-二-第三丁基-6-甲基八氫呋喃并[2',3':5,6]呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧雜矽雜環己三烯基(dioxasilin)-7-醇

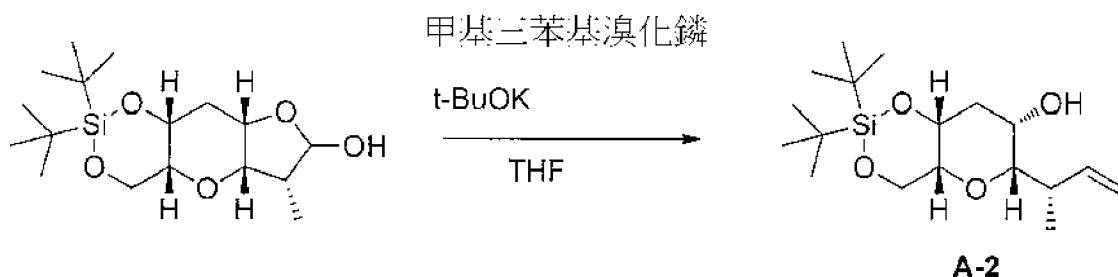


在氮氛圍下，在-78°C下經30 min向藉由Organic Letters (2009), 11(2), 409-412中所寫之方法獲得之化合物**A-1**：(4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-二-第三丁基-6-甲基六氫呋喃并[2',3':5,6]呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧雜

矽雜環己三烯基-7(8aH)-酮(A-1 18.5 g, 54.0 mmol)(CAS編號；1095280-04-8)於甲苯(275 mL)中之溶液添加DIBAL (70.2 mL, 70.2 mmol, 1.0 M 甲苯溶液)。然後將反應混合物在-78℃下攪拌。90 min後，在-78℃下小心地用MeOH (4.37 mL)使反應淬滅，然後移除冷卻浴。將飽和四水合酒石酸鉀鈉溶液(300 mL)添加至反應混合物，在室溫下繼續攪拌2小時。將反應混合物傾倒至分液漏斗中，然後分離各層。用EtOAc (300 mL)萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水(300 mL)洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。粗製內半縮醛不經純化即用於下一反應。

實例2

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-第三丁基六氫吡喃并[3,2-d][1,3,2]二氧雜矽雜環己三烯基-7-醇(化合物A-2)



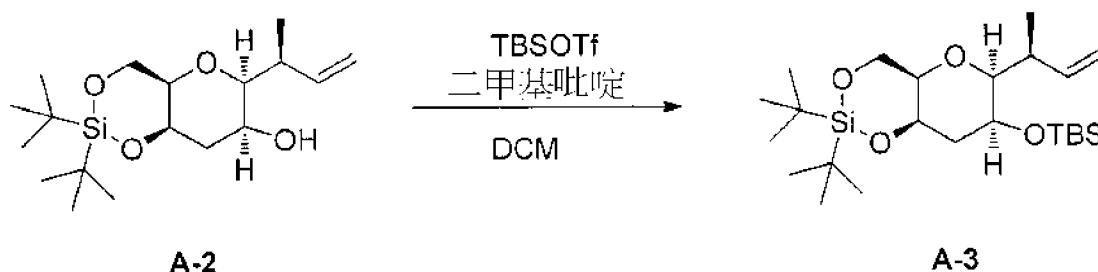
在氮氛圍下，在-5℃下經10 min向甲基三苯基溴化磷(73.30 g, 205.2 mmol)於THF (200 mL)中之懸浮液添加第三丁醇鉀(17.27 g, 153.9 mmol)，且然後在-5℃下攪拌60 min。在-5℃下經10 min將實例1中所闡述之於THF (40 mL)中之粗製內半縮醛溶液轉移至反應混合物，然後在-5℃下攪拌1小時，在室溫下攪拌1小時。用冰水(400 mL)使反應混合物淬滅，然後用TBME (400 mL)稀釋且然後分離各層。用TBME (400 mL)萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水(400 mL)洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。將殘餘物用庚烷/EtOAc = 1/1 (100 mL)懸浮。將所得懸浮

液過濾，用庚烷/EtOAc = 1/1 (100 mL)沖洗以去除源自三苯基膦之材料。然後將濾液在減壓下濃縮。使用0%至20% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠 (400 g，矽膠60，球形，40-50 μ m, Kanto Chemical)上急速層析，得到標題化合物(化合物**A-2**，16.7 g，90%產率)。

^1H NMR (400 MHz，氯仿-*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)。

實例3

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-第三丁基-7-((第三丁基二甲基矽基)氧基)六氫吡喃并[3,2-*d*][1,3,2]二氧雜矽雜環己三烯(化合物**A-3**)



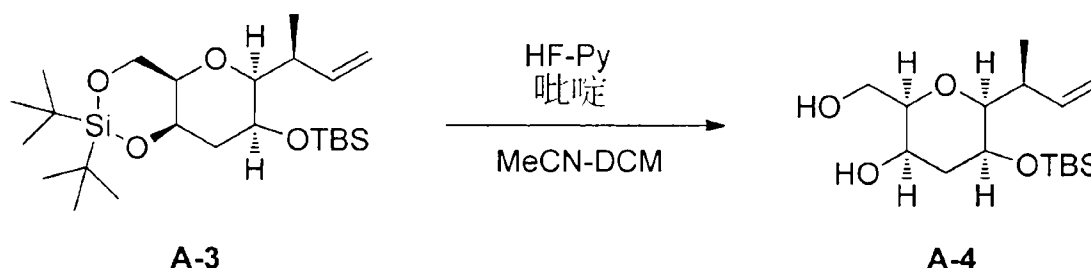
在氮氛圍下，在0℃下向實例2中所闡述之化合物**A-2**：(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-第三丁基六氫吡喃并[3,2-*d*][1,3,2]二氧雜矽雜環己三烯基-7-醇(9.85 g, 28.8 mmol)於DCM (150 mL)中之溶液添加2,6-二甲基吡啶(6.68 mL, 57.5 mmol)及三氟甲磺酸第三丁基二甲基矽基酯(9.25 mL, 40.3 mmol)。將反應混合物在0℃下攪拌30 min，然後在室溫下攪拌2小時。將反應混合物用二乙醚稀釋。將有機層

用0.5 N HCl水溶液、飽和NaHCO₃水溶液且然後鹽水洗滌。使合併之有機層經MgSO₄乾燥、過濾(少量之SiO₂)且在減壓下濃縮。使用0%至15% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**A-3**，12.0 g，91%產率)。

¹H NMR (500 MHz，氯仿-*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)。

實例4

(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-5-((第三丁基二甲基矽基)氧基)-2-(經基甲基)四氫-2H-呋喃-3-醇(化合物A-4)



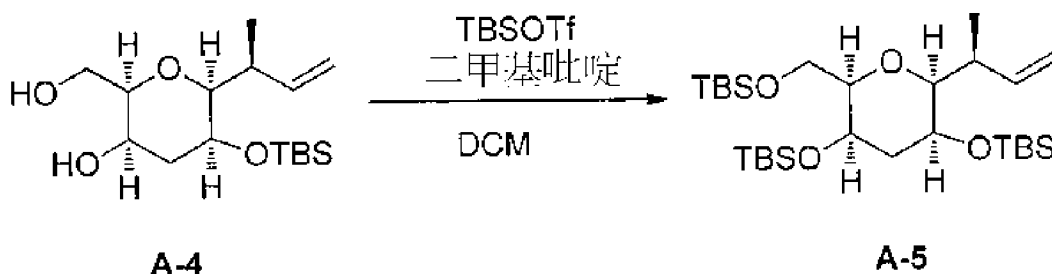
在氮氛圍下，在-10℃下向實例3中所闡述之化合物**A-3**：**(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-2,2-二-第三丁基-7-((第三丁基二甲基矽基)氧基)六氫呋喃并[3,2-d][1,3,2]二氧雜矽雜環己三烯**(12 g, 26.3 mmol)於MeCN (120 mL)及DCM (40 mL)中之溶液添加HF-吡啶(4.0 mL)及吡啶(20 mL)於20 mL MeCN中之預混合溶液。將反應混合物在-10℃下攪拌15 min，然後在室溫下攪拌1小時。在0℃下用飽和NaHCO₃水溶液使反應混合物淬滅且用DCM稀釋，然後分離各層。用DCM萃取水層。將合

併之有機萃取物用鹽水洗滌。使合併之有機層經MgSO₄乾燥，過濾，且在減壓下濃縮。使用15%至60% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物A-4，8.4 g，定量產率)。

¹H NMR (500 MHz，氯仿-*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)。

實例5

(((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-丁-3-烯-2-基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-呋喃-3,5-二基)雙(氧基))雙(第三丁基二甲基矽烷) (化合物A-5)



在氮氛圍下，在5℃下向實例4中所闡述之化合物A-4：(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-丁-3-烯-2-基)-5-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)-2-(羥基甲基)四氫-2H-呋喃-3-醇(997 mg, 3.15 mmol)於DCM (10 mL)中之溶液添加2,6-二甲基吡啶(1.83 mL, 15.8 mmol)及三氟甲磺酸第三丁基二甲基矽基酯(2.17 mL, 9.45 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌5小時。將反應混合物用二乙醚稀釋並用飽和NaHCO₃水溶液淬滅，然後分離各層。相繼用0.5 N HCl水溶液、飽和NaHCO₃水溶液且然後鹽水洗滌合併之有機

層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至20% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**A-6**，1.36 g，100%產率)。

¹H NMR (500 MHz, 氯仿-*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]⁺

實例7

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-嘓喃-2-基)丁醛(化合物A-7)

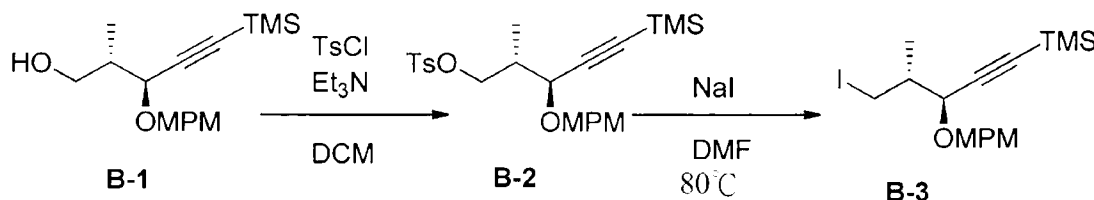


在氮氛圍下，在5℃下向實例6中所闡述之化合物**A-6**：**(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)丁-1-醇**(1100 mg, 1.954 mmol)於DCM (30 mL)中之溶液添加NaHCO₃ (41.0 mg, 0.49 mmol)及戴斯-馬丁(Dess-Martin)過碘烷(1077 mg, 2.54 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌。3小時後，將反應混合物用DCM稀釋並用飽和NaHCO₃水溶液及飽和Na₂SO₃水溶液淬滅，然後分離各層。用DCM萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至25%

EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**A-7**，950 mg，87%產率)。

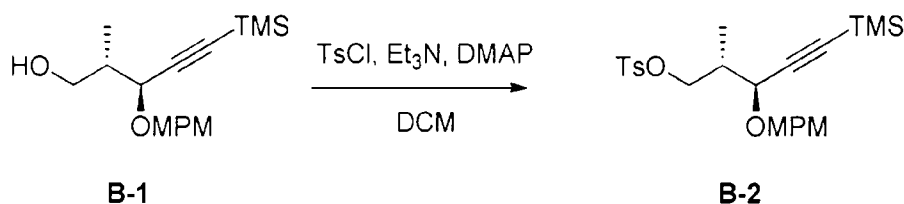
^1H NMR (500 MHz，氯仿-*d*) δ ppm 0.00 (s, 3 H) 0.03 - 0.08 (m, 12 H) 0.11 (s, 3 H) 0.88 (s, 9 H) 0.91 - 0.92 (m, 21H) 1.82 (dt, $J=15.0$, 4.5 Hz, 1 H) 2.01 (dt, $J=15.0$, 2.5 Hz, 1 H) 2.28 (ddd, $J=16.0$, 7.3, 2.4 Hz, 1 H) 2.53 -2.58 (m, 1 H) 2.74 (ddd, $J=16.0$, 5.5, 2.0 Hz, 1 H) 2.94 (dd, $J=9.0$, 1.7 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)。

方案B；化合物**B-3**之製備



實例8

(2S,3S)-4-甲基苯磺酸3-((4-甲氧基苄基)氧基)-2-甲基-5-(三甲基矽基)戊-4-炔-1-基酯(化合物**B-2**)



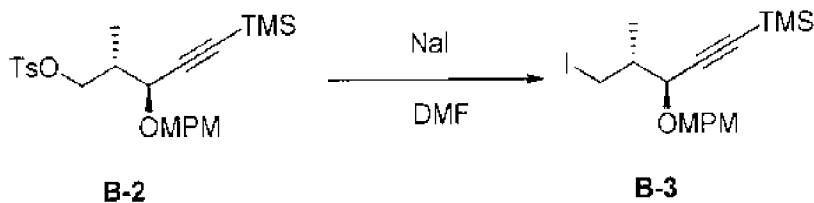
在氮氛圍下，在室溫下向藉由WO 9317690 A1/US 5436238 A中所寫之方法獲得之化合物**B-1**：(2S,3S)-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-2-甲基-5-(三甲基矽基)戊-4-炔-1-醇(11.08 g, 36.15 mmol)(CAS編號；157323-41-6)於DCM (330 mL)中之溶液添加Et₃N (12.6 mL, 90.4 mmol)及對甲苯磺酰氯(8.27 g, 43.4 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。將該混合物用飽和NaHCO₃及鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾，然後在減壓下濃縮。使用

0%至10% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析(矽膠60，球形，40-50 μm ，Kanto Chemical)，得到標題化合物(化合物**B-2**，17.7 g，93%產率)。

¹H NMR (500 MHz, 氯仿-*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)。

實例9

((3S,4R)-5-碘-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-4-甲基戊-1-炔-1-基)三甲基砷烷
(化合物B-3)



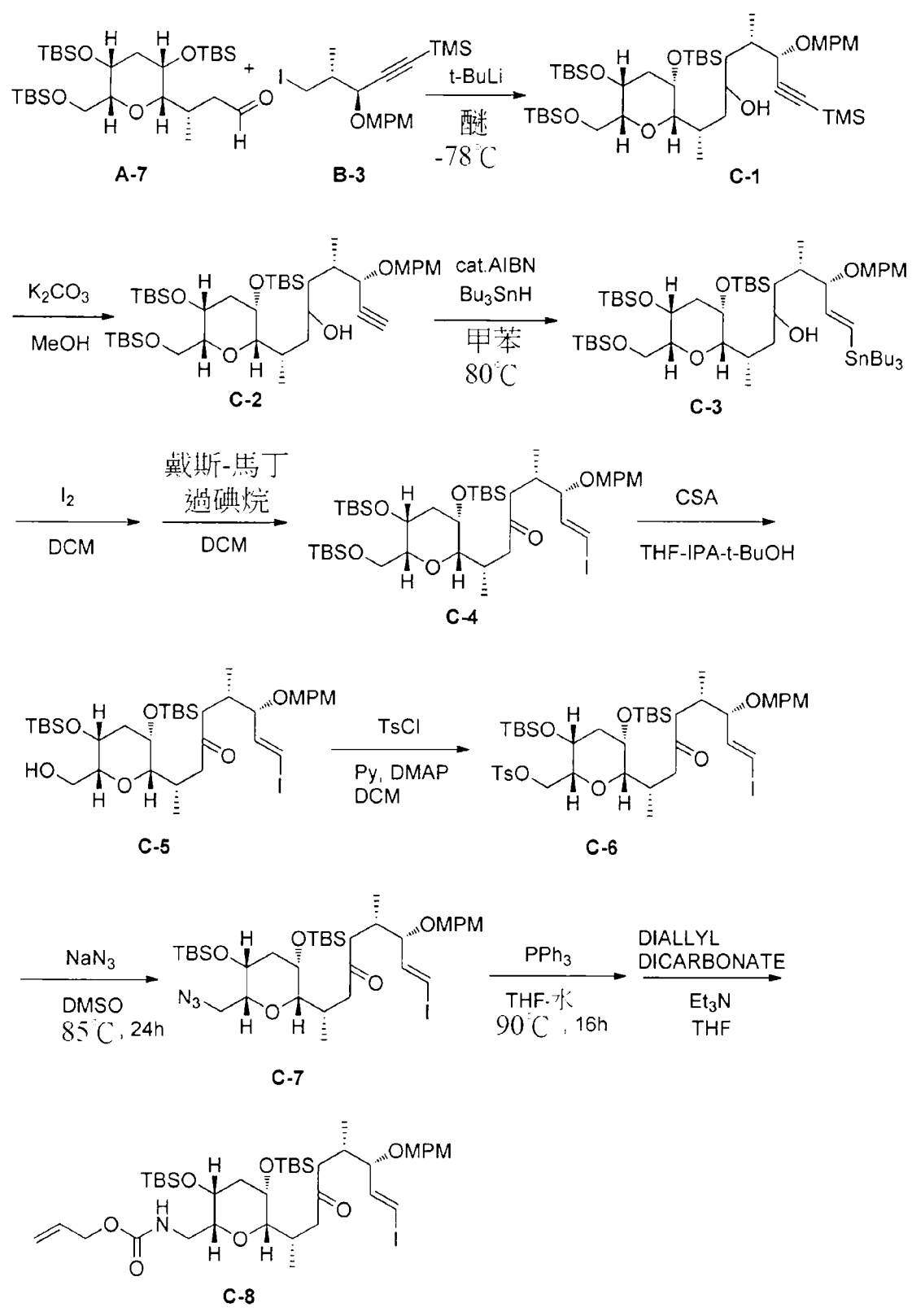
在氮氛圍下，在室溫下向實例8中所闡述之化合物**B-2**：(2S,3S)-4-甲基苯磺酸3-((4-甲氧基苄基)氧基)-2-甲基-5-(三甲基矽基)戊-4-炔-1-基酯(17.7 g, 38.4 mmol)於DMF (360 mL)中之溶液添加NaI (7.49 g, 50.0 mmol)。將反應混合物在80℃下攪拌2小時。再向該反應混合物添加2.0 g NaI。將反應在80℃下攪拌1.5小時，然後冷卻至室溫。將混合物用二乙醚稀釋，用水及鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用10%至20% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析(矽膠60，球形，40-50 μm, Kanto Chemical)，得到標題化合物(化合物**B-3**，14.3 g，89%產率)。

¹H NMR (500 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.21 (s, 9 H) 1.10 (d, J=6.8 Hz,

第 35 頁(發明說明書)

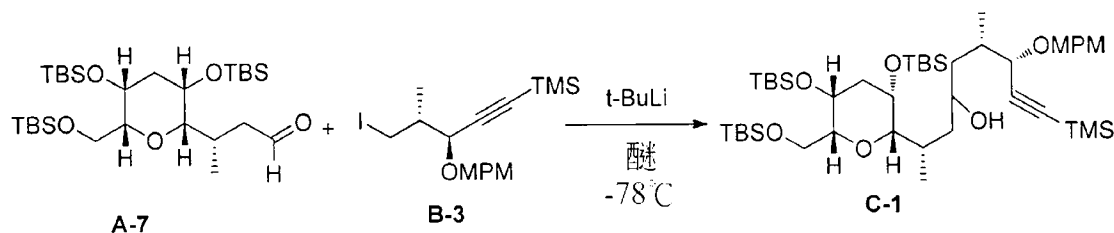
3 H) 1.74 - 1.84 (m, 1 H) 3.30 - 3.37 (m, 2 H) 3.82 (s, 3 H) 3.96 (d, J=7.3 Hz, 1 H) 4.44 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.73 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 6.89 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.30 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 。

方案C；化合物**C-8**之製備



實例10
(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-呓喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧

基)-6-甲基-9-(三甲基矽基)壬-8-炔-4-醇(化合物C-1)



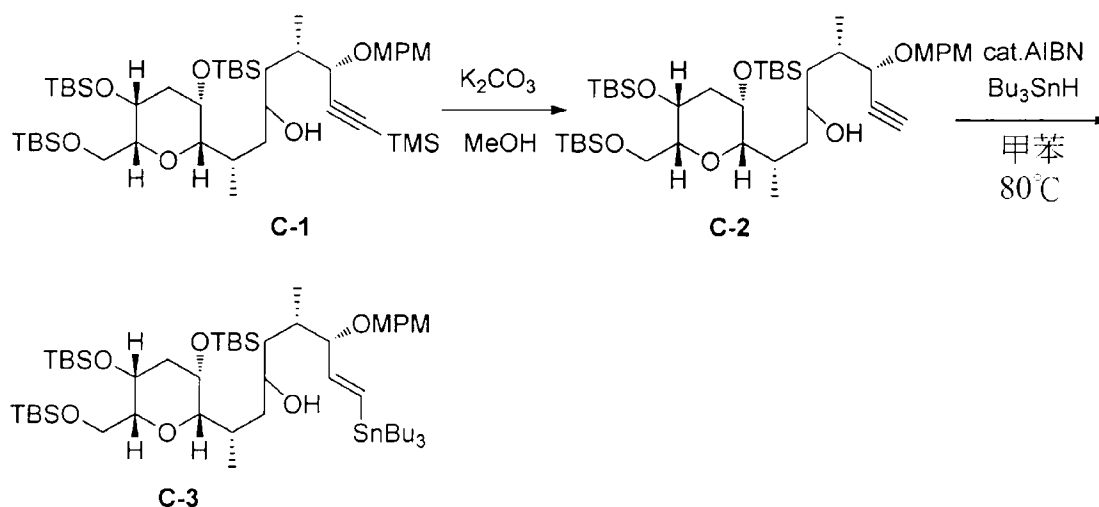
在氬氛圍下，在-78℃下向實例9中所闡述之化合物**B-3**：((3S,4R)-5-碘-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-4-甲基戊-1-炔-1-基)三甲基矽烷(1408 mg, 3.382 mmol)於二乙醚(25 mL)中之溶液添加第三丁基鋰(於戊烷中1.61 M, 4.11 mL, 6.62 mmol)。將反應混合物在-78℃下攪拌45 min。在-78℃下將實例7中所闡述之於5.0 mL二乙醚中之化合物**A-7**：(S)-3-(((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)丁醛(825 mg, 1.47 mmol)添加至反應混合物。將反應混合物在-78℃下攪拌60 min。用飽和NH₄Cl水溶液使反應混合物淬滅。將有機層用洗滌鹽水，經Na₂SO₄乾燥，然後在減壓下濃縮。使用0%至25% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**C-1**，1167 mg，93%產率)。

¹H NMR (500 MHz, 氯仿-*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)。

實例11

(2S,6S,7S,E)-2-(((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄

基)氧基)-6-甲基-9-(三丁基錫烷基)壬-8-烯-4-醇(化合物C-3)



在 20 °C 下向實例 10 中所闡述之化合物 **C-1** : (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三甲基矽基)壬-8-炔-4-醇(1165 mg, 1.37 mmol)於MeOH (20 mL)中之溶液添加K₂CO₃ (189 mg, 1.37 mmol)。將反應混合物在20°C下攪拌2小時。將反應混合物用EtOAc稀釋並用飽和NH₄Cl水溶液淬滅，然後分離各層。用EtOAc萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至15% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到化合物**C-2** : (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-炔-4-醇(1050 mg, 98%產率)。ESI-MS (m/z): 801.50 [M+Na]⁺

在氮氛圍下，在20°C下向上文所獲得之化合物**C-2** : (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-炔-4-醇(780 mg, 1.00 mmol)於甲苯(15 mL)中之溶液添加三正丁基錫氫化

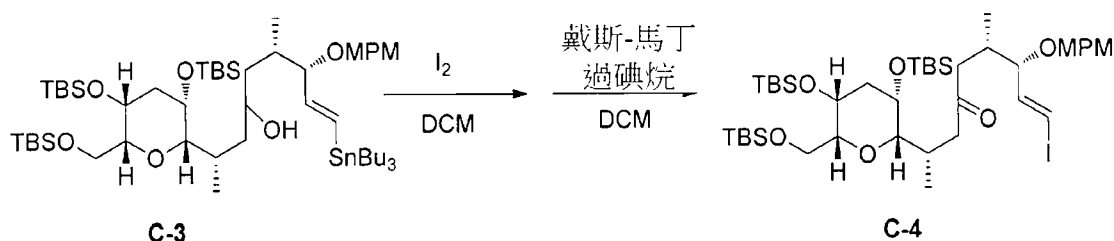
第 39 頁(發明說明書)

物(2.5 mL, 9.36 mmol)及2,2'-偶氮雙(異丁腈) (82 mg, 0.50 mmol)。將反應混合物在90°C下攪拌15 min。將反應混合物在減壓下濃縮。使用0%至15% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物C-3，970 mg，91%產率)。

^1H NMR (500 MHz，氯仿-*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)。

實例12

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-呓喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-4)



在氮氛圍下，在5°C下向實例11中所闡述之化合物C-3：(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-呓喃-2-基)-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-9-(三丁基錫烷基)壬-8-烯-4-醇(970 mg, 0.91 mmol)於30 mL DCM中之溶液添加於DCM (6 mL)中之碘(242 mg, 0.95 mmol)，直至其維持碘色彩為止。用飽和Na₂SO₃水溶液使反應混合物淬滅且分離各層。用DCM萃取水

層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌。使合併之有機層經 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至25% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-醇(768 mg，93%產率)。

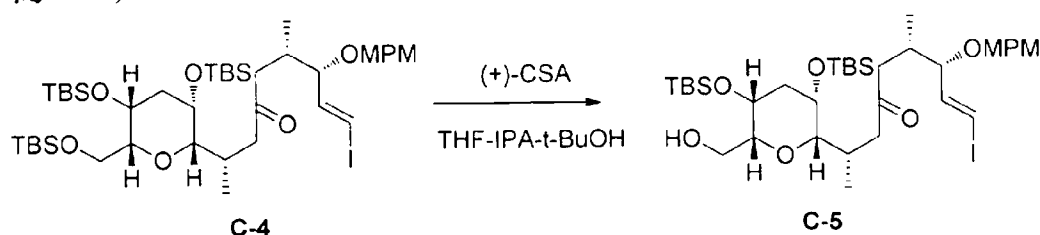
在氮氛圍下，在室溫下向上文所獲得之(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-醇(768 mg, 0.85 mmol)於DCM (25 mL)中之溶液添加 NaHCO_3 (17.8 mg, 0.21 mmol)及戴斯-馬丁過碘烷(485 mg, 1.14 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌4小時。將反應混合物用DCM稀釋並用飽和 NaHCO_3 水溶液及飽和 Na_2SO_3 水溶液淬滅，且然後分離各層。用DCM萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經 MgSO_4 乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至20% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物C-4，776 mg，定量產率)。

^1H NMR (500 MHz，氯仿-*d*) δ ppm 0.00 (s, 3 H) 0.03 - 0.07 (m, 12 H) 0.10 (s, 3 H) 0.81 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H) 0.84 (d, $J=6.3$ Hz, 3 H) 0.89 (s, 9 H) 0.91 (s, 9 H) 0.92 (s, 9 H) 1.80 (dt, $J=15.0, 4.5$ Hz, 1 H) 1.99 (dt, $J=15.0, 2.5$ Hz, 1 H) 2.17 (dd, $J=16.6, 10.2$ Hz, 1 H) 2.20 - 2.29 (m, 2 H) 2.43 - 2.48 (m, 1 H) 2.54 (d, $J=12.7$ Hz, 1 H) 2.87 (dd, $J=9.0, 1.7$ Hz, 1 H) 2.99 (dd, $J=16.6, 2.9$ Hz, 1 H) 3.27 (td, $J=5.8, 2.4$ 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, $J=11.7$ 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, $J=8.3$ Hz, 2 H) 7.21 (d, $J=8.3$ Hz, 2 H)。ESI-MS (m/z): 927.39 $[M+Na]^+$

實例13

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(羥基甲基)四氫-2H-呔喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-5)



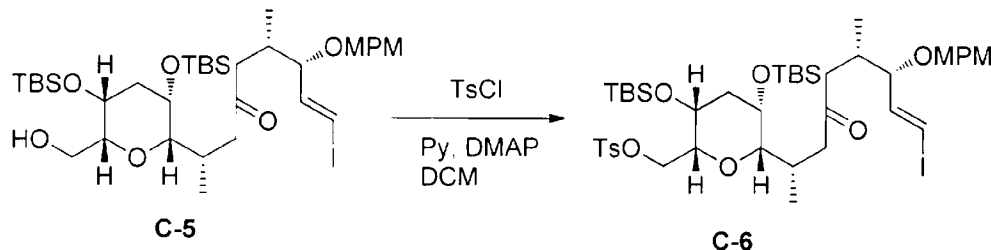
在 4 °C 下向實例 12 中所闡述之化合物 **C-4** : (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(((第三丁基二甲基矽基)氧基)甲基)四氫-2H-呔喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(600 mg, 0.66 mmol)於THF (5.0 mL)、IPA (5.0 mL)及t-BuOH (5.0 mL)中之溶液添加(1S)-(+)-10-樟腦磺酸(154 mg, 0.66 mmol)。將反應混合物在4°C下攪拌20小時。將反應混合物用EtOAc稀釋並用飽和NaHCO₃水溶液淬滅，然後分離各層。用EtOAc萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至35% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**C-5**，500 mg，95%產率)。

¹H NMR (500 MHz，氯仿-*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 $[M+Na]^+$

實例14

((2R,3R,5S,6S)-4-甲基苯磺酸3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-側氧基壬-8-烯-2-基)四氫-2H-哌喃-2-基)甲基酯(化合物C-6)



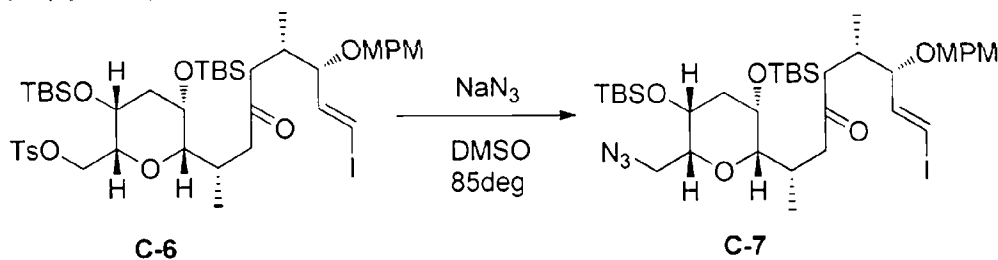
在氮氛圍下，在 5 °C 下向實例 13 中所闡述之化合物 **C-5**：
 ((2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-(羥基甲基)四氫-2H-哌喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(500 mg, 0.63 mmol)於DCM (10 mL)中之溶液添加吡啶(2.54 mL, 31.6 mmol)、對甲苯磺醯氯(723 mg, 3.79 mmol)及4-二甲基胺基吡啶(77 mg, 0.63 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌24小時。在室溫下將對甲苯磺醯氯(150 mg, 0.79 mmol)添加至該反應混合物。然後，將反應混合物在室溫下攪拌8小時。將反應混合物用DCM稀釋並用飽和NaHCO₃水溶液淬滅，然後分離各層。用DCM萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用0%至25% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**C-6**，560 mg，94%產

率)。

^1H NMR (500 MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.01 (s, 3 H) 0.04 (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, 1 H) 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)。

實例15

((2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(疊氮基甲基)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)四氫-2H-呋喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(化合物C-7)



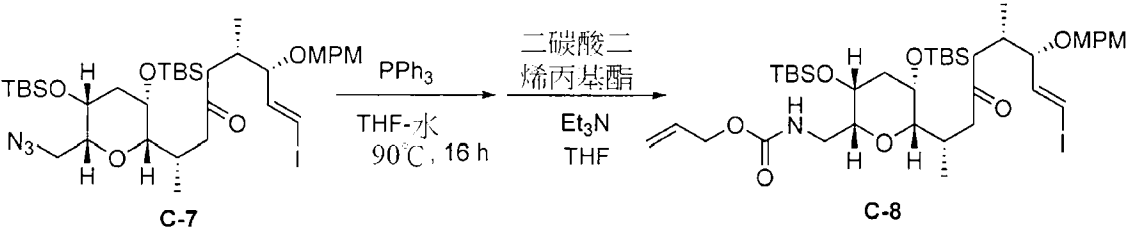
在氮氛圍下，在 20 °C 下向實例中 14 所闡述之化合物 **C-6**：
 ((2R,3R,5S,6S)-4-甲基苯磺酸 3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-
 ((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-側氧基壬-8-烯-2-
 基)四氫-2H-呋喃-2-基)甲基酯(560 mg, 0.59 mmol)於DMSO (5.6 mL)中
 之溶液添加疊氮化鈉(385 mg, 5.92 mmol)。將反應混合物在85°C下攪拌。

2小時後，將疊氮化鈉(100 mg, 1.54 mmol)添加至該反應混合物，然後將反應混合物在85℃下攪拌14小時。將反應混合物用EtOAc稀釋且用H₂O淬滅，然後分離各層。相繼用水及鹽水洗滌有機萃取物。使合併之有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮以得到粗製殘餘物。使用0%至15% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物C-7，298 mg，62%產率)。

¹H NMR (500 MHz，氯仿-*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)。

實例16

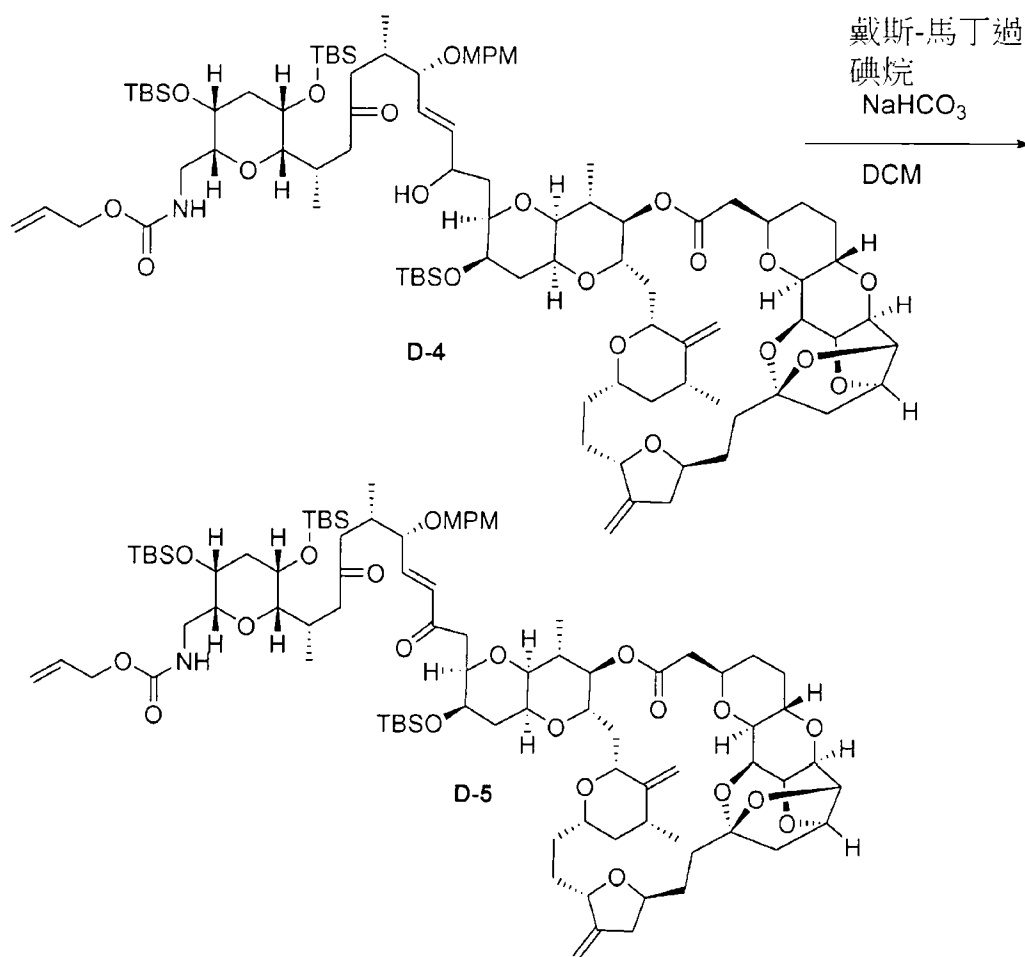
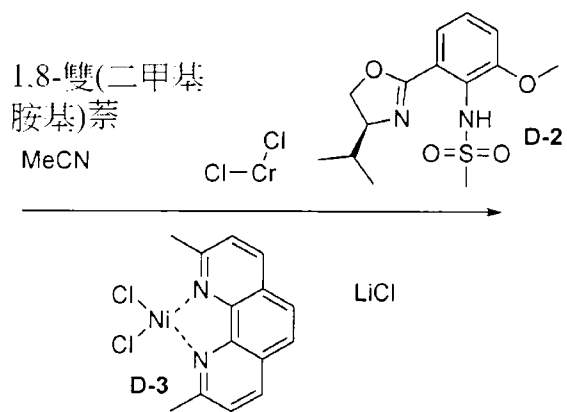
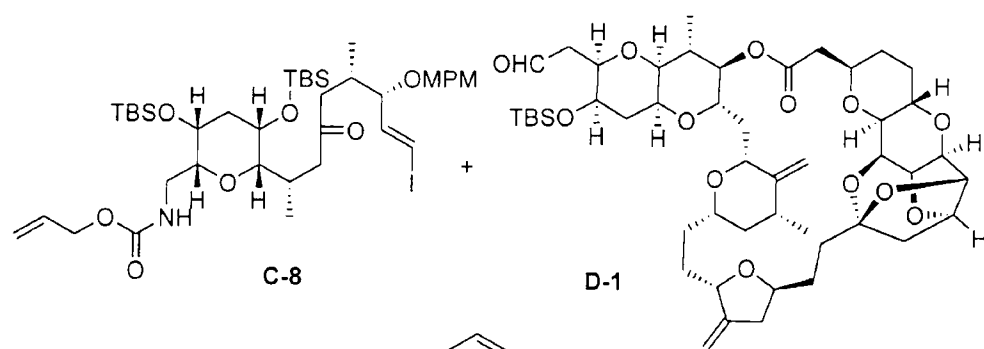
(((2R,3R,5S,6S)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-側氧基壬-8-烯-2-基)四氫-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基甲酸酯(化合物C-8)

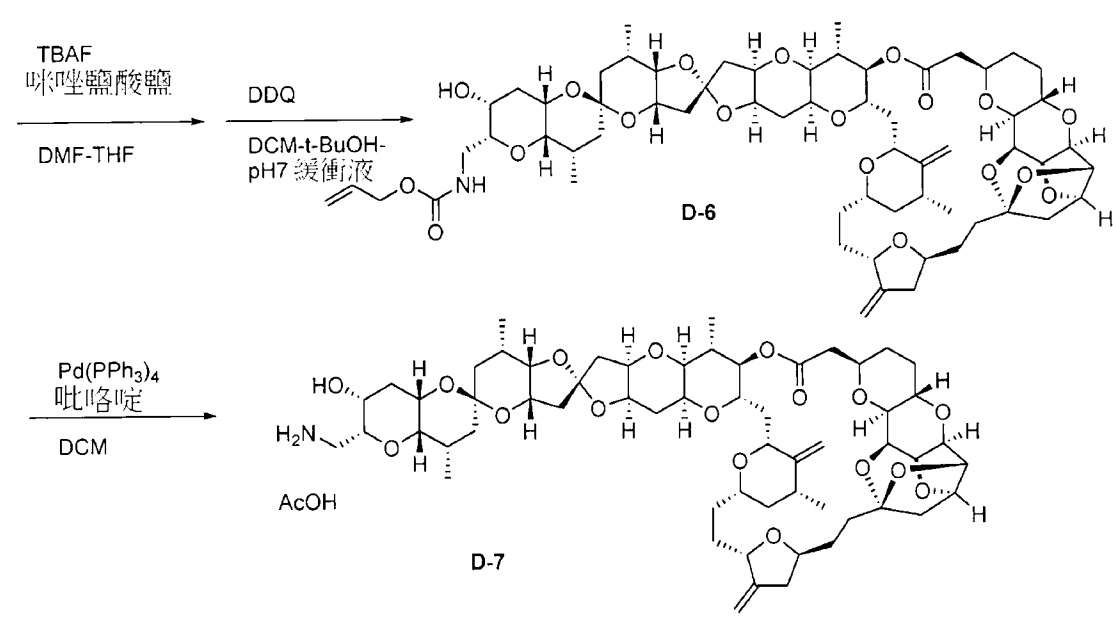


在 20 °C 下向實例 15 中所闡述之化合物 **C-7** : (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(疊氮基甲基)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)四氫-2H-吡喃-2-基)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基壬-8-烯-4-酮(298 mg, 0.37 mmol)於THF (10 mL)及水(1.0 mL)中之溶液添加三苯基膦(1437 mg, 5.478 mmol)。將反應混合物在70°C下攪拌1.5小時。將反應混合物在減壓下濃縮以得到粗製胺。在5°C下向上文所獲得之於THF (10 mL)中之粗製胺溶液添加Et₃N (0.51 mL, 3.66 mmol)及二碳酸二烯丙基酯(341 mg, 1.83 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌60 min。在減壓下濃縮該反應混合物。使用0%至25% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**C-8**，300 mg，94%產率)。

¹H NMR (500 MHz，氯仿-*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]⁺

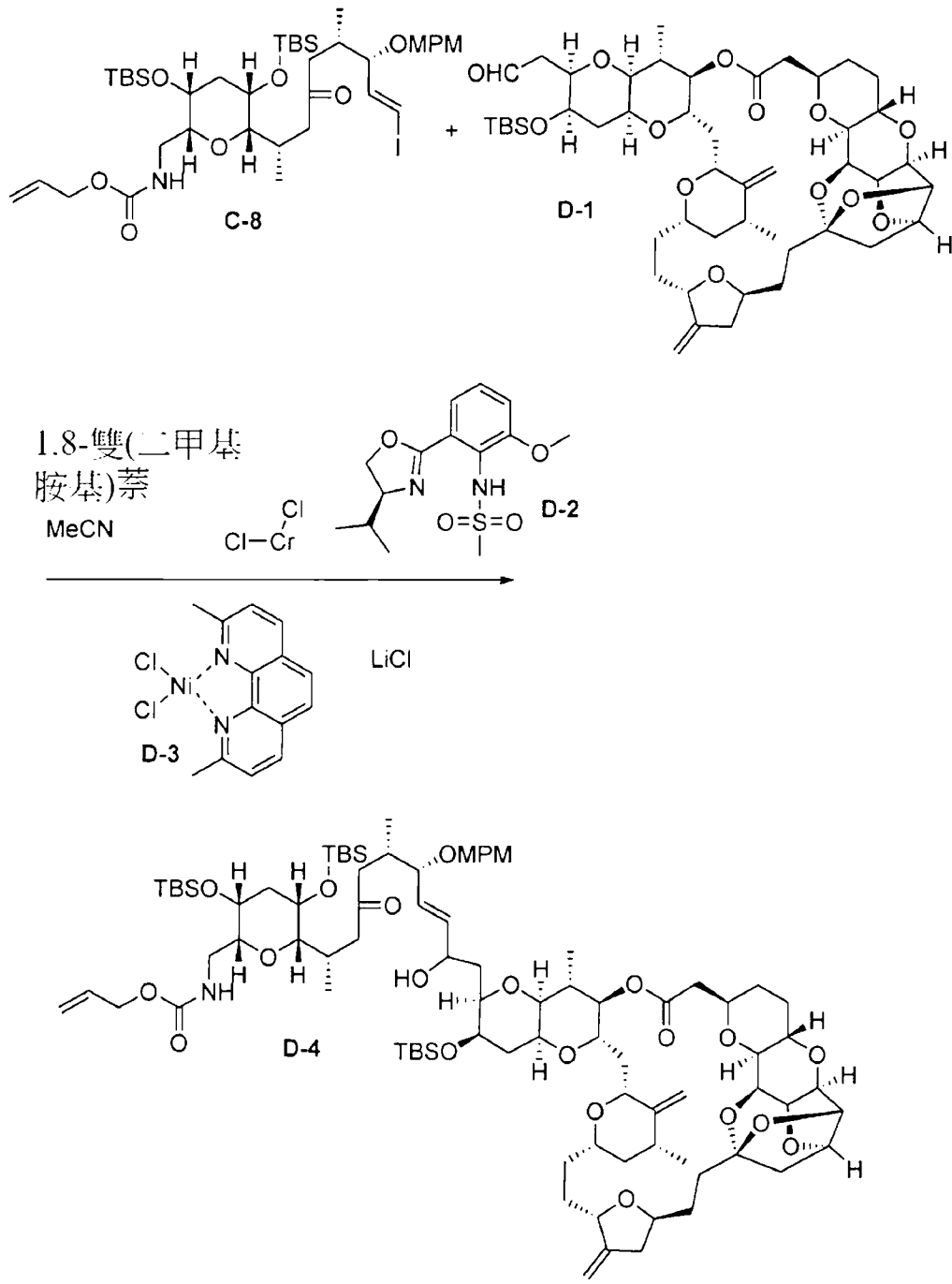
方案D；化合物**D-7**之製備





實例17

化合物D-4

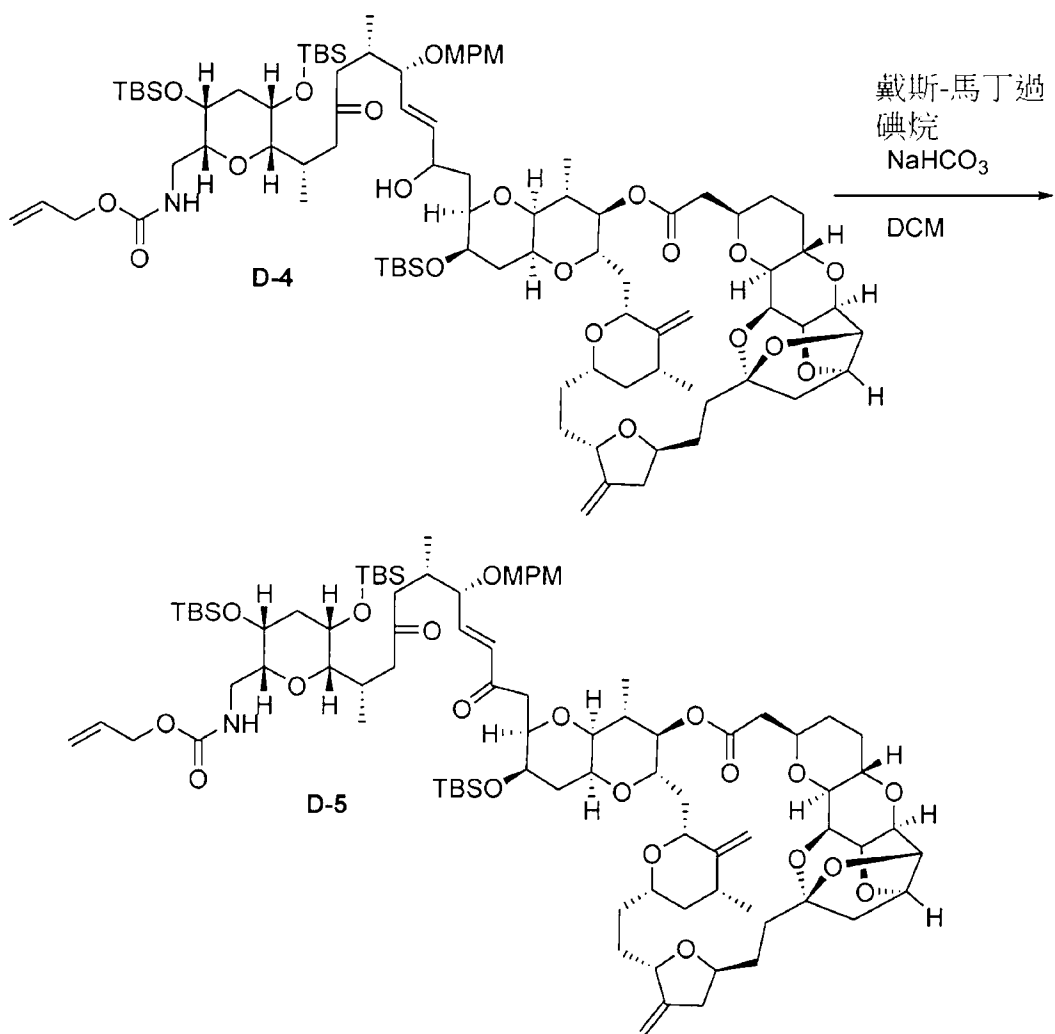


在氮氛圍下(於手套箱中)，向藉由Organic Letters (2002), 4 (25), 4431-4434中所寫之方法獲得之化合物D-2：(S)-N-(2-(4-異丙基-4,5-二氫噁唑-2-基)-6-甲氧基苯基)甲烷磺醯胺(155 mg, 0.497 mmol)(CAS編號；546141-34-8)及1,8-雙(二甲基胺基)萘(107 mg, 0.497 mmol)於MeCN (0.75 mL)中之溶液添加氯化鉻(II)(55.5 mg, 0.452 mmol)，且然後將所得混合物於手套箱中在室溫下攪拌1小時。將所得綠色溶液添加至以下各項

之混合物：實例16中所闡述之化合物**C-8**：(((2R,3R,5S,6S)-3,5-雙((第三丁基二甲基矽基)氧基)-6-((2S,6S,7S,E)-9-碘-7-((4-甲氧基苄基)氧基)-6-甲基-4-側氧基壬-8-烯-2-基)四氫-2H-吡喃-2-基)甲基)胺基甲酸烯丙基酯 (99.0 mg, 0.113 mmol)、藉由*Journal of the American Chemical Society* (1992), 114 (8), 3162-3164中所寫之方法獲得之化合物**D-1** (80.0 mg, 0.09 mmol)(CAS編號；157322-23-1)、藉由*Journal of the American Chemical Society* (2009), 131(42), 15387 - 15393中所寫之方法獲得之化合物**D-3**：二氯(2,9-二甲基-1,10-菲咯啉)鎳(0.46 mg, 1.36 μ mol)(CAS編號；21361-04-6)及氯化鋰(3.83 mg, 0.09 mmol)。將反應混合物於手套箱中在室溫下攪拌60 min。然後將反應混合物自手套箱取出，用二乙醚-EtOAc (5.0 mL - 5.0 mL)稀釋，然後將Florisil[®] (1600 mg, 15.94 mmol)(CAS編號；1343-88-0)添加至該混合物。然後將混合物在室溫下攪拌30 min。過濾(Celite[®])該混合物，用EtOAc/庚烷= 2/1洗滌，然後將濾液在減壓下濃縮。使用3%至55% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**D-4**，140 mg，95%產率)。

實例18

化合物D-5

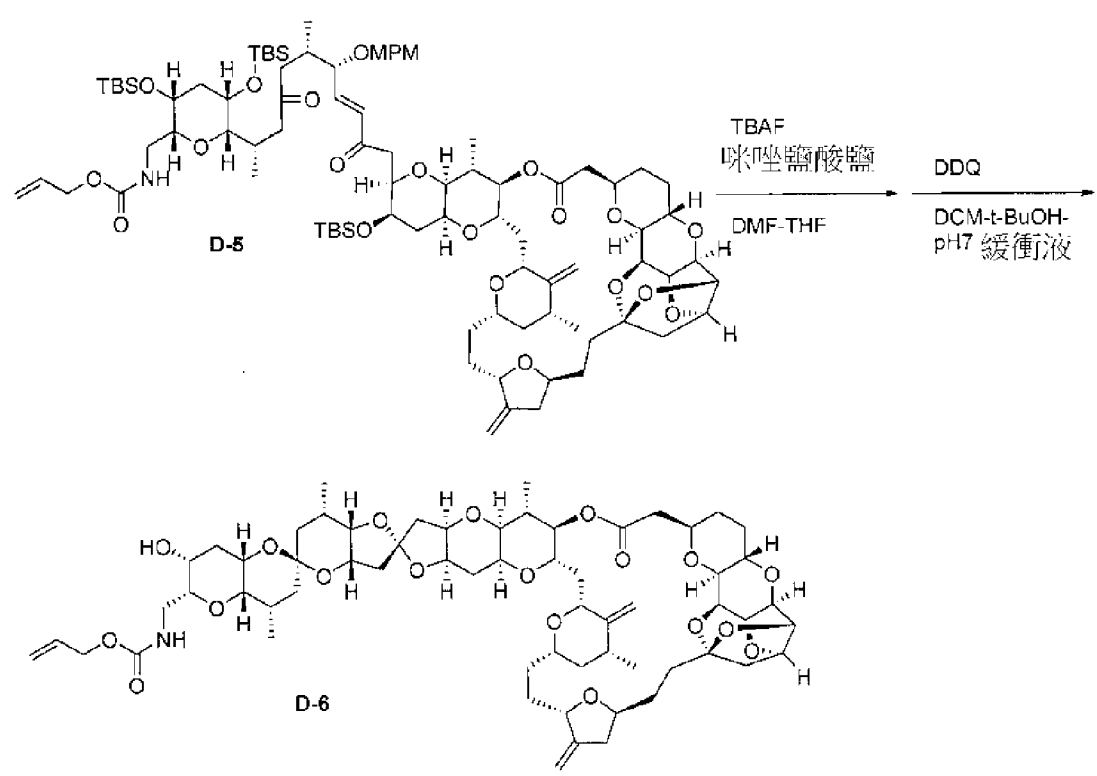


在氮氛圍下，在5℃下向實例17中所闡述之化合物**D-4** (140 mg, 0.09 mmol)於DCM (5.0 mL)中之溶液添加 NaHCO_3 (28.8 mg, 0.34 mmol)及戴斯-馬丁過碘烷(72.7 mg, 0.17 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌60 min。將反應混合物用DCM稀釋並用飽和 NaHCO_3 水溶液及飽和 Na_2SO_3 水溶液淬滅，且然後分離各層。用DCM萃取水層。將合併之有機萃取物用鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用2%至60% EtOAc/庚烷使殘餘物在矽膠上急速層析，得到標題化合物(化合物**D-5**，120 mg，86%)。

^1H NMR (500 MHz，苯- 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 (br. s., 1 H) 5.19 (br. s., 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) 。

實例19
化合物D-6



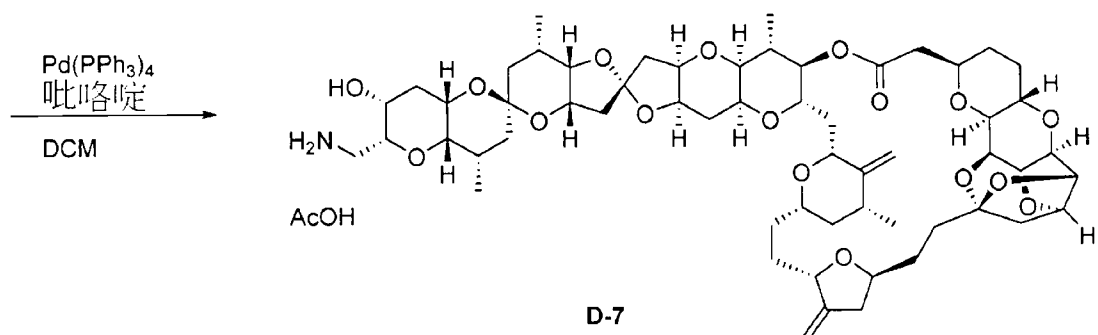
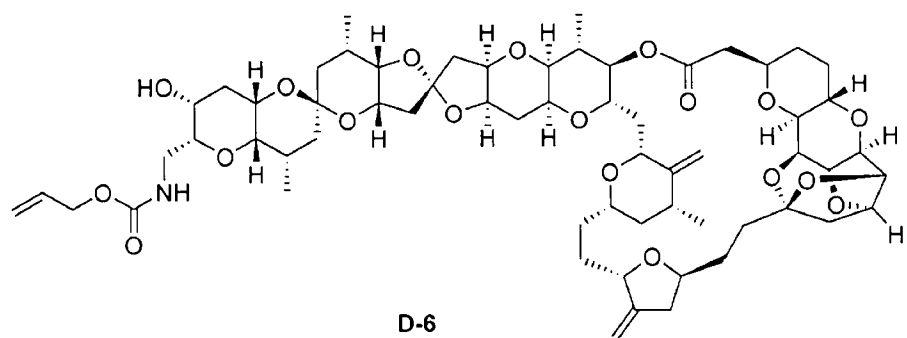
將咪唑鹽酸鹽(155 mg, 1.48 mmol)溶解於DMF (2.9 mL)中以得到於DMF中之0.5 M咪唑鹽酸鹽溶液。將1.0 mL此溶液與1.0 mL TBAF (1.0 M, THF溶液)混合以得到0.5 M TBAF及0.25 M咪唑鹽酸鹽於THF-DMF (1:1)中之預混合溶液。在氮氛圍下，在20°C下向實例18中所闡述之化合物**D-5** (80.0 mg, 0.05 mmol)於DMF (7.0 mL)中之溶液添加以上所製備之TBAF (0.5 M)及咪唑鹽酸鹽(0.25 M)於THF-DMF (1:1)中之0.588 mL預混合溶液。將反應混合物在室溫下攪拌14小時。將1.6 g CaCO₃及4.0 g Dowex® 50WX8 (氫型，200-400目，SIGMA-ALDRICH)添加至該反應混合物。將混合物在室溫下攪拌2小時。然後將混合物用EtOAc稀釋，然後過濾(Celite®)，用EtOAc洗滌。將濾液在減壓下濃縮以得到粗製殘餘物。將1000 mg CaCO₃及2.25 g Dowex® 50WX8添加至粗製殘餘物之EtOAc (6.0 mL)溶液。將混合物在室溫下攪拌2.5小時。然後將混合物用EtOAc稀釋，過濾(Celite®)，用EtOAc洗滌。將濾液在減壓下濃縮以得到粗製殘餘物(63.0 mg)。在室溫下向上文所獲得之粗製殘餘物(63.0 mg)於DCM (6.0 mL)、t-BuOH (0.6 mL)及pH 7磷酸鹽緩衝液(0.6 mL, 1/15 M)中之溶液添加DDQ (111 mg, 0.49 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌45 min。用飽和NaHCO₃水溶液使反應混合物淬滅，然後用DCM稀釋並分離各層。用DCM (3次)萃取水層。使合併之有機萃取物經Na₂SO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。使用10%至100% EtOAc/庚烷、然後10% MeOH/ EtOAc使殘餘物在NH矽膠上急速層析，得到大致純化之標題化合物(化合物**D-6**，15.0 mg, 27%)。

¹H NMR (500 MHz，甲醇-*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 (br. s., 1 H) 3.60 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 3.67 - 3.74 (m, 2 H) 3.78 (br. s., 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]⁺

實例20

化合物D-7



在氮氛圍下，在室溫下向實例19中所闡述之化合物**D-6** (15.0 mg, 0.013 mmol)、吡咯啉(10.8 μ L, 0.13 mmol)於DCM (2.0 mL)中之溶液添加四(三苯基膦)鈀(0) (7.53 mg, 6.52 μ mol)。將反應混合物在室溫下攪拌 30 min。在減壓下濃縮該反應混合物。使用50% EtOAc/庚烷、然後0%至20% MeOH/EtOAc使殘餘物在NH矽膠上急速層析，得到大致純化之產物。藉由HPLC純化所獲得之大致純化之產物，得到標題化合物(**D-7**，7.0 mg，47%，滯留時間= 13.8 min)。

HPLC條件：

管柱：YMC Pak Pro C18 (20 mm $\times$ 250 mm)

檢測波長：200 nm

管柱溫度：室溫

移動相：MeCN-水(0.05% AcOH)

流速：8 mL/min

析出液:

MeCN/水25% (iso, 2 min), 然後

MeCN/水25%至60% (梯度, 20 min)

^1H NMR (500 MHz, 甲醇- d_4) 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 (br. s, 1 H) 5.06 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H). ESI-MS (m/z): 1066.96 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1090.19 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

化合物(1) (化合物**D-7**之鹽游離形式): ^1H NMR (600 MHz, 甲醇- d_4) 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 (br. s., 1 H) 3.60 (br.d, $J=11.3$ Hz, 1 H) 3.68 - 3.73 (m, 2 H) 3.80 (br. s., 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 (br. s., 1 H) 4.87 (s, 1 H) 5.00 (br. s., 1 H) 5.05 (br.d, $J=1.1$ Hz, 1 H)。

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

藥理學測試實例

一般資訊

文獻中已知天然軟海綿素化合物及其經修飾化合物(例如，參見D. Uemura等人，「Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge」 *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)；Marc Litaudon 等人，「Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge *Lissodendoryx* sp.」 *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 1868-1871)。然而，其大多數不易獲得。舉例而言，Dr. Uemura等人自多達600 kg Kadota黑色軟海綿中分離出12.5 mg軟海綿素B、35.0 mg去甲軟海綿素A (Norhalichondrin A)及17.2 mg擬軟海綿素A (Homohalichondrin A)(例如，參見D. Uemura等人，「Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge」 *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985))。在天然軟海綿素

化合物中，軟海綿素B在活體外顯示最強之針對B-16黑色素瘤細胞之抗腫瘤活性且在活體內針對L-1210白血病具有高度活性(例如，參見D. Uemura等人，「Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge」 *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985))。軟海綿素C亦在各種活體內模型中具有活性，但與軟海綿素B相比在水溶液中不穩定。去甲軟海綿素B在活體外以及活體內均顯著弱於軟海綿素B(參見，例如D. Uemura等人，「Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge」 *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985))。以下藥理學測試視需要使用軟海綿素B (Hali-B)作為參考化合物。

藥理學測試實例1. FaDu生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37°C)中將FaDu細胞維持在含有10%胎牛血清(FBS: Nichirei, 12D168)以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 187-02021)培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加75 µL用培養基調整至濃度為 4×10^4 個細胞/mL之FaDu細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37°C)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加25 µL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37°C)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo®發光細胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所

需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，且示於表1中。

表1

FaDu	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.124
化合物(1)	0.0714

藥理學測試實例2. MDA-MB231生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在人類乳癌細胞系MDA-MB231中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37℃)中將MDA-MB231細胞維持在含有10%胎牛血清(FBS: Nichirei, 12D168)以及青黴素及鏈黴素之達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco’s Modified Eagle’s medium，Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 044-29765)培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加75 µL用培養基調整至濃度為4×10⁴個細胞/mL之MDA-MB231細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37℃)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加25 µL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37℃)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo[®]發光細胞存活率分析(Promega)利用 EnVision 2103 多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，且示於表2中。

表2

MDA-MB231	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))

軟海綿素B	1.000
化合物(1)	0.109

藥理學測試實例3. HCC1954生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在人類乳癌細胞系HCC1954中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37℃)中將HCC1954細胞維持在經改良含有2 mM L-麩醯胺酸、10 mM HEPES、1 mM丙酮酸鈉、4500 mg/L葡萄糖及1500 mg/L碳酸氫鈉(ATCC 30-2001)且含有10%胎牛血清(FBS: Nichirei, 12D168)以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加75 µL用培養基調整至濃度為4×10⁴個細胞/mL之HCC1954細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37℃)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加25 µL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37℃)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo[®]發光細胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，且示於表3中。

表3

HCC1954	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.154
化合物(1)	0.0668

藥理學測試實例4. 作為單一療法在小鼠中之FaDu皮下異種移植模型中之抗腫瘤效應

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用漢克氏平衡鹽溶液(Hanks' Balanced Salt Solution)調整至濃度為 4.8×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至7週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後9天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$
$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$
$$\text{腫瘤消退(\%)} = (1 - \text{最低RTV}) \times 100$$

基於在第1天投與時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。將每一測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存在冰箱中。在即將投與之前，將原液稀釋於含有100 μ M羥基丙基- β -環糊精之鹽水中。將每一評估樣品以最大耐受劑量(MTD)靜脈內投與。順便提及，該實驗係在各自由4隻小鼠組成之群組上進行。每一測試化合物之腫瘤消退(%)示於表4中。

表4

測試化合物	劑量(mg/kg)	腫瘤消退(%)
軟海綿素B	0.05	0
化合物(1)	0.2	43

藥理學測試實例5. 作為單一療法在小鼠中之皮下異種移植物模型中針對OSC-19之抗腫瘤活性

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之DMEM/Ham's F-12

第 61 頁(發明說明書)

(1:1)培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系OSC-19用PBS調整至濃度為 1×10^8 個細胞/mL以製備細胞懸浮液，且將該懸浮液與Matrigel™ (BD Bioscience，編號366237)以1:1之比率混合以製備濃度為 5×10^7 個細胞/mL之細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μL之體積接種至5週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後6天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm)/2

相對腫瘤體積(RTV) = 腫瘤體積(第X天) / 腫瘤體積(第1天)

腫瘤消退(%) = (1 - 最低RTV) × 100

基於在第1天投與時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於鹽水中，並以0.06 mg/kg至0.18 mg/kg一週一次之劑量靜脈內投與持續2週(Q7D×2時間表)。每一測試劑量之腫瘤消退(%)示於表5中。

表5

測試化合物	劑量(mg/kg)	腫瘤消退(%)
化合物(1)	0.06	59
化合物(1)	0.18	90

藥理學測試實例6. 作為單一療法在小鼠中之皮下異種移植物模型中針對HCC1806之抗腫瘤活性

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培

第 62 頁(發明說明書)

養之人類乳癌細胞系HCC1806用PBS調整至濃度為 1×10^8 個細胞/mL以製備細胞懸浮液，並將該懸浮液與Matrigel™ (BD Bioscience，編號366237)以1:1之比率混合以製備濃度為 5×10^7 個細胞/mL之細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μL之體積接種至5週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後12天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm) / 2

相對腫瘤體積(RTV) = 腫瘤體積(第X天) / 腫瘤體積(第1天)

腫瘤消退(%) = (1 - 最低RTV) × 100

基於在第1天投與時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於鹽水中，並以0.18 mg/kg一週一次靜脈內投與持續2週(Q7D×2時間表)。化合物(1)之腫瘤消退(%)示於表6中。

表6

測試化合物	劑量(mg/kg)	腫瘤消退(%)
化合物(1)	0.18	90

藥理學測試實例7. 與西妥昔單抗組合在小鼠中之FaDu皮下異種移植物模型中之抗腫瘤效應

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100

μL 之體積接種至 7 週齡裸小鼠 (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.) 之右側腹之皮下部分中。細胞接種後 10 天，藉由使用電子數位卡尺 (Digimatic™ 測徑器，Mitutoyo Corporation) 量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm) / 2

相對腫瘤體積(RTV) = 腫瘤體積(第X天) / 腫瘤體積(第1天)

第35天之腫瘤消退(%) = (1 - 第35天之RTV) × 100

基於在第1天投與時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。將每一測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存在冰箱中。在即將投與之前，將原液稀釋於含有 100 μM 羥基丙基-β-環糊精之鹽水中。將每一測試化合物以 1/4 MTD 至 1/2 MTD 之劑量與西妥昔單抗(Erbix, Merck Serono Co., Ltd.) 組合靜脈內投與。順便提及，該實驗係在各自由 4 隻小鼠組成之群組上進行。每一測試化合物在第35天之腫瘤消退(%) 示於表7中。

表7

測試化合物	劑量 (mg/kg)	西妥昔單抗 (mg/kg)	第35天之腫瘤消退(%)
-	-	20	-242
軟海綿素B	0.0125	20	-38
	0.025	20	-2
化合物(1)	0.05	20	38
	0.1	20	60

藥理學測試實例8. 與曲妥珠單抗組合在小鼠中之KPL-4皮下異種移植植物模

型中之抗腫瘤活性

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類HER-2陽性乳癌細胞系KPL-4用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 1×10^8 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至7週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後16天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

$$\text{腫瘤消退(\%)} = (1 - \text{最低RTV}) \times 100$$

基於在第1天投與時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將每一測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存在冰箱中。在即將投與之前，將原液稀釋於鹽水中。測試化合物係以0.09 mg/kg或0.18 mg/kg與曲妥珠單抗(Herceptin, Genentech, Inc.)組合靜脈內投與。化合物(1)之腫瘤消退示於表8中。

表8

測試化合物	劑量 (mg/kg)	曲妥珠單抗 (mg/kg)	腫瘤消退(%)
-	-	10	0
化合物(1)	0.09	-	43
	0.09	10	83
	0.18	-	87
	0.18	10	100

藥理學測試實例9. 對小鼠中之FaDu皮下模型中之CD31陽性血管之效應

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用PBS調整至濃度為5×10⁷個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μL之體積接種至7週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後10天，將於含有100 μM羥基丙基-β-環糊精之鹽水中之測試化合物以1/2 MTD至MTD之劑量靜脈內投與。該實驗係在各自由3隻小鼠組成之群組上進行。投與後5天，收集腫瘤樣品並用IHC鉍固定劑(BD Pharmingen)在4℃下固定24小時。將石蠟包埋組織切片(3 μm)，安裝在帶正電之載玻片上，並空氣乾燥。根據製造商之方案，使用Ventana自動染色儀型號Discover XT (Roche Diagnostics)對CD31進行免疫組織化學染色。將切片脫蠟，調理並用CC1 (Ventana Medical Systems)修復抗原。將載玻片用封阻劑A及封阻劑B (內源性生物素封阻套組，Roche Diagnostics)封阻。以2 μg/mL施加大鼠抗小鼠IgG CD31抗體(Dianova GmbH)。使切片與該抗體一起培育6小時，之後與2.2 μg/mL生物素化抗大鼠IgG抗體(Jackson

ImmunoResearch Laboratories)一起培育32分鐘。利用鏈黴抗生物素蛋白-HRP D實施檢測持續16 min，之後與DAB D及DAB H₂O₂ D (DABMap套組，Ventana Medical Systems, Inc)一起培育8 min。將載玻片用蘇木素II (Roche Diagnostics)複染16 min，之後與返藍試劑(Bluing reagent)一起培育4 min。使切片於梯度乙醇(graded ethanol)中脫水，於二甲苯更換液中脫脂並用DPX (Merck KGaA)覆蓋。

使用Vectra 2自動化載玻片成像系統(Perkin Elmer Inc.)掃描經免疫染色之載玻片。藉由使用inForm 2軟體(PerkinElmer Inc.)計數CD31陽性對象來量化全腫瘤中之血管數量。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)評價蘇木素染色面積來量測腫瘤區域之面積。由腫瘤區域之面積使血管數量正規化。利用以下公式來計算測試化合物投用組之血管數量增加率，且示於表9中。

血管數量增加率(%) = ((測試化合物投用組之血管數量－對照組之血管數量) / 對照組之血管數量) ×100

表9

測試化合物	劑量(mg/kg)	血管數量(%)增加率
軟海綿素B	0.025	31
	0.05	39
化合物(1)	0.10	69
	0.20	154

藥理學測試實例10. 對FaDu皮下模型中α-SMA陽性-CAF之效應

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用PBS調整至濃度為5×10⁷個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μL之體積接

種至5至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後10天，將於含有100 μ M羥基丙基- β -環糊精之鹽水中之測試化合物以1/2 MTD及MTD靜脈內投與。該實驗係在各自由3隻小鼠組成之群組上進行。投與後兩天，收集腫瘤樣品並用IHC鋅固定劑(BD Pharmingen)在4°C下固定24小時。將石蠟包埋組織切片(3 μ m)，安裝在帶正電之載玻片上，並空氣乾燥6小時。使用Ventana自動染色儀型號Discover XT (Roche Diagnostics)對 α -SMA進行免疫組織化學染色。將切片脫蠟，調理並用專利緩衝液EZPrep及CC1 (Ventana Medical Systems)修復抗原。以5 μ g/mL施加偶聯有鹼性磷酸酶之小鼠抗 α -SM單株抗體(純系1A4，Sigma)。使切片與該抗體一起培育6小時。利用RedMap套組(Ventana Medical Systems, Inc)實施檢測。使切片於梯度乙醇中脫水，於二甲苯更換液中脫脂並用DPX (Merck KGaA)覆蓋。將系列腫瘤切片脫蠟並用邁耶(Mayer)蘇木素(Muto Pure Chemicals)染色1 min。使切片於梯度乙醇中脫水，於二甲苯更換液中脫脂並用DPX (Merck KGaA)覆蓋。

使用Vectra 2自動化載玻片成像系統(Perkin Elmer Inc.)掃描經免疫染色之載玻片。藉由使用inForm 2軟體(PerkinElmer Inc.)計數 α -SMA陽性對象來量化全腫瘤中之 α -SMA陽性區域之面積。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)評價蘇木素染色面積來量測腫瘤區域之面積。由腫瘤區域之面積使 α -SMA陽性區域之面積正規化。利用以下公式來計算測試化合物投用組之 α -SMA陽性面積之抑制率，且示於表10中。

表10

測試化合物	劑量(mg/kg)	α-SMA陽性面積之抑制率(%)
軟海綿素B	0.025	7
	0.05	3
化合物(1)	0.10	21
	0.20	28

α-SMA陽性面積之抑制率(%) = - ((測試化合物投用組之α-SMA陽性面積-對照組之α-SMA陽性面積) /對照組之α-SMA陽性面積) ×100

藥理學測試實例11. HSC-2正位移植小鼠模型

藉由反轉錄病毒介導之基因轉移建立螢光素酶轉導之HSC-2-Luc細胞。首先，自pGL3-增強子質體(基因庫(GenBank)編號：U47297)獲得編碼螢火蟲螢光素酶之DNA片段，並亞選殖至反轉錄病毒載體pCX4pur (基因庫編號：AB086386)中。然後，藉由將上述反轉錄病毒表現載體與pGP及pE-Ampho質體(Takara Bio；Shiga, Japan)一起轉染至293T細胞(ATCC；Manassas, USA)中來產生無輔助之重組反轉錄病毒。接下來，用該等重組反轉錄病毒感染HSC-2細胞，且在嘌呤黴素(2 μg/mL)存在下培養兩週。自培養物之多株增殖性群體選擇經感染之細胞。

在麻醉下，將人類SCCHN細胞系HSC-2-Luc接種至6週齡雌性裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj小鼠；Charles River, Inc.；Shizuoka, Japan)之舌中(50 μL PBS中1 × 10⁶個細胞)。移植後7天，使用來自HSC-2-Luc細胞之生物發光信號來分析腫瘤體積。對於生物發光成像，在1%至2%吸入異氟醚麻醉下將0.1 mL之15 mg/mL D-螢光素(Promega, Madison, WI)腹膜內注射至裸小鼠中。生物發光信號係使用由高度靈敏冷卻電荷耦

合器件照相機組成之IVIS SPECTRUM系列(PerkinElmer, Waltham, MA)來監測。使用Living Image軟體(PerkinElmer, Waltham, MA)使成像數據網格化並對每一感興趣區域(ROI)中之總生物發光信號進行積分。所有生物發光影像均係以1秒曝光獲得。使用ROI中之總光子通量發射(光子/秒)來分析數據。

基於在第1天投與時所獲得之總光子通量發射，將小鼠分組，使得總光子通量發射之平均值在各組之間實質上相等。將化合物(1)或順鉑與或不與西妥昔單抗(Erbitux, Merck Serono Co., Ltd.)一起一週一次靜脈內投與持續3週(Q7D×3時間表)。使用相同程序來進行兩個實驗且自該等實驗收集所有數據。每一群組係由16隻小鼠組成。

成像數據顯示，僅化合物(1)與西妥昔單抗之治療在第14天後使所有小鼠中之生物發光信號明顯降低(圖6A-6B)。將每一治療組之中位數存活時間(MST)計算為死亡天數之中位數。藉由以下公式來計算壽命增加(ILS)： $ILS (\%) = (經測試化合物治療之動物之MST - 對照動物之MST) / 對照動物之MST \times 100$ 。每一測試化合物之ILS (%)示於表11中。

表11

測試化合物	劑量(mg/kg)	西妥昔單抗(mg/kg)	ILS (%)
-	-	5	231
順鉑	5	-	0
	5	5	150
化合物(1)	0.09	-	238
	0.09	5	>1150

藥理學測試實例12. 與輻射組合之FaDu s.c.異種移植物模型

藉由反轉錄病毒介導之基因轉移建立螢光素酶轉導之FaDu-Luc細胞

第 70 頁(發明說明書)

胞。首先，自pGL3-增強子質體(基因庫編號：U47297)獲得編碼螢火蟲螢光素酶之DNA片段，並亞選殖至反轉錄病毒載體pCX4pur (基因庫編號：AB086386)中。然後，藉由將上述反轉錄病毒表現載體與pGP及pE-Ampho質體(Takara Bio；Shiga, Japan)一起轉染至293T細胞(ATCC；Manassas, USA)中來產生無輔助之重組反轉錄病毒。接下來，用該等重組反轉錄病毒感染FaDu細胞，且在嘌呤黴素(2 μ g/mL)存在下培養兩週。自培養物之多株增殖性群體選擇經感染之細胞。

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之螢光素酶轉導之人類SCCHN細胞系FaDu-Luc用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右大腿皮下部分中。細胞接種後13天，使用來自FaDu-Luc細胞之生物發光信號來分析腫瘤體積。對於生物發光成像，在1%至2%吸入異氟醚麻醉下將0.1 mL之15 mg/mL D-螢光素(Promega, Madison, WI)腹膜內注射至裸小鼠中。生物發光信號係使用由高度靈敏冷卻電荷耦合器件照相機組成之IVIS SPECTRUM系列(PerkinElmer, Waltham, MA)來監測。使用Living Image軟體(PerkinElmer, Waltham, MA)使成像數據網格化並對每一感興趣區域(ROI)中之總生物發光信號進行積分。所有生物發光影像均係以1秒曝光獲得。使用ROI中之總光子通量發射(光子/秒)來分析數據。總光子通量發射係根據以下計算公式來計算：

$$\text{相對生物發光值} = \text{總光子通量發射(第X天)} / \text{總光子通量發射(第1天)}$$

$$\text{腫瘤消退(\%)} = (1 - \text{最低相對生物發光值}) \times 100$$

基於在第1天投與時所獲得之總光子通量發射，將小鼠分組，使得總光子通量發射之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。在第1天及第8天經由尾靜脈注射投與化合物(1)。在第4天及第11天以18 Gy實施輻照。化合物(1)之腫瘤消退示於表12中。

表12

測試化合物	劑量(mg/kg)	放射(Gy)	腫瘤消退(%)
-	-	18	16
化合物(1)	0.09	-	0
	0.09	18	97

藥理學測試實例13. 與抗mPD-1抗體組合在小鼠中之CT26皮下同基因模型中之抗腫瘤活性

將已於含有10% FBS以及青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之鼠類未分化之結腸癌細胞系CT26用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為2 × 10⁷個細胞/mL以製備細胞懸浮液。在第1天，將該細胞懸浮液以100 μL之體積接種至6週齡BALB/c小鼠(BALB/cAnNCrI CrIj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後兩天，將小鼠隨機分成四組，且每一群組係由8隻小鼠組成。藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm)/2

T/C = (治療組之平均腫瘤體積)/(對照組之平均腫瘤體積)

腫瘤生長抑制(%) = (1-T/C) × 100

在第3天及第11天以0.09 mg/kg靜脈內投與測試化合物。在第3天、

第7天、第11天及第15天以10 mg/kg靜脈內投與抗mPD-1抗體(BE0146, Bio X Cell)。每一測試化合物在第15天時之腫瘤生長抑制(%)示於表13中。

表13

測試化合物	劑量 (mg/kg)	抗mPD-1抗體 (mg/kg)	在第15天時之腫瘤生長抑制(%)
-	-	10	32
化合物(1)	0.09	-	30
	0.09	10	62

藥理學測試實例14. 在活體外對微管蛋白聚合之效應(圖10A)

微管蛋白聚合分析套組係自Cytoskeleton, Inc. (目錄號BK011P)購得。該套組含有1瓶自豬腦純化之凍乾微管蛋白、3管凍乾GTP、2瓶凍乾分析緩衝液及1瓶微管蛋白甘油緩衝液。分析緩衝液係藉由將內容物溶解於10 mL去離子並滅菌之水中來製備。此溶液含有80 mmol/L 六氫吡嗪-*N,N'*-雙[2-乙磺酸]倍半鈉鹽、2.0 mmol/L氯化鎂、0.5 mmol/L乙二醇-雙(2-胺基-乙基醚) *N,N,N',N'*-四-乙酸(pH 6.9)及10 μmol/L螢光報導基因。將該緩衝液儲存在-70℃下直至使用。微管蛋白甘油緩衝液係由以下組成：80 mmol/L六氫吡嗪-*N,N'*-雙[2-乙磺酸]倍半鈉鹽、2.0 mmol/L氯化鎂、0.5 mmol/L乙二醇-雙(2-胺基-乙基醚) *N,N,N',N'*-四-乙酸及60% v/v甘油(pH 6.9)。將其儲存在4℃下直至使用。GTP原液係藉由將每一管之內容物溶解於100 μL去離子並滅菌之水中以達成濃度為100 mmol/L GTP來製備。將此原液之等分試樣儲存在-70℃下直至使用。藉由添加1.1 mL分析緩衝液及GTP原液之混合物(100:1, v/v)將微管蛋白粉末溶解來製備微管蛋白原液(10 mg/mL)。將等分試樣冷凍於液氮中，且然後在-70℃下儲存直

至使用。

在微管蛋白聚合分析中，反應混合物係藉由將820 μL 分析緩衝液、17.6 μL GTP原液及600 μL 微管蛋白甘油緩衝液混合來製備。將反應混合物(1015 μL)與240 μL 微管蛋白原液合併。此溶液係稱為微管蛋白反應混合物且用於量測測試及對照孔。藉由將89.85 μL 反應混合物與21.25 μL 分析緩衝液混合製備無微管蛋白之反應混合物來量測空白孔。將化合物(1)溶液(6.25–100 $\mu\text{mol/L}$ ；最終濃度0.625–10 $\mu\text{mol/L}$)或媒劑以5 μL 添加至96孔半區微量滴定板之個別孔。將微管蛋白反應混合物或無微管蛋白反應混合物以45 μL 添加至該板之每一孔。使用SpectraMax® M5e微量板讀數儀(Molecular Devices)每2分鐘量測460 nm (激發波長360 nm)下之螢光發射持續90分鐘。由於發生聚合時螢光報導基因併入至微管中，因此微管蛋白聚合後螢光增強。該分析係以一式兩份實施。該分析展示，化合物(1)以濃度依賴性方式抑制微管蛋白聚合。每一時間點之螢光強度係藉由以下公式來計算：

螢光強度=測試孔或對照孔之平均螢光量測值-空白孔之平均螢光量測值；空白孔：含有媒劑不含微管蛋白；對照孔：含有媒劑及微管蛋白；測試孔：含有化合物及微管蛋白。

藥理學測試實例15. 基於細胞之微管動力學分析(圖10B)

利用U2OS-EB3-AG骨肉瘤細胞系進行基於細胞之微管(MT)動力學分析，其中EB3 (微管正端結合蛋白)及Azami-綠色(Azami-Green，EB3-AG)之融合蛋白穩定表現。將U2OS-EB3-AG細胞於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之RPMI-1640培養基中在37°C下於加濕5% CO_2 氛圍中培養。活細胞中之MT動力學可視化為EB3-AG之彗星樣結構之運動。利用化合

物(1)以指示濃度處理平鋪於基於玻璃之培養板(EZVIEW板，AGC Techno Glass, Japan)上之U2OS-EB3-AG細胞，且使用具有60倍放大率油浸物鏡之螢光顯微鏡(BZ-X710, KEYENCE, Japan)藉由間時成像來監測微管動力學。指示時間點處之靜態影像呈現於圖10B中。框區域之放大率更高之視圖顯示於插圖中。當用化合物(1)以0.5 nM (U2OS-EB3- AG細胞中抗增殖活性之IC₅₀值)處理時，在添加化合物後大約60分鐘時難以觀察到彗星樣結構。該等結果明顯展示，化合物(1)具有阻抑MT動力學之能力。

藥理學測試實例16. 活體外抗增殖活性(圖11)

使用一小組癌細胞系(包括食管之人類鱗狀細胞癌(OE21、TE-8)、食管之人類腺癌(OE33)及人類子宮肉瘤(MES-SA、MES-SA-Dx5-Rx1))來進行化合物(1)之活體外抗增殖分析。於5% CO₂培育器(37℃)中將所有細胞系於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素(培養基)之RPMI-1640培養基中培養。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加75 μL用培養基調整至濃度為4×10⁴個細胞/mL之細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37℃)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加25 μL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)，並將所得物於5% CO₂培育器(37℃)中培育72小時。然後，利用2013 EnVision™多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)藉由CellTiter-Glo®發光細胞存活率分析(Promega)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50% (即，IC₅₀值)所需化合物(1)之濃度，並示於圖11中。將P-gp敏感性計算為過表現P-gp之MES-SA-Dx5-Rx1細胞之IC₅₀值與MES-SA細胞之IC₅₀值的比

率。

藥理學測試實例17. 作為單一療法在小鼠中之KPL-4異種移植物模型中之抗腫瘤效應；作為單一療法在小鼠中之COLO-704異種移植物模型中之抗腫瘤效應(圖12)

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之DMEM中培養之人類HER-2陽性乳癌細胞系KPL-4用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 1×10^8 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至8週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後11天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

$$\text{相對體重(RBW)} = \text{體重(第X天)} / \text{體重(第1天)}$$

基於在第1天時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前，用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以20 μ g/kg、60 μ g/kg或180 μ g/kg一週一次靜脈內投與持續2週(在第1天及第8天)。在60 μ g/kg及180 μ g/kg治療組中觀察到腫瘤消退，且以180 μ g/kg投與在第15天時完全根除所有小鼠中之異種移植物腫瘤。

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之RPMI-1640中培養之人類卵巢癌細胞系COLO-704用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 1×10^8 個細胞

/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至5週齡裸小鼠(CAnN.Cg- Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後9天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

$$\text{相對體重(RBW)} = \text{體重(第X天)} / \text{體重(第1天)}$$

基於在第1天時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前，用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以20 μ g/kg、60 μ g/kg或180 μ g/kg一週一次靜脈內投與持續2週(在第1天及第8天)。化合物治療在180 μ g/kg下誘導腫瘤消退且在60 μ g/kg下誘導腫瘤生長延遲。以180 μ g/kg投與在第22天時完全根除所有小鼠中之異種移植物腫瘤。

藥理學測試實例18. 對小鼠中之FaDu皮下模型中之CD31陽性血管之效應 (圖13)

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素(培養基)之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用培養基調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後10天，將小

鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將每一測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前，用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以20 µg/kg、60 µg/kg或180 µg/kg靜脈內投與。單次投與後5天，收集腫瘤樣品並用IHC鋅固定劑(BD Pharmingen)在4°C下固定24小時。將石蠟包埋組織切片(3 µm)，安裝在帶正電之載玻片上，並空氣乾燥。根據製造商之方案，使用Ventana自動染色儀型號Discover XT (Roche Diagnostics)對CD31進行免疫組織化學染色。將切片脫蠟，調理並用CC1 (Ventana Medical Systems)修復抗原。將載玻片用封阻劑A及封阻劑B (內源性生物素封阻套組，Roche Diagnostics)封阻。以2 µg/mL施加大鼠抗小鼠IgG CD31抗體(Dianova GmbH)。使切片與該抗體一起培育6小時，之後與2.2 µg/mL之生物素化抗大鼠IgG抗體(Jackson ImmunoResearch Laboratories)一起培育32分鐘。利用鏈黴抗生物素蛋白-HRP D實施檢測持續16分鐘，之後與DAB D及DAB H₂O₂ D (DABMap套組，Ventana Medical Systems, Inc.)一起培育8分鐘。將載玻片用蘇木素II (Roche Diagnostics)複染16 min，之後與返藍試劑一起培育4分鐘。使切片於梯度乙醇中脫水，於二甲苯更換液中脫脂並用DPX® (Merck KGaA)覆蓋。使用Vectra® 2自動化載玻片成像系統(Perkin Elmer Inc.)掃描經免疫染色之載玻片。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)計數CD31陽性對象來量化全腫瘤中之血管數量。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)評價蘇木素染色面積來量測腫瘤區域之面積。由腫瘤區域之面積使血管數量正規化。以20 µg/kg、60 µg/kg及180 µg/kg之劑量單次投與測試化合物使腫瘤血管數量增加。利用以下公式計算測試化合物投用組中之血管

數量與未經治療組相比之比率：

腫瘤血管比率=測試化合物投用組之血管數量/未經治療組之血管數量)

藥理學測試實例19. 對小鼠中之FaDu皮下模型中之 α -SMA陽性CAF之效應(圖14)

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素(培養基)之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用培養基調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μ L之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後10天, 將小鼠分組, 使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由5隻小鼠組成之群組上進行。將每一測試化合物溶解於DMSO中, 並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前, 用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以20 μ g/kg、60 μ g/kg或180 μ g/kg靜脈內投與。單次投與後2天或5天, 收集腫瘤樣品並用IHC鋅固定劑(BD Pharmingen)在4°C下固定24小時。將石蠟包埋組織切片(3 μ m), 安裝在帶正電之載玻片上, 並空氣乾燥。將切片脫蠟, 調理並使用微波用1 mM EDTA (pH 6.0)修復抗原。將切片用於TBS中之1% BSA封阻。以5 μ g/mL施加偶聯有鹼性磷酸酶之小鼠抗 α -SM單株抗體(純系1A4, Sigma)。使切片與該抗體一起培育2.5小時。利用堅牢紅II (Fast red II)受質套組(Nichirei Bioscience Inc.)實施檢測。用邁耶蘇木素(Muto Pure Chemicals)將切片複染50秒。使切片於梯度乙醇中脫水, 於二甲苯更換液中脫脂並用DPX (Merck KGaA)覆蓋。使用Vectra 2自動化載玻片成像系統(Perkin Elmer Inc.)掃描經免疫染

色之載玻片。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)計數 α -SMA陽性對象來量化全腫瘤中 α -SMA陽性區域之面積。藉由使用inform 2軟體(PerkinElmer Inc.)評價蘇木素染色面積來量測腫瘤區域之面積。由腫瘤區域之面積使 α -SMA-陽性區域之面積正規化。在第3天以60 $\mu\text{g/kg}$ 及180 $\mu\text{g/kg}$ 之劑量及在第6天以180 $\mu\text{g/kg}$ 之劑量單次投與測試化合物顯著降低 α -SMA陽性面積。利用以下公式來計算測試化合物投用組之 α -SMA-陽性面積之抑制率：

α -SMA比率=測試化合物投用組之 α -SMA面積/未經治療組之 α -SMA面積

藥理學測試實例20. 對小鼠中之FaDu皮下模型中之生腫蛋白-C及EDA-纖維蛋白之效應(圖15)

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素(培養基)之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用培養基調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 μL 之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, 雌性, Charles River Laboratories Japan, Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種後10天, 將小鼠分組, 使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由5隻小鼠組成之群組上進行。將化合物(1)溶解於DMSO中, 並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。將化合物(1) (180 $\mu\text{g/kg}$)及西妥昔單抗(CTX, Erbitux®, Merck Serono Co. Ltd.) (10 mg/kg)用鹽水稀釋, 並在第1天靜脈內注射。單次投與後5天, 收集腫瘤樣品並用IHC鉍固定劑(BD Pharmingen)在4°C下固定24小時。將石蠟包埋組織切片(3 μm), 安裝在帶正電之載玻片上, 並空氣乾燥。將切片脫蠟, 調理並使用微波用1 mM

EDTA (pH 6.0)針對生腱蛋白-C修復抗原。對於EDA-纖維連蛋白，抗原修復程序不係必需的。將切片與BLOXALL封阻溶液(Vector Labs)一起培育10 min以封阻內源性過氧化酶，且與小鼠抗小鼠Ig封阻試劑(Vector Labs)一起培育1小時，且然後與2.5%正常馬血清一起培育30分鐘。對於生腱蛋白-C之免疫組織化學染色，以5 µg/mL施加小鼠抗生腱蛋白-C單株抗體(純系4C8MS，IBL)。將切片與該抗體一起在4°C下培育過夜。對於EDA-纖維連蛋白之免疫組織化學染色，以1.5 µg/mL施加小鼠抗EDA-纖維連蛋白單株抗體(純系IST-9, Abcam)。使切片與該抗體一起在室溫下培育1小時。利用小鼠抗小鼠ImmPRESS™過氧化酶聚合物套組(Vector Labs)實施檢測。用邁耶蘇木素(Muto Pure Chemicals)將切片複染50 sec。使切片於梯度乙醇中脫水，於二甲苯更換液中脫脂並用DPX (Merck KGaA)覆蓋。使用Vectra 2自動化載玻片成像系統(Perkin Elmer Inc.)掃描經免疫染色之載玻片。與對照腫瘤相比，在經化合物(1)及CTX治療之腫瘤中，生腱蛋白-C及ED-A纖維連蛋白二者之表現程度均降低。

藥理學測試實例21. 與西妥昔單抗組合在小鼠中之FaDu皮下異種移植模型中之抗腫瘤效應(圖16)

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之RPMI-1640培養基中培養之人類頭頸部鱗狀細胞癌(SCCHN)細胞系FaDu用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 5×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 µL之體積接種至無胸腺小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，7週齡，Charles River Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後10天，藉由使用電子數位卡尺(Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之長度及寬度，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm)/2

相對腫瘤體積(RTV) = 腫瘤體積(第X天) / 腫瘤體積(第1天)

基於TV，將小鼠隨機分組(第1天)。每一群組係由6隻小鼠組成。將化合物(1)溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。將化合物(1) (20 µg/kg、60 µg/kg或180 µg/kg)及西妥昔單抗(CTX, Erbitux®, Merck Serono Co., Ltd.) (10 mg/kg)用鹽水稀釋，並在第1天靜脈內注射。每一群組之RTV變化示於圖16中。在180 µg/kg及60 µg/kg劑量下，化合物(1)與CTX之抗腫瘤效能強於CTX單一療法，其中腫瘤消退。化合物(1)在20 µg/kg之劑量下與CTX組合之抗腫瘤效能趨向於強於CTX單一療法。

藥理學測試實例22. 作為單一療法在小鼠中之軟組織肉瘤異種移植模型中之抗腫瘤效應(圖17)

MES-SA

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之RPMI-1640中培養之人類子宮肉瘤細胞系MES-SA用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為2 × 10⁸個細胞/mL以製備細胞懸浮液，且將該懸浮液與Geltrex® (Thermo Fisher Scientific Inc.，編號A1413202)以1:1之比率混合以製備濃度為1 × 10⁸個細胞/mL之細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 µL之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後6天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

腫瘤體積(mm³) = 最長直徑(mm) × 最短直徑(mm) × 最短直徑(mm)/2

相對腫瘤體積(RTV) = 腫瘤體積(第X天) / 腫瘤體積(第1天)

基於在第1天時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由6隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前，用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以180 µg/kg一週一次靜脈內投與持續2週(在第1天及第8天)。在治療組中觀察到腫瘤生長延遲之抗腫瘤活性。

HT-1080

將已於含有10% FBS、NEAA及抗生素之E-MEM中培養之人類纖維肉瘤細胞系HT-1080用培養基調整至濃度為 3×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 µL之體積接種至無胸腺小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，6週齡，Charles River Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後6天，藉由使用電子數位卡尺(Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之長度及寬度，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

基於TV，將小鼠隨機分組(第1天)。每一群組係由6隻小鼠組成。將化合物(1)溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。將化合物(1) (180 µg/kg)用鹽水稀釋，並在第1天及第8天靜脈內注射。每一群組之RTV之變化示於圖17中。在治療組中觀察到腫瘤消退之抗腫瘤活性。

CTG-2041

將人類血管肉瘤CTG-2041之腫瘤片段s.c.植入於雌性小鼠之左側腹中。使用數位卡尺一週兩次監測腫瘤生長，以便根據以下計算公式來計算

腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

當腫瘤體積達到大約200 mm³時，按腫瘤體積將動物匹配至治療或對照組中，且在第1天起始投用。每一群組係由5隻小鼠組成。將化合物(1)溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。將化合物(1) (100 µg/kg)稀釋於鹽水中，並在第1天及第8天靜脈內注射。每一群組之RTV之變化示於圖17中。在治療組中觀察到腫瘤消退之抗腫瘤活性。

藥理學測試實例23. 作為單一療法在小鼠中之子宮內膜癌肉瘤異種移植模型中之抗腫瘤效應(圖18)

HEC-108

將已於含有15% FBS及抗生素之E-MEM中培養之人類子宮內膜癌細胞系HEC-108用培養基調整至濃度為 7.14×10^7 個細胞/mL以製備細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以150 µL之體積接種至無胸腺小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，6週齡，Charles River Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後13天，藉由使用電子數位卡尺(Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之長度及寬度，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

基於TV，將小鼠隨機分組(第1天)。每一群組係由6隻小鼠組成。將化合物(1)溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。將化合物(1) (180 µg/kg)稀釋於鹽水中，並在第1天及第8天靜脈內注射。每一群

組之RTV之變化示於圖18中。在治療組中觀察到腫瘤生長延遲之抗腫瘤活性。

AN3CA

將已於含有10% FBS及青黴素-鏈黴素之E-MEM中培養之人類子宮內膜癌細胞系AN3CA用漢克氏平衡鹽溶液調整至濃度為 1.4×10^8 個細胞/mL以製備細胞懸浮液，並將該懸浮液與Geltrex® (Thermo Fisher Scientific Inc.，編號A1413202)以1:1之比率混合以製備濃度為 7×10^7 個細胞/mL之細胞懸浮液。將該細胞懸浮液以100 µL之體積接種至6週齡裸小鼠(CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj，雌性，Charles River Laboratories Japan Inc.)之右側腹之皮下部分中。細胞接種(第1天)後12天，藉由使用電子數位卡尺(Digimatic™測徑器，Mitutoyo Corporation)量測每一小鼠中腫瘤之最短直徑及最長直徑，以便根據以下計算公式來計算腫瘤之體積：

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \text{最長直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} \times \text{最短直徑(mm)} / 2$$

$$\text{相對腫瘤體積(RTV)} = \text{腫瘤體積(第X天)} / \text{腫瘤體積(第1天)}$$

基於在第1天時所獲得之腫瘤體積，將小鼠分組，使得腫瘤體積之平均值在各組之間實質上相等。該實驗係在各自由5隻小鼠組成之群組上進行。將測試化合物溶解於DMSO中，並將溶液在使用之前儲存於冰箱中。在即將投與之前，用鹽水稀釋原液。將於鹽水中之測試化合物以180 µg/kg一週一次靜脈內投與持續2週(在第1天及第8天)。在治療組中觀察到腫瘤消退之抗腫瘤活性。

藥理學測試實例24. NCI-N87及MKN-28生長抑制分析

在此分析中，分別量測測試化合物在人類胃癌細胞系NCI-N87及MKN-28中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37℃)中將NCI-N87及

MKN-28細胞維持在含有10% FBS、青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加100 µL用培養基調整至濃度為 3×10^4 個細胞/mL之NCI-N87或MKN-28細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37°C)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加100 µL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37°C)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo®發光細胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，並示於表14中。

表14

	NCI-N87	MKN-28
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.007	0.017
化合物(1)	0.002	0.015

藥理學測試實例25. HuTu 80生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在自十二指腸組織分離之人類小腸癌細胞系HuTu 80中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37°C)中將HuTu 80細胞維持在含有10% FBS、青黴素及鏈黴素之EMEM培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加100 µL用培養基調整至濃度為 3×10^4 個細胞/mL之HuTu80細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37°C)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加100 µL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37°C)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo®發光細胞存

活率分析 (Promega) 利用 EnVision 2103 多標記讀數儀 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，並示於表15中。

表15

HuTu 80	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.031
化合物(1)	0.019

藥理學測試實例26. SW780生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在人類尿路上皮癌細胞系SW780中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37℃)中將SW780細胞維持在含有10% FBS、青黴素及鏈黴素之RPMI-1640培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加100 μL用培養基調整至濃度為3×10⁴個細胞/mL之SW780細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37℃)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加100 μL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37℃)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo[®]發光細胞存活率分析 (Promega) 利用 EnVision 2103 多標記讀數儀 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) 測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，並示於表16中。

表16

SW780	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.032
化合物(1)	0.017

藥理學測試實例27. HS-SY-II生長抑制分析

在此分析中，量測測試化合物在人類滑膜肉瘤細胞系HS-SY-II中之生長抑制活性。於5% CO₂培育器(37℃)中將SH-SY-II細胞維持在含有10% FBS、青黴素及鏈黴素之DMEM培養基中。向96孔板(Becton, Dickinson and Company, 353219)之每一孔添加100 μL用培養基調整至濃度為3×10⁴個細胞/mL之HS-SY-II細胞懸浮液，並將該等細胞於5% CO₂培育器(37℃)中培育過夜。在第二天，向每一孔添加100 μL懸浮於培養基中之於三倍稀釋系列中之化合物(1)或軟海綿素B，並將所得物於5% CO₂培育器(37℃)中培育3天。然後，藉由CellTiter-Glo[®]發光細胞存活率分析(Promega)利用EnVision 2103多標記讀數儀(Perkin-Elmer, Wellesley, MA)測定細胞存活率。含有細胞但不添加測試化合物之孔的值定義為100%且不含細胞之孔的值定義為0%。計算將細胞生長抑制50%所需測試化合物之濃度(即，IC₅₀值)，並示於表17中。

表17

HS-SY-II	
測試化合物	(IC ₅₀ (nM))
軟海綿素B	0.010
化合物(1)	0.002

等效形式及範圍

在申請專利範圍中，除非指示相反情形或自上下文中另外明顯可見，否則諸如「一(a、an)」及「該(the)」等冠詞可意指一個或一個以上。除非指示相反情形或自上下文中另外明顯可見，否則若群組成員中之一個、一個以上或所有均存在於、用於給定產物或製程或以其他方式與給定產物或製程相關，則在群組之一或多個成員之間包括「或」之申請專利範圍或說明書被認為係滿意的。本發明包括其中恰好一個群組成員存在於、用於給定產物或製程或以其他方式與給定產物或製程相關之實施例。本發明包括其中一個以上或所有群組成員均存在於、用於給定產物或製程或以其他方式與給定產物或製程相關之實施例。

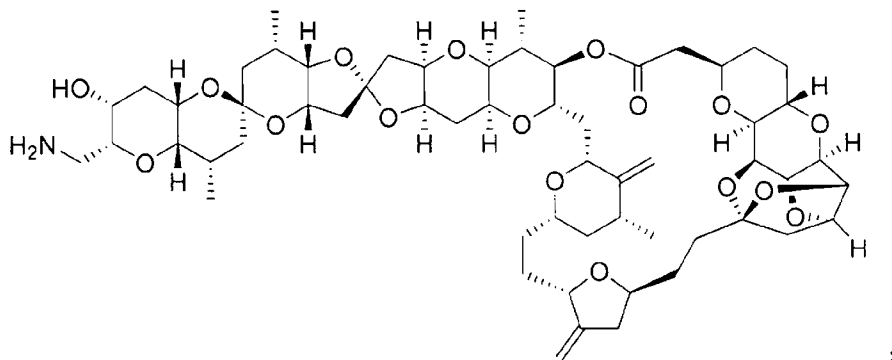
此外，本發明涵蓋其中將來自所列表技術方案中之一或多者之一或多種限制、要素、條款及說明性術語引入至另一技術方案中之所有變化形式、組合及排列。舉例而言，附屬於另一技術方案之任一技術方案可經修飾以包括一或多種在附屬於同一基礎技術方案之任何其他技術方案中所發現之限制。倘若以列表形式(例如，以馬庫什群組(Markush group)格式)呈現要素，則亦揭示該等要素之每一亞組且可自該群組移除任何要素。應理解，通常，倘若稱本發明或本發明之態樣包含特定要素及/或特徵，則本發明之某些實施例或本發明之態樣係由此等要素及/或特徵組成或基本上由其組成。出於簡單性目的，彼等實施例未在本文中以該等語言明確陳述。亦應注意，術語「包含」及「含有」意欲為開放性的且容許包括其他要素或步驟。在給出範圍之情形下，終點包括在內。此外，除非另有指示或自上下文及熟習此項技術者之理解另外明顯可見，否則表述為範圍之值可設想在本發明之不同實施例中在所陳述範圍內之任何特定值或子範圍直至該範圍下限之單位之十分之一，除非上下文另外明確地指明。

熟習此項技術者僅使用常規實驗即可識別或能夠斷定本文所闡述之特定實施例之諸多等效形式。本文所闡述之本發明實施例之範圍並不意欲限於以上說明，而係如隨附申請專利範圍中所陳述。熟習此項技術者應瞭解，可在不背離本發明之精神或範圍之情形下做出各種變化及修改，如以下申請專利範圍中所界定。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

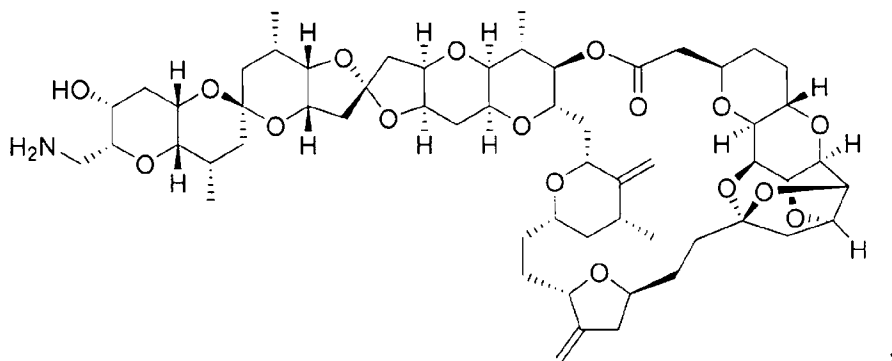
一種具有以下結構之化合物或其醫藥學上可接受之鹽用於製備用以治療膀胱癌之醫藥組合物之用途，



其中該膀胱癌係以血管生成、侵襲或轉移為特徵。

【請求項2】

一種醫藥組合物用於製備用以治療膀胱癌之藥物之用途，該醫藥組合物包含具有以下結構之化合物：



或其醫藥上可接受之鹽，該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係於醫藥上可接受之載劑中。

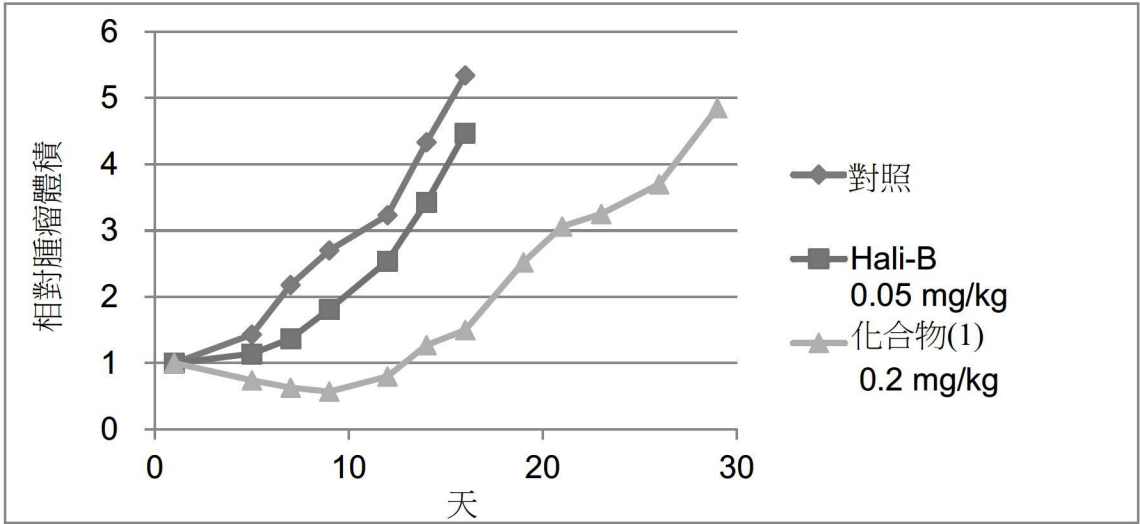
【請求項3】

如請求項2之用途，其中該膀胱癌係以血管生成、侵襲或轉移為特徵。

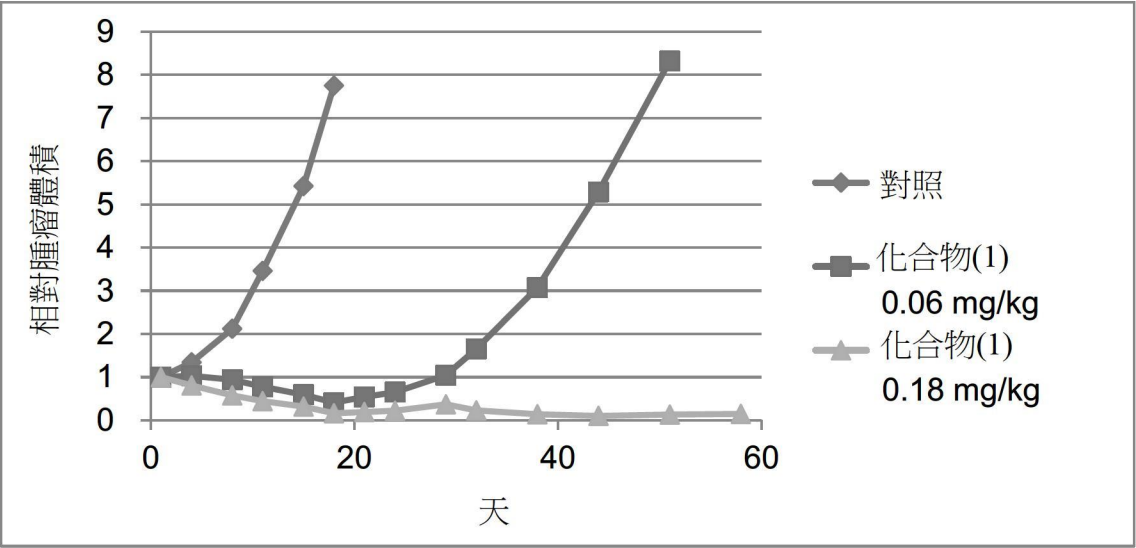
【請求項4】

如請求項2或3之用途，其中該膀胱癌係尿路上皮癌。

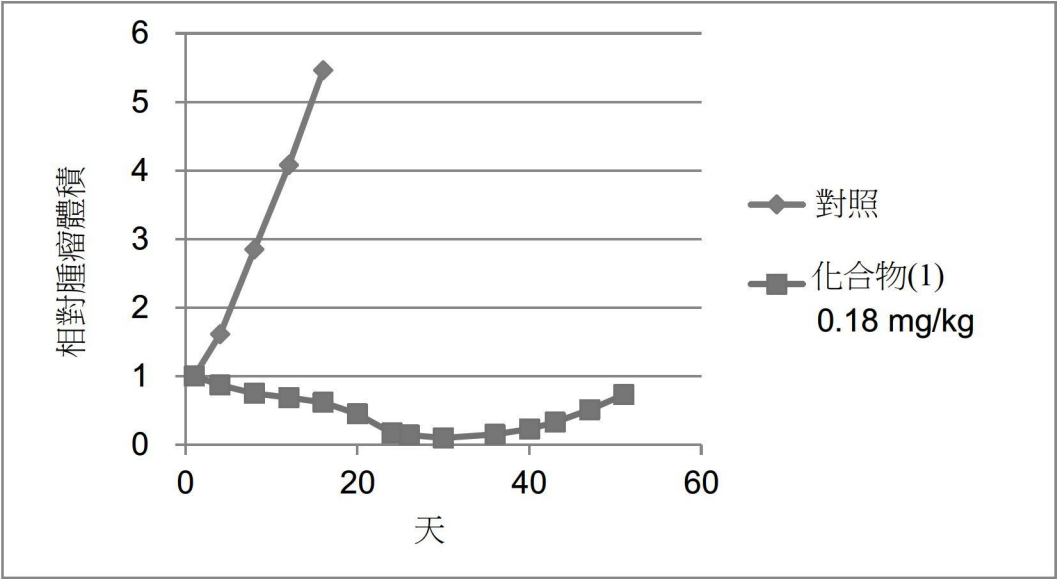
【發明圖式】



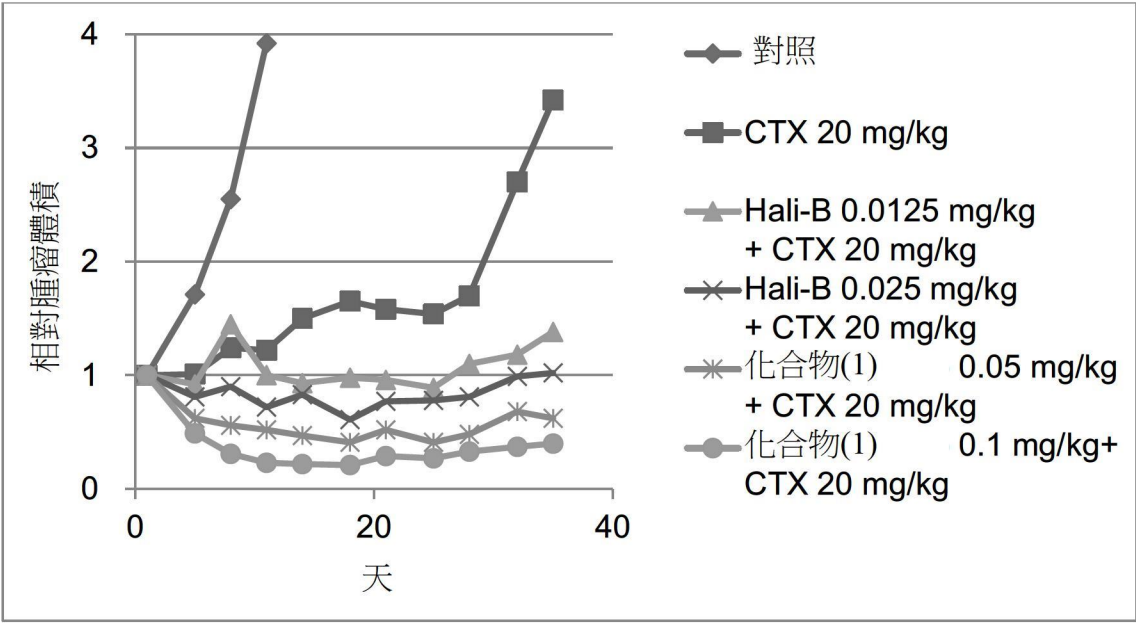
【圖1】



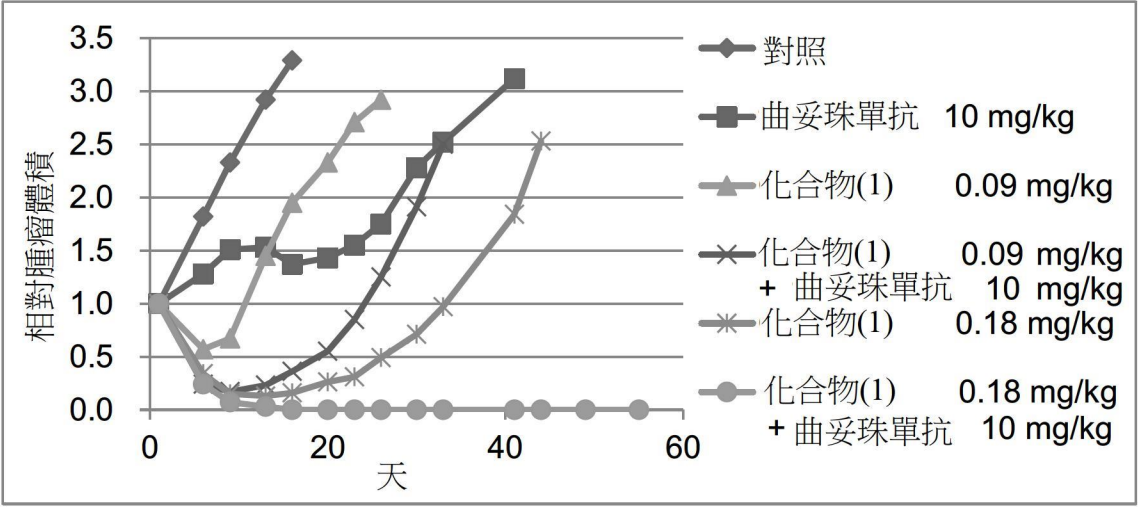
【圖2】



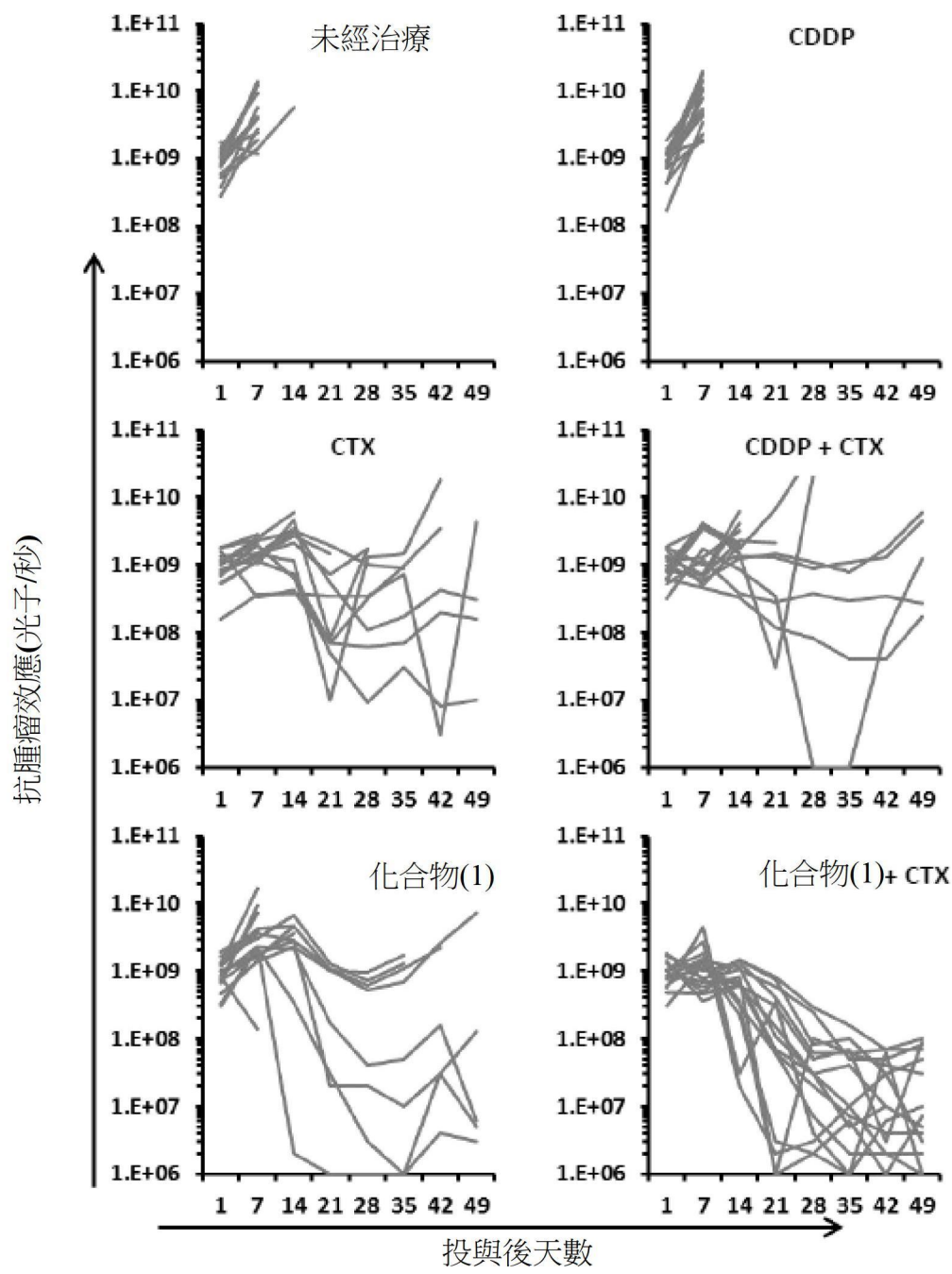
【圖3】



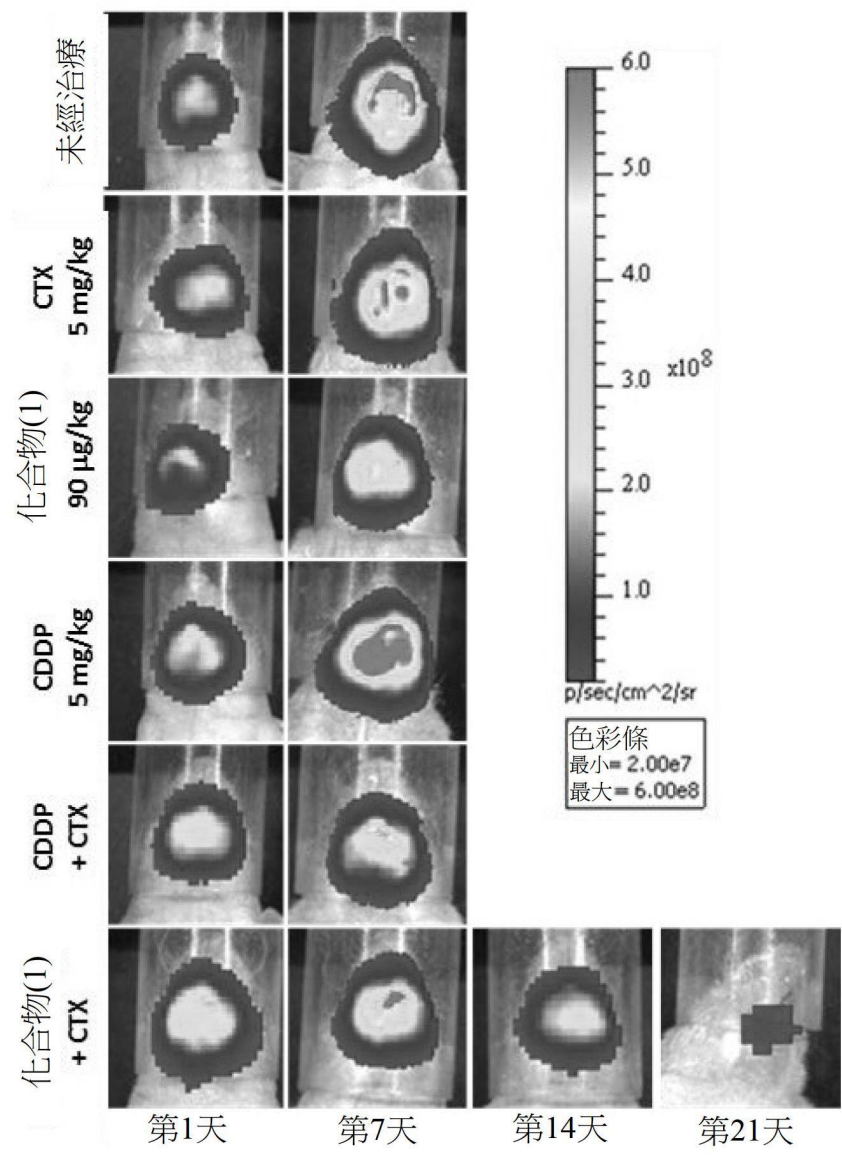
【圖4】



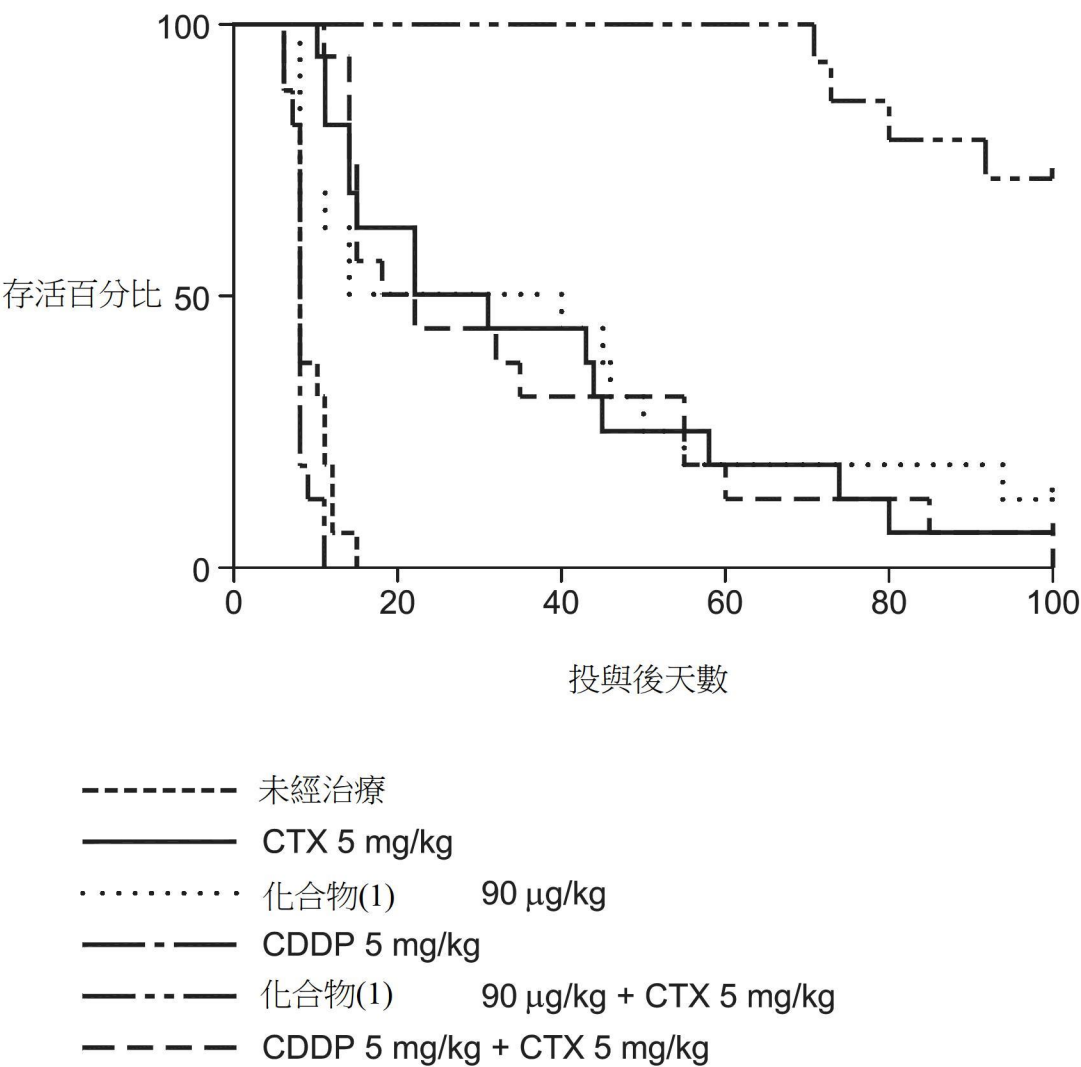
【圖5】



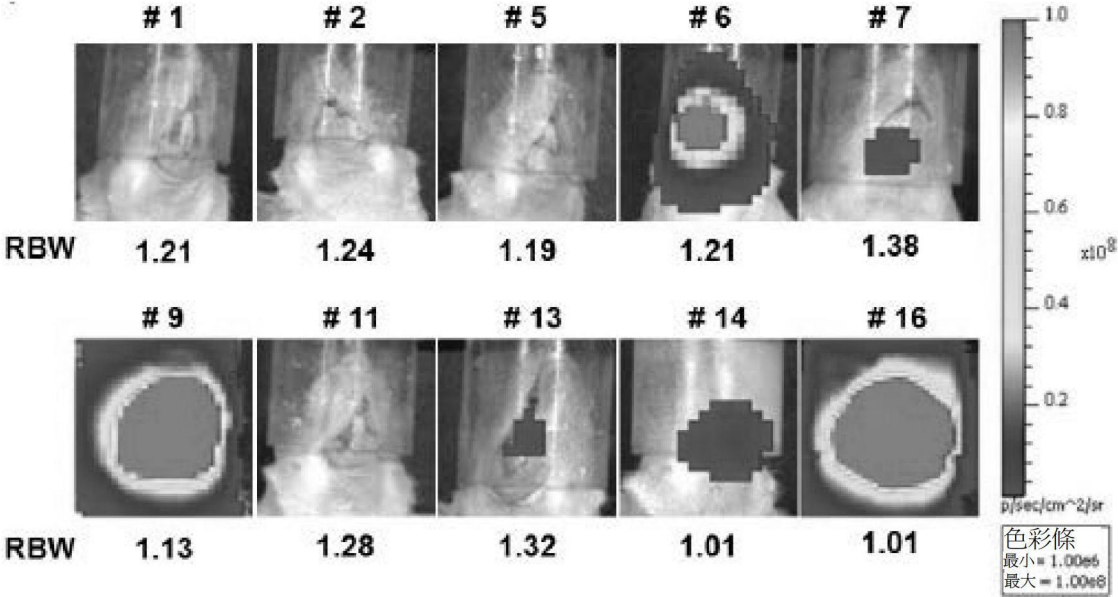
【圖6A】



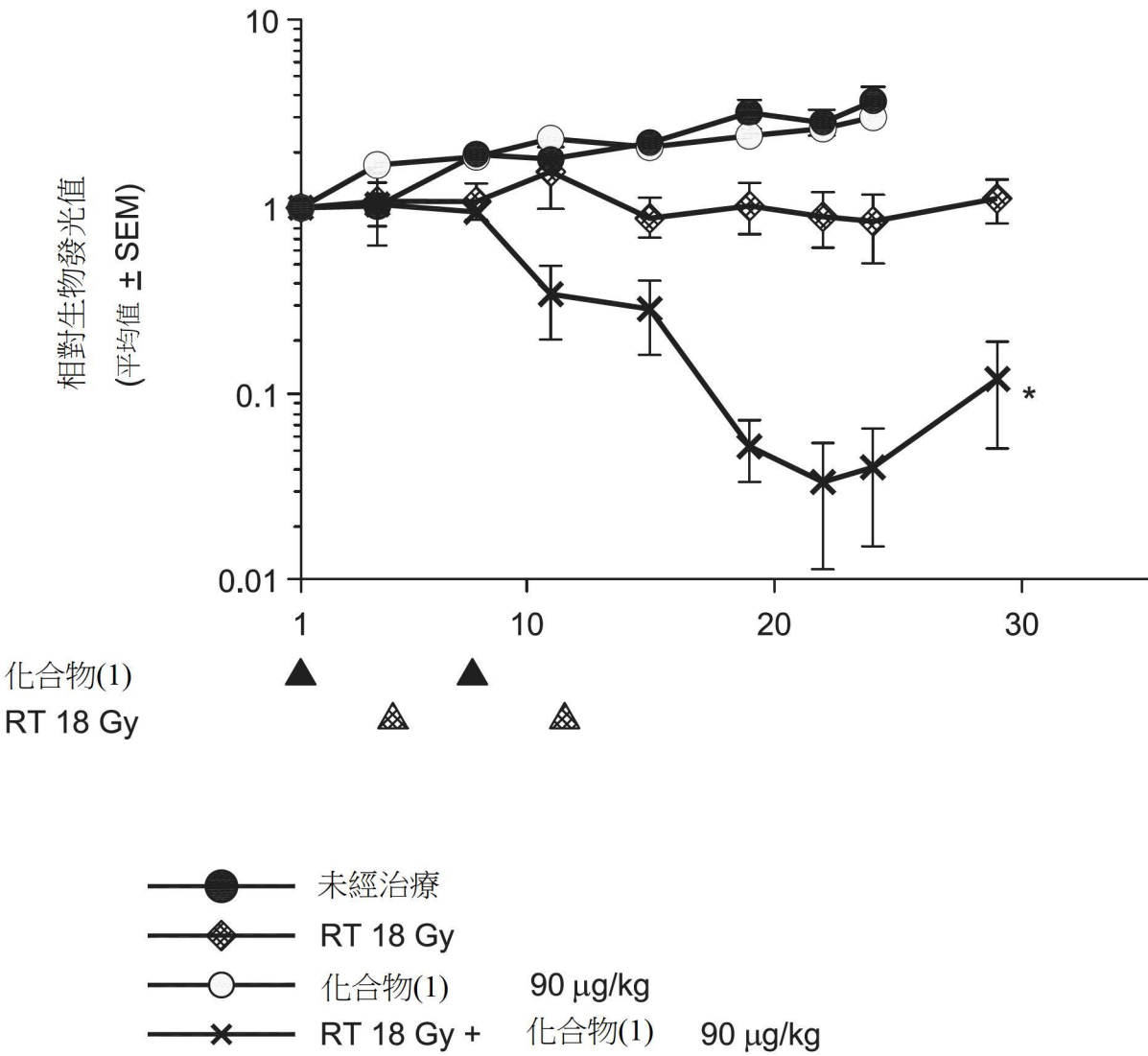
【圖6B】



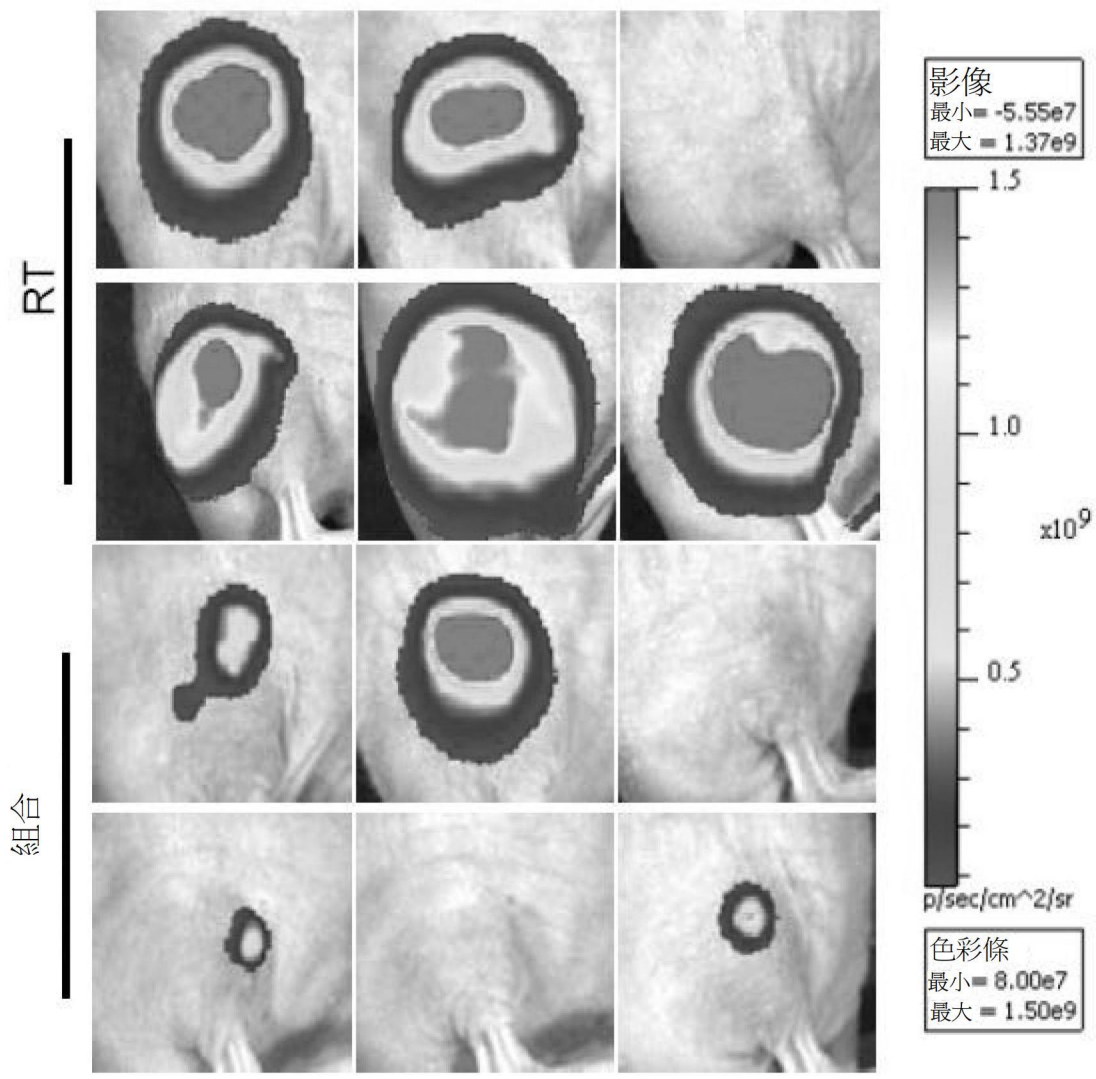
【圖7A】



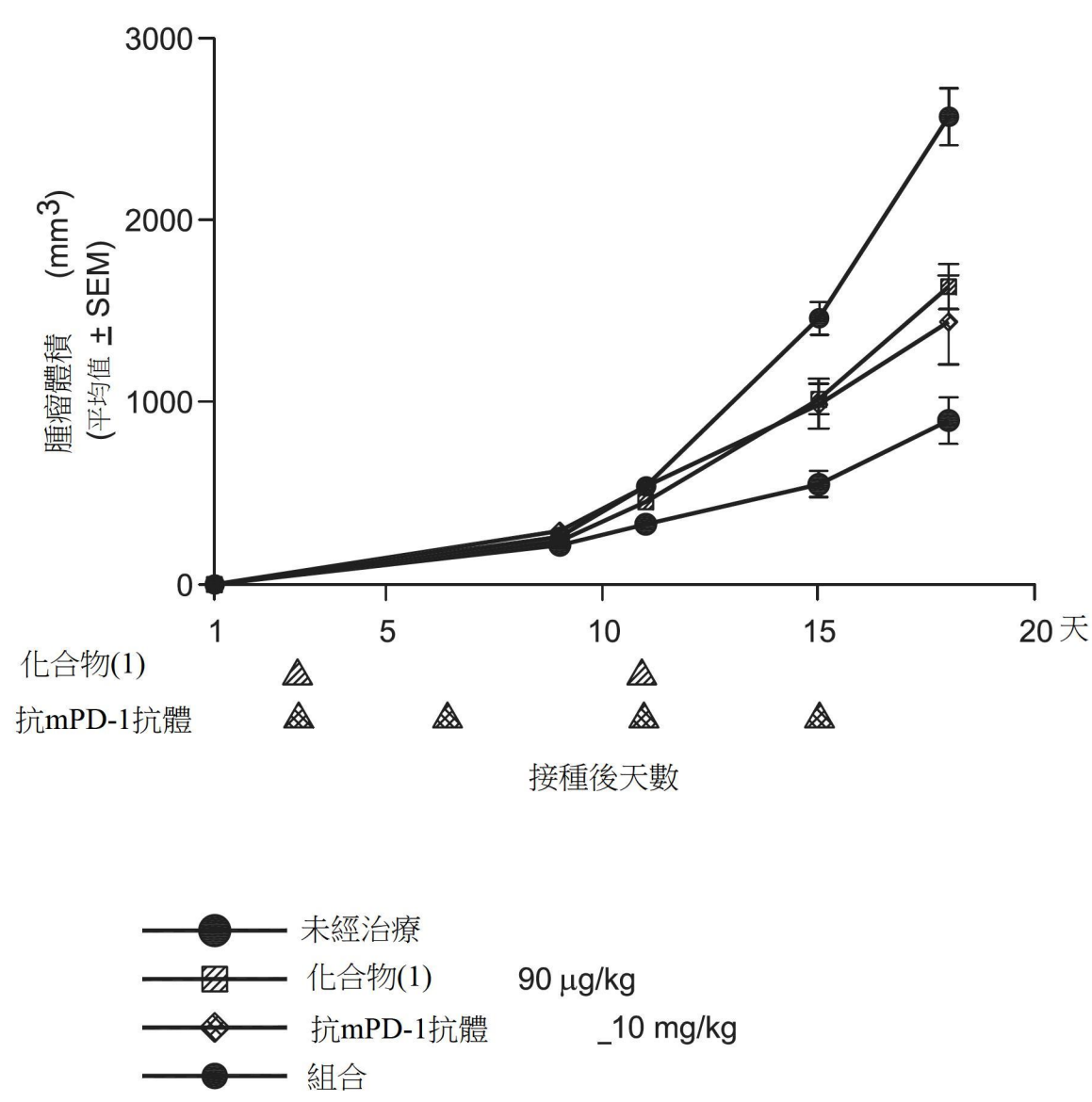
【圖7B】



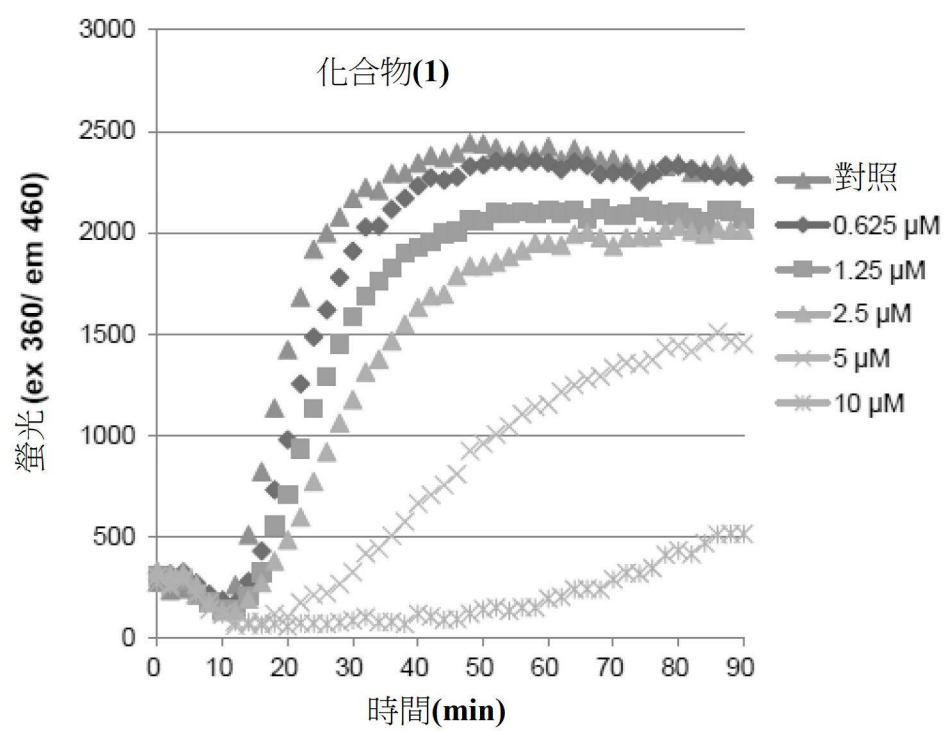
【圖8A】



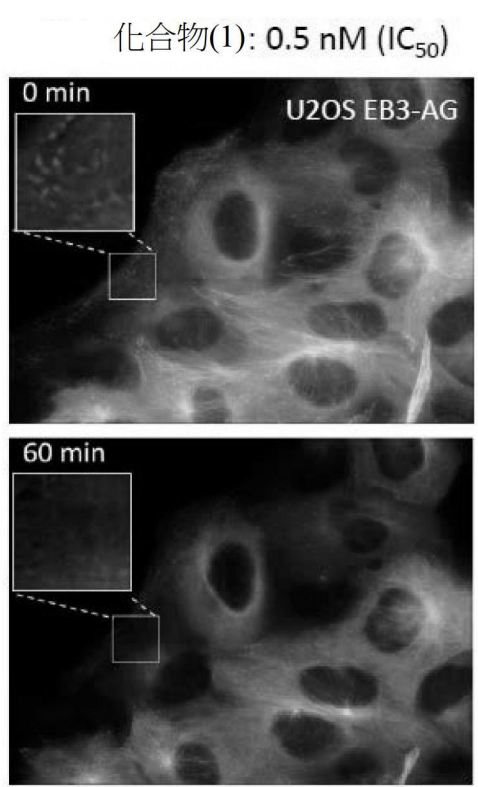
【圖8B】



【圖9】



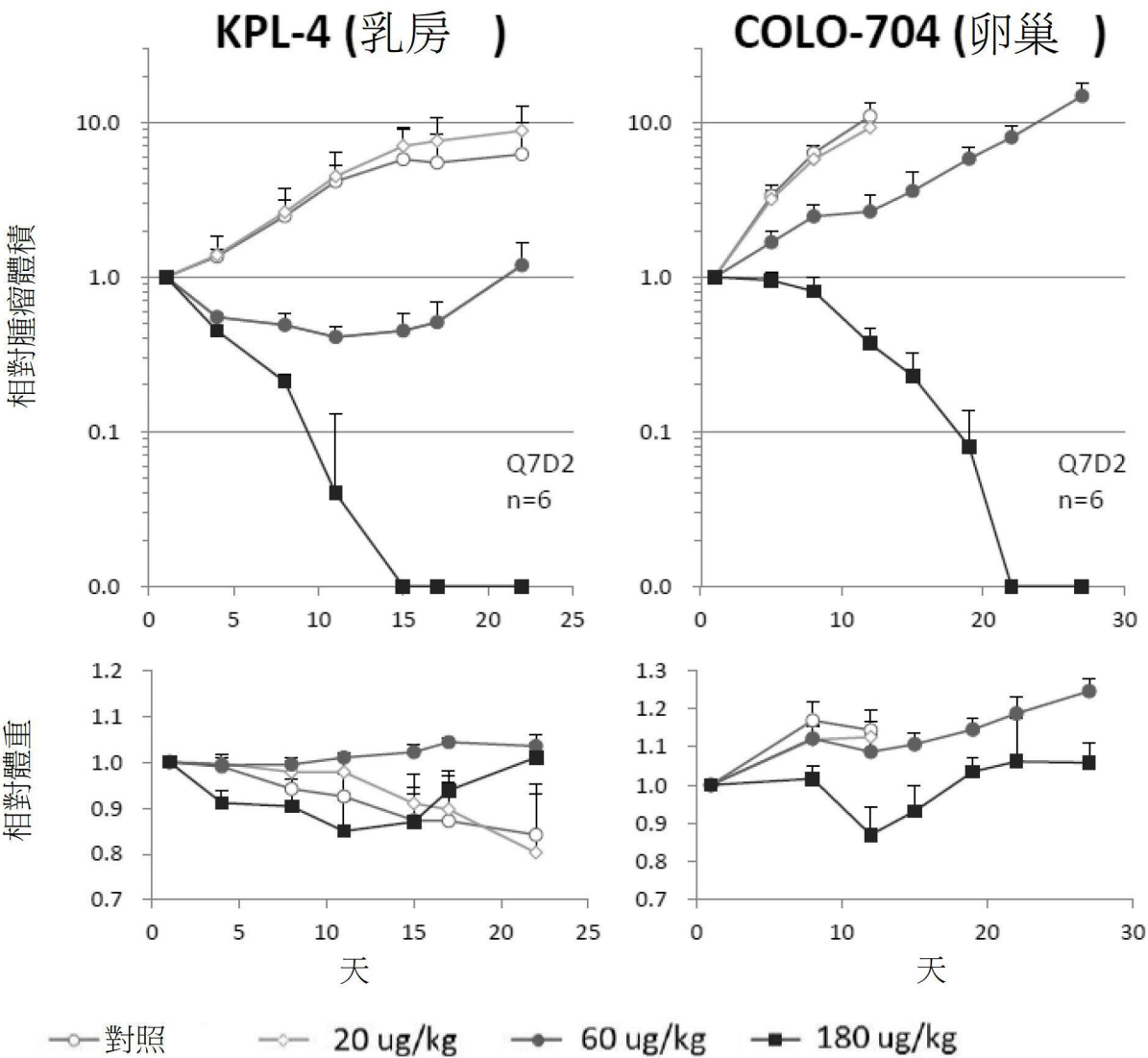
【圖10A】



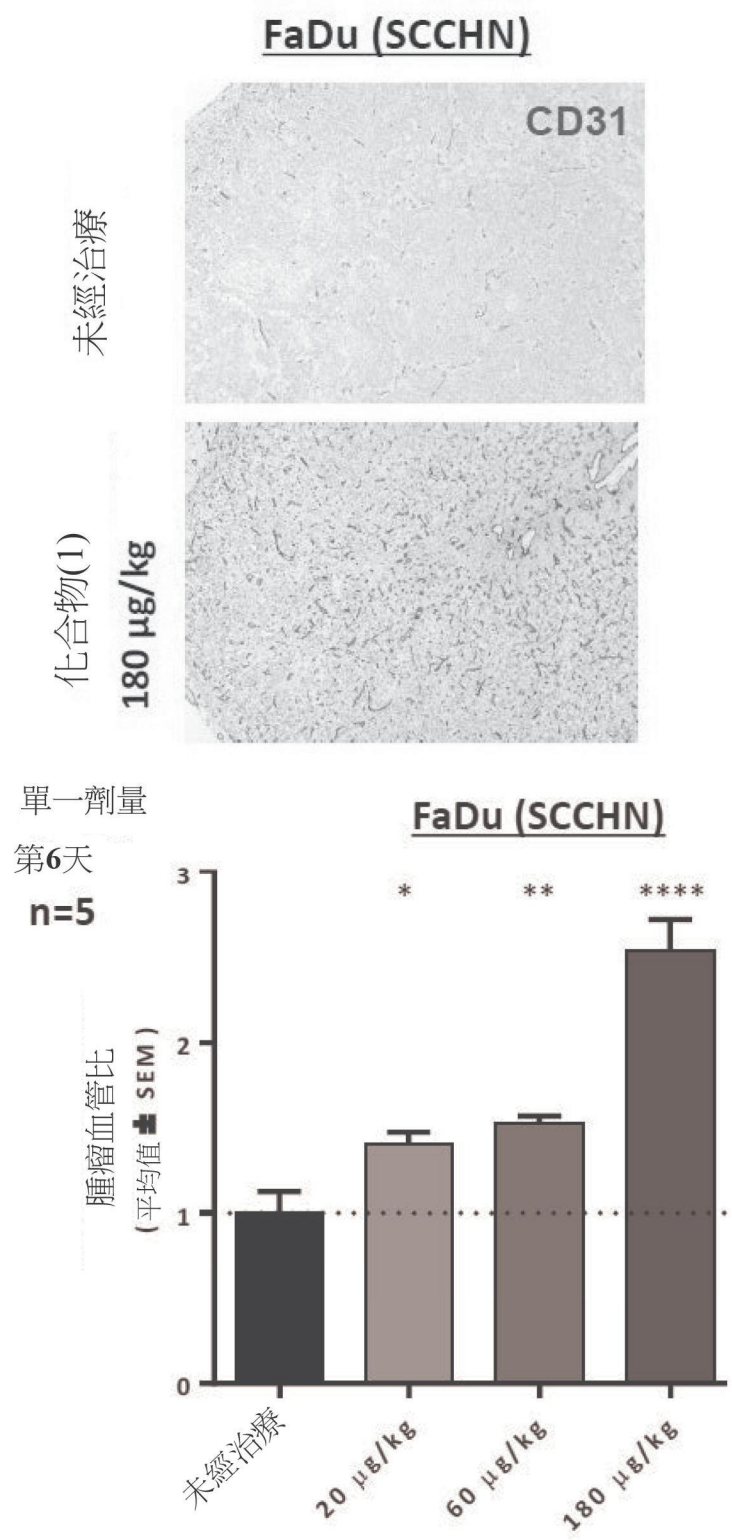
【圖10B】

化合物	活體外細胞生長抑制 IC ₅₀ (nM)					P-gp 敏感性
	食管癌		子宮肉瘤			
	OE21	OE33	TE-8	MES-SA	MES-SA/Dx5-Rx1	
化合物(1)	0.061	0.29	0.095	0.070	8.7	123

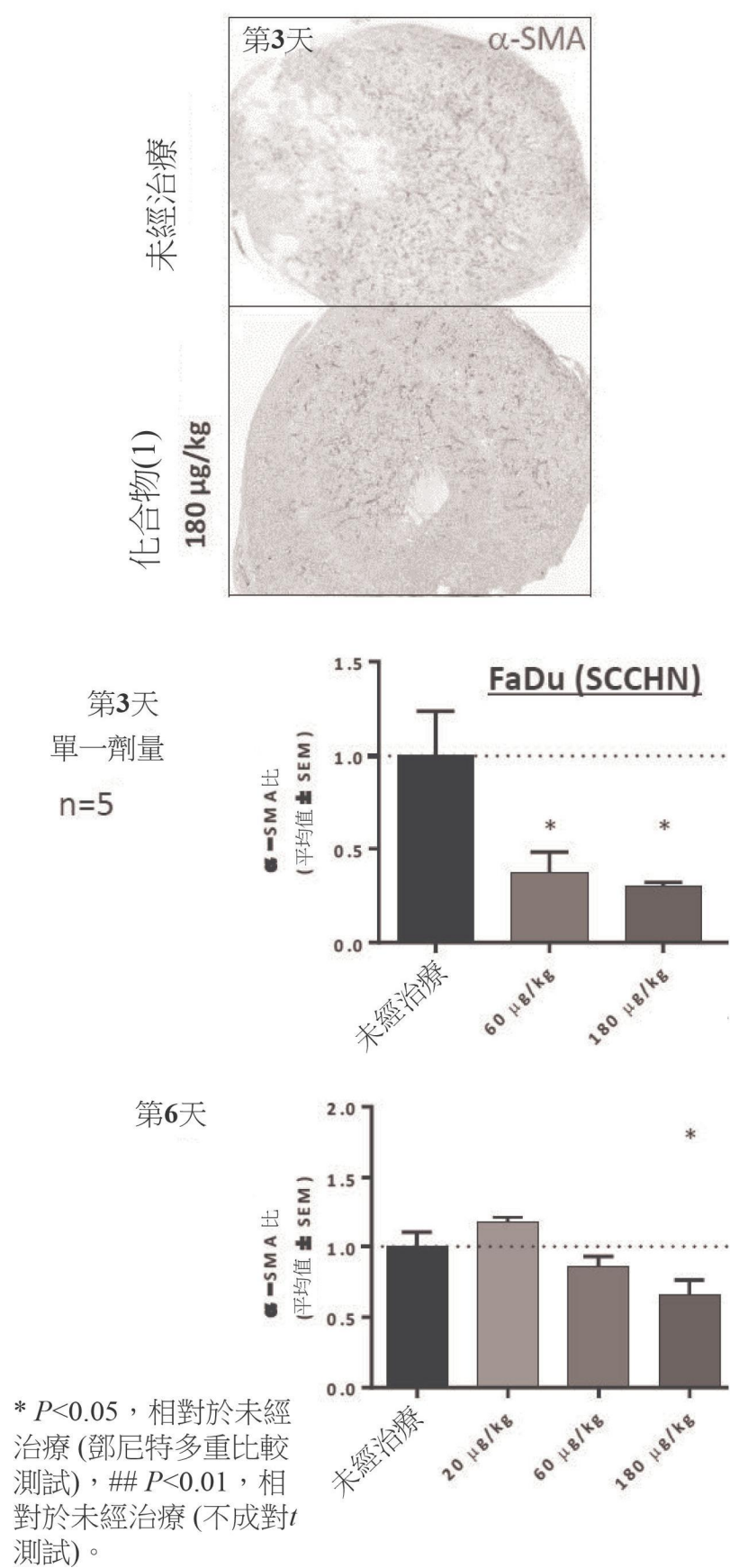
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖14】

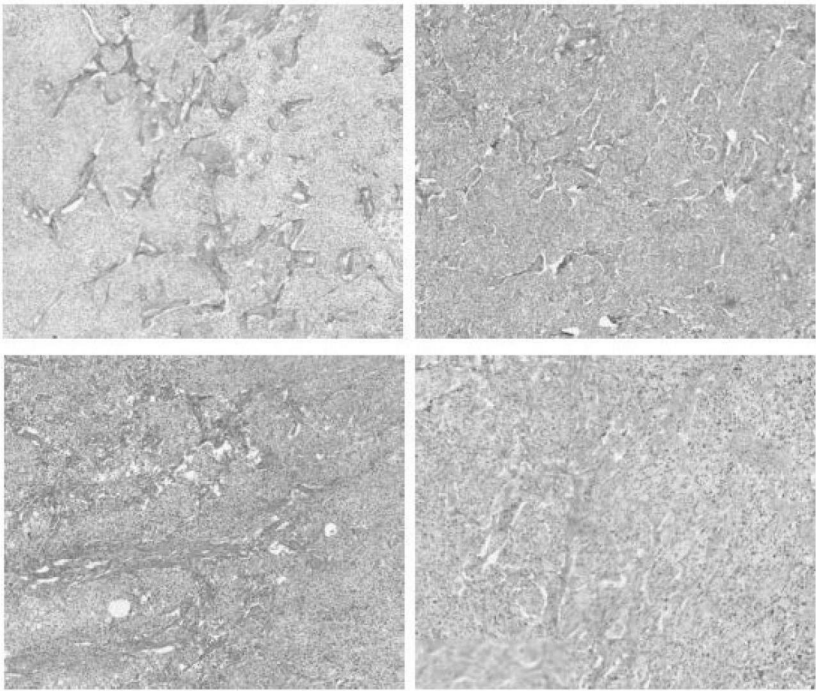
**FaDu
(SCCHN)**
單一劑量
第6天

生腱蛋白-C

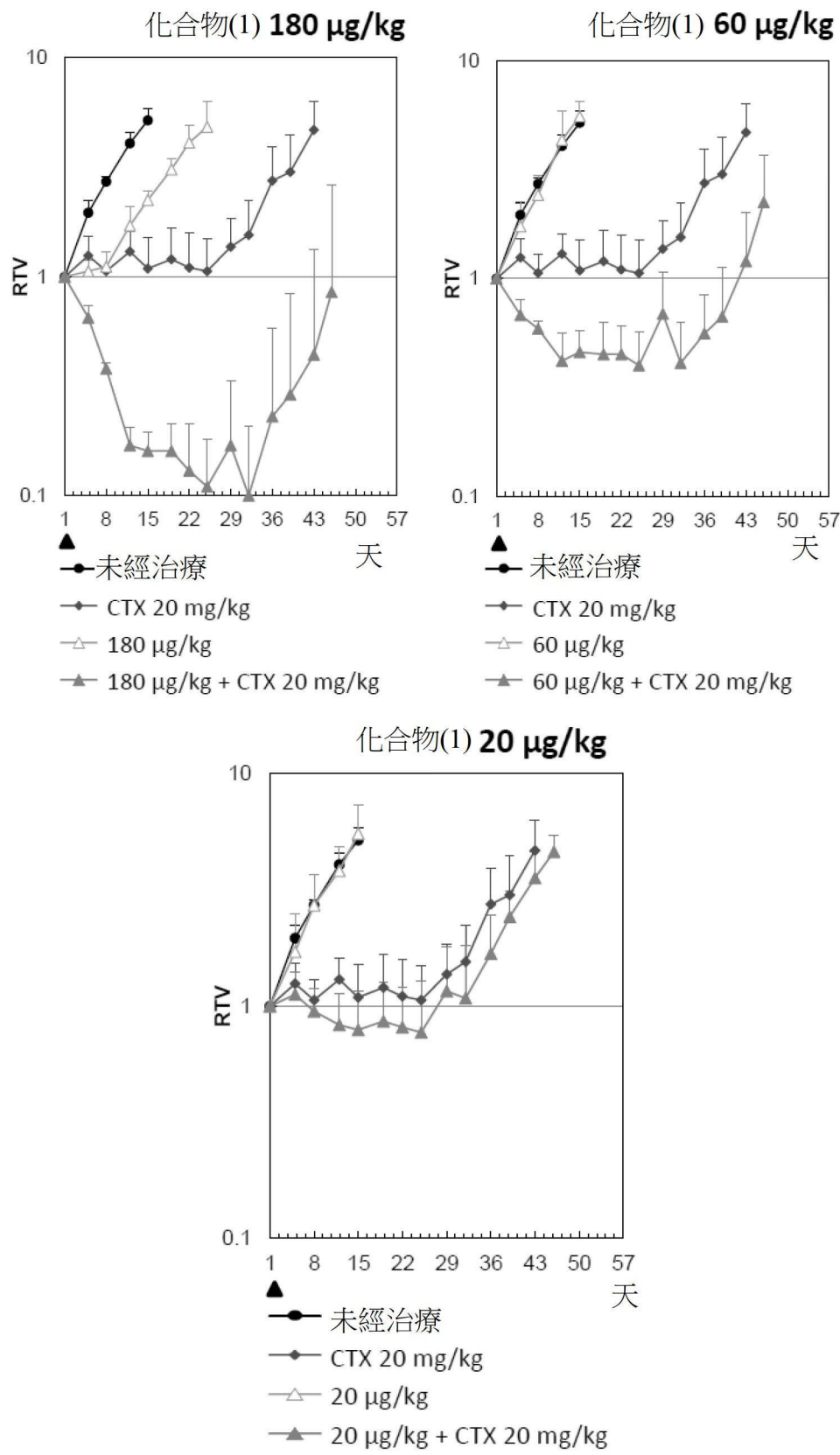
EDA-纖維蛋白

對照

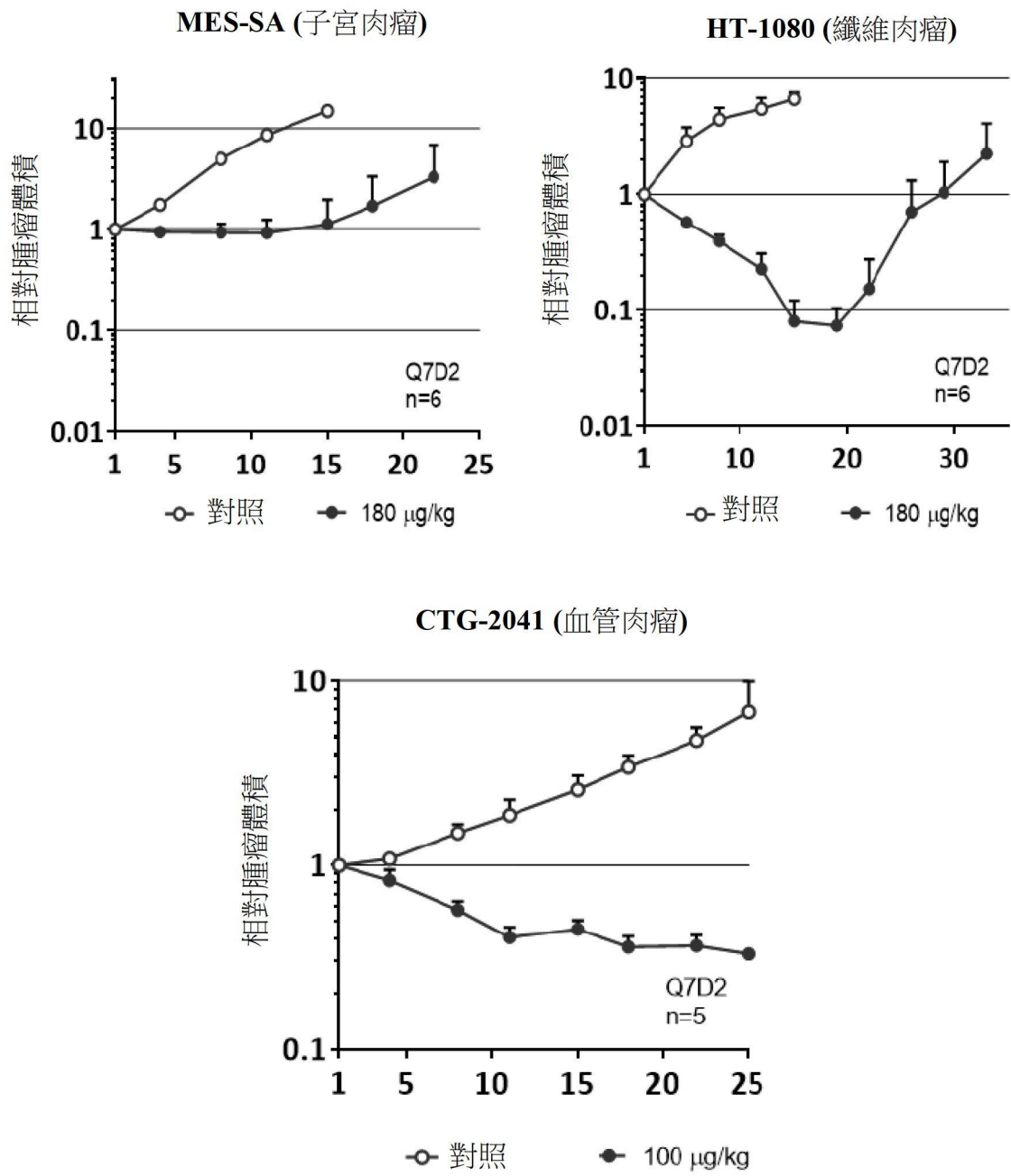
180 µg/kg化合物(1) +西妥
昔單抗



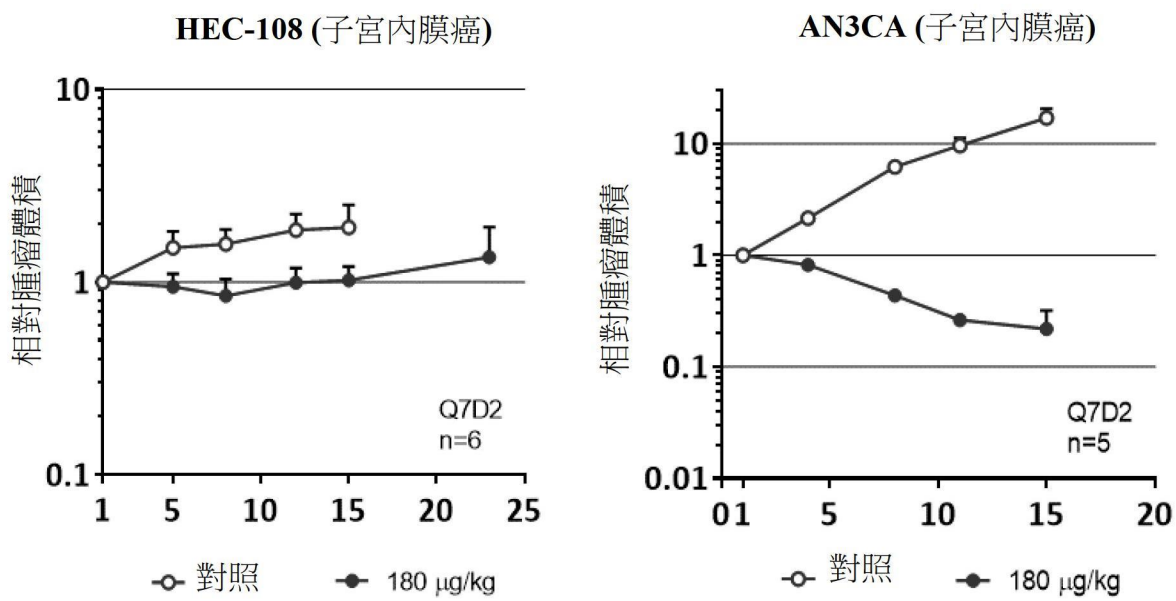
【圖15】



【圖16】



【圖17】



【圖18】