

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201992372 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.18

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

(22) Дата подачи заявки  
2018.04.03

(54) МАКРОЦИКЛИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/482,030; 62/526,677; 15/814,105;  
62/586,416

(72) Изобретатель:  
Киши Йошито (US), Кира Казунобо,  
Ито Кен (JP)

(32) 2017.04.05; 2017.06.29; 2017.11.15;  
2017.11.15

(74) Представитель:  
Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Лебедев В.В., Парамонова К.В.,  
Угрюмов В.М., Глухарёва А.О. (RU)

(33) US

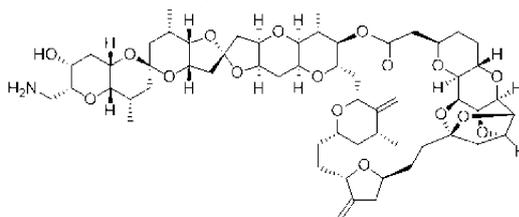
(86) PCT/US2018/025887

(87) WO 2018/187331 2018.10.11

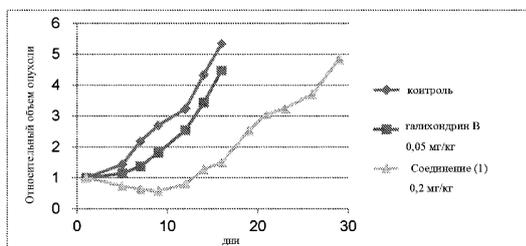
(71) Заявитель:

ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУС ОФ  
ХАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US); ЭЙСИАЙ  
Р ЭНД Д МЕНЕДЖМЕНТ КО., ЛТД.  
(JP)

(57) Настоящее изобретение относится к новому соединению (1), характеризующемуся эффектом ремоделирования сосудов опухоли и/или активностью против CAF (ассоциированных с раком фибробластов), или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе, и их медицинским применениям.



Соединение (1)



A1

201992372

201992372

A1

# **МАКРОЦИКЛИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Родственные заявки**

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с предварительными заявками на выдачу патента США с серийным номером 62/482030, поданной 5 апреля 2017 г., 62/526677, поданной 29 июня 2017 г., и серийным номером 62/586416, поданной 15 ноября 2017 г., и в соответствии с 35 U.S.C. § 120 в соответствии с заявкой на патент США с серийным номером 15/814105, поданной 15 ноября 2017 г.; полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

[0002] Настоящее изобретение относится к новому макроциклическому соединению, характеризующемуся эффектами ремоделирования сосудов опухоли и активностью против САФ (ассоциированный с раком фибробласт). Соединение можно использовать для лечения рака или ингибирования роста опухоли у субъекта.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0003] Галихондрины, такие как галихондрин В, представляют собой противораковые средства, первоначально выделенные из морской губки *Halichondria okadai* (см., например, D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)) и впоследствии обнаруженные у *Axinella* sp., *Phakellia carteri* и *Lissondendryx* sp. Полный синтез галихондрина В был опубликован в 1992 году (см., например, Y. Kishi *et al.* “Total Synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin B” J. Am. Chem. Soc. 114, 3162 (1992)). Галихондрин В продемонстрировал ингибирование *in vitro* полимеризации тубулина, сборки микротрубочек, поперечного сшивания бета-5-тубулина, связывания GTP и винбластина с тубулином и тубулин-зависимого гидролиза GTP, и показал противораковые свойства *in vitro* и *in vivo* (см., например, Y. Hirata *et al.* “Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge” Pure Appl. Chem., 58, 701 (1986); Fodstad *et al.* “Comparative antitumor activities of halichondrins and vinblastine against human tumor xenografts” J. of Experimental Therapeutics & Oncology 1996; 1: 119, 125).

**[0004]** Эрибулин мезилат (Halaven<sup>TM</sup>), который был разработан на основе галихондрин В (см., например, международную патентную публикацию № WO 1999/065894, опубликованную 23 декабря 1999 г.; международную патентную публикацию № WO 2005/118565, опубликованную 15 декабря 2005 г., и W. Zheng *et al.* “Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 5551–5554 (2004)), в настоящее время клинически используют во многих странах для лечения, например, метастатического рака молочной железы и распространенной липосаркомы.

**[0005]** Дополнительные патентные публикации, в которых описаны галихондрины, включают в себя патент США № 5436238, Kishi с соавт., выданный 25 июля 1995 г.; патент США № 5338865, Kishi с соавт., выданный 16 августа 1994 г.; и международную патентную публикацию WO 2016/003975, поданную Kishi с соавт., права на все из них переданы Президенту и действительным членам научного общества Гарвардского университета.

**[0006]** См. также, например, патент США № 5786492; патент США № 8598373; патент США № 9206194; патент США № 9469651; международные патентные публикации WO/2009/124237A1; WO/1993/017690A1; WO/2012/147900A1; патент США № 7982060; патент США № 8618313; патент США № 9303050; патент США № 8093410; патент США № 8350067; патент США № 8975422; патент США № 8987479; патент США № 8203010; патент США № 8445701; патент США № 8884031; патент США № RE45324; патент США № 8927597; патент США № 9382262; патент США № 9303039; международные патентные публикации WO/2009/046308A1; WO/2006/076100A3; WO/2006/076100A2; WO/2015/085193A1; WO/2016/176560A1; патент США № 9278979; патент США № 9029573; международные патентные публикации WO/2011/094339A1; WO/2016/179607A1; WO/2009/064029A1; WO/2013/142999A1; WO/2015/066729A1; WO/2016/038624A1 и WO/2015/000070A1.

**[0007]** Ассоциированные с раком фибробласты (CAF), которые широко встречаются в различных солидных опухолях, представляют собой стромальные клетки. Хорошо известно, что CAF играют важную роль в ангиогенезе, инвазии и метастазировании. Сообщается, что существует тесная корреляция между количеством CAF и клиническим прогнозом, например, при инвазивном раке молочной железы (см., например, M. Yamashita *et al.* “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) и аденокарциноме пищевода (см., например, T. J. Underwood *et al.* “Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in esophageal adenocarcinoma” *Journal of Pathol.*, 235, 466, 2015). Также сообщалось, что CAF коррелируют с устойчивостью в различных опухолях, таких как, например, рак молочной железы (см.,

например, P. Farmer *et al.* “A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer” *Nature Medicine.*, 15(1), 68, 2009) и рак головы и шеи (см., например, S. Schmitz *et al.* “Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer” *Oncotarget*, 6 (33), 34288, 2015; Y. Matsuoka *et al.* “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).

**[0008]** Таким образом, было обнаружено, что эффекты ремоделирования сосудов опухоли и активность против CAF приводят к улучшению микроокружения рака, что способствует лечению опухоли. Кровеносные сосуды необходимы для роста опухолей. Реконструированные кровеносные сосуды в опухолях могут доставлять противораковые средства в опухоли, в дополнение к достижению облегчения гипоксии. Сообщается, что индуцированное эрибулином ремоделирование аномальной сосудистой системы опухоли приводит к более функциональному микроокружению, которое может снизить агрессивность опухолей из-за устранения гипоксии внутри опухоли. Поскольку аномальное микроокружение опухоли усиливает как устойчивость к лекарственным средствам, так и метастазирование, очевидная способность эрибулина устранять эти агрессивные характеристики может способствовать его клиническим преимуществам (см., например, Y. Funahashi *et al.* “Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models” *Cancer Sci.* 105 (2014), 1334–1342). На сегодняшний день не сообщалось о противораковых лекарственных средствах, обладающих эффектами ремоделирования сосудов опухоли и активностью против CAF.

**[0009]** Несмотря на достигнутый прогресс, необходимы дополнительные соединения для развития исследований и медицинской помощи при опухолях и раке.

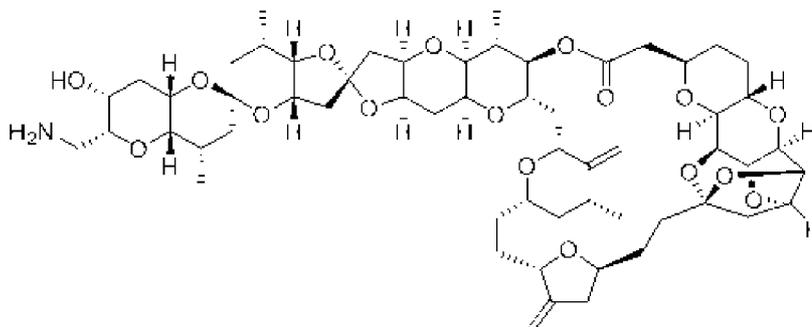
### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

**[0010]** Настоящее изобретение относится к макроциклическому соединению, (например, соединению (1)), характеризующемуся эффектами ремоделирования сосудов опухоли и активностью против CAF, и его фармацевтически приемлемым солям, и его меченым радиоактивным изотопом производным, и их фармацевтическим композициям.

**[0011]** Согласно настоящему изобретению также предусмотрены способы применения соединения (1) для лечения рака, способы обратимого или необратимого ингибирования митоза в клетке и способы ингибирования роста опухоли *in vitro*, *in vivo* или у субъекта. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к наборам,

содержащим соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль, или их фармацевтическую композицию.

**[0012]** Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к соединению, которое представляет собой соединение (1):



Соединение (1),

и его фармацевтически приемлемые соли; и его меченные радиоактивным изотопом производные.

**[0013]** Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или его меченное радиоактивным изотопом производное. Фармацевтические композиции могут содержать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать одно или несколько дополнительных терапевтических средств в комбинации, чередовании или другом виде синхронизированной терапии для достижения требуемой цели лечения.

**[0014]** Настоящее изобретение также относится к способам получения соединения (1) или его промежуточных соединений. Синтетические промежуточные соединения также предусмотрены в настоящем документе как часть настоящего изобретения.

**[0015]** Обнаружено, что соединение (1) оказывает благоприятный эффект на ремоделирование сосудов опухоли и обладает активностью против CAF, как продемонстрировано на фигурах и в примерах. Соответственно, соединение (1) характеризуется потенциальным применением при лечении рака (например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), рака молочной железы, рака пищевода, рака матки, рака яичника, рака толстой и прямой кишки, рака эндометрия, рака желудка, рака тонкой кишки, рака мочевого пузыря, сарком, редких форм рака).

**[0016]** Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста любой опухоли или рака, которые будут отвечать на соединение с эффектами ремоделирования сосудов опухоли и/или активностью против CAF, у субъекта,

как правило, человека, с помощью соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли, или его меченного радиоактивным изотопом производного.

**[0017]** Соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль, или его меченное радиоактивным изотопом производное, или их композицию, можно вводить в комбинации с любым другим активным средством, которое обеспечивает благоприятные результаты для пациента. Согласно определенным вариантам осуществления соединение (1) используют в комбинации с антителом (например, моноклональным антителом). Согласно одному варианту осуществления соединение (1) используют в комбинации, чередовании или другом виде синхронизированной терапии с иммунотерапией, такой как антитело к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), антитело к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека), антитело к PD-1 или антитело к PD-L1, как описано более подробно ниже.

**[0018]** Например, предусмотрен способ лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) у нуждающегося в этом субъекта, как правило, человека, предусматривающий введение субъекту эффективного количества соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли, или его меченного радиоактивным изотопом производного, или их композиции, в комбинации с терапией с помощью моноклональных антител (mAb) к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). Согласно определенным вариантам осуществления mAb к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) представляет собой цетуксимаб.

**[0019]** Согласно другому примеру предусмотрен способ лечения рака молочной железы у нуждающегося в этом субъекта, как правило, человека, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли, или его меченного радиоактивным изотопом производного, или их композиции, в комбинации с терапией с помощью mAb к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека). Согласно определенным вариантам осуществления mAb к HER2 (рецептору эпидермального фактора роста человека) представляет собой трастузумаб. Согласно другим вариантам осуществления соединение (1) можно использовать для лечения рака молочной железы в комбинации с общепринятой химиотерапией, такой как адриамицин, циклофосфамид, таксол и т.д., или антиэстрогеном, таким как селективный модулятор эстрогена (SERM), селективный супрессор эстрогена (SERD), частичный или полный ингибитор эстрогена (такой как фулвестрант) или ингибитор CDK 4/6, такой как палбоциклиб (Pfizer).

**[0020]** Другой аспект настоящего изобретения относится к соединению (1), или его фармацевтически приемлемой соли, или его меченному радиоактивным изотопом

производному, которые могут находиться в форме гидрата, сольвата, полиморфа или их композиции, в наборе, который может представлять собой упаковку с лекарственной формой. Описанные в настоящем документе наборы могут включать в себя однократную дозу или множественные дозы соединения или его фармацевтической композиции. Набор согласно настоящему изобретению может включать в себя инструкции по применению предусмотренных терапевтических лекарственных форм (например, инструкции по применению соединения или фармацевтической композиции, включенных в набор).

**[0021]** Таким образом, настоящее изобретение включает в себя по меньшей мере следующие признаки:

(i) Соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа;

(ii) Способ лечения, который предусматривает введение эффективного количества субъекту, такому как человек, соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, для лечения следующего: рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN), аденокистозная карцинома), рак молочной железы (например, HER2-негативный рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы), рак пищевода (например, аденокарцинома пищевода), рак матки (например, саркома матки), рак яичника, рак толстой и прямой кишки, саркома (например, синовиальная саркома, ангиосаркома, саркома мягких тканей, фибросаркома, саркома матки), рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак), рак желудка, рак тонкой кишки (например, аденокарцинома тонкой кишки), рак эндометрия или редкая форма рака;

(iii) Способ лечения, который предусматривает введение эффективного количества субъекту, такому как человек, соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, для применения при лечении медицинского нарушения, такого как рак или опухоль, которые отвечают на эффекты ремоделирования сосудов и/или активность против CAF;

(iv) Соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, для применения при лечении следующего: плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN), рак молочной железы, рак пищевода,

рак матки, рак яичника, рак толстой и прямой кишки, саркома, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак тонкой кишки, рак эндометрия или редкая форма рака;

(v) Соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, для применения при лечении медицинского нарушения, такого как рак или опухоль, которые отвечают на эффекты ремоделирования сосудов и/или активность против САФ;

(vi) Дейтерированное производное соединения (1);

(vii) Способ производства лекарственного средства, предназначенного для терапевтического применения для лечения или профилактики нарушений, таких как рак или опухоль, которые отвечают на эффекты ремоделирования сосудов и/или активность против САФ, отличающийся тем, что соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, описанные выше, или вариант осуществления активного соединения, используют в производстве;

(viii) Соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, в по существу чистой форме (например, по меньшей мере 90 или 95%);

(ix) Фармацевтически приемлемая композиция соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, в фармацевтически приемлемом носителе или вспомогательном веществе;

(x) Фармацевтически приемлемая лекарственная форма соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе или вспомогательном веществе;

(xi) Соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, для лечения нарушения, описанного в настоящем документе, отличающееся тем, что оно действует через механизм действия, отличный от эффектов ремоделирования сосудов и/или активности против САФ; и

(xii) Способы получения соединений, описанных в настоящем документе, и промежуточных соединений в синтезе.

### **Краткое описание графических материалов**

[0022] Прилагаемые графические материалы, которые включены в настоящее описание изобретения и составляют его часть, иллюстрируют несколько вариантов осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием предоставляют неограничивающие примеры изобретения.

[0023] На *фигуре 1* показаны противоопухолевые эффекты соединения (1) в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu (рак головы и шеи) у мышей в качестве монотерапии, как описано в примере фармакологического испытания 4.

[0024] На *фигуре 2* показана противоопухолевая активность соединения (1) против подкожной ксенотрансплантатной модели OSC-19 (рак головы и шеи) у мышей в качестве монотерапии, как описано в примере фармакологического испытания 5.

[0025] На *фигуре 3* показана противоопухолевая активность соединения (1) против подкожной ксенотрансплантатной модели HCC-1806 (рак молочной железы) у мышей в качестве монотерапии, как описано в примере фармакологического испытания 6.

[0026] На *фигуре 4* показаны противоопухолевые эффекты соединения (1) в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu в комбинации с цетуксимабом у мышей, как описано в примере фармакологического испытания 7.

[0027] На *фигуре 5* показана противоопухолевая активность соединения (1) в подкожной ксенотрансплантатной модели KPL-4 (рак молочной железы) в комбинации с трастузумабом у мышей, как описано в примере фармакологического испытания 8.

[0028] На *фигуре 6A-6B* показан противоопухолевый эффект соединения (1) в модели ортотопической трансплантации у мышей HSC-2. На *фигуре 6A*: бестимусным мышам имплантировали трансдуцированные люциферазой HSC-2 ( $1 \times 10^6$  клеток на пятно) в язык. Количество трансдуцированных люциферазой HSC-2 анализировали с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). Данные показывают уровни билюминисценции в языке у каждой мыши. На *фигуре 6B*: репрезентативное изображение билюминисценции 16 мышей. CDDP, CTX, CDDP+CTX использовали в качестве лекарственных препаратов сравнения, которые в настоящее время используют при лечении пациентов с раком SCCHN. CDDP= цисплатин, CTX= цетуксимаб.

[0029] На *фигуре 7A-7B* показано преимущество в отношении выживания для соединения (1) в комбинации с цетуксимабом в модели ортотопической трансплантации HSC-2 у мышей. На *фигуре 7A*: бестимусным мышам имплантировали трансдуцированные люциферазой HSC-2 ( $1 \times 10^6$  клеток на пятно) в язык. Данные показывают кривую выживаемости до 100 дня после лечения с помощью лекарственных средств (n=16).

\* $P < 0,0001$  по сравнению с соединением (1) или СТХ отдельно (логарифмический ранговый критерий (Мантеля-Кокса). На *фигуре 7B*: количество трансдуцированных люциферазой HSC-2 анализировали с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). Изображения биолюминисценции 10 выживших мышей в группе, получавший комбинацию соединения (1) + СТХ в день 100. RBW= относительная масса тела. CDDP= цисплатин, СТХ= цетуксимаб.

[0030] На *фигуре 8A-8B* показан противоопухолевый эффект соединения (1) в комбинации с лучевой терапией в ксенотрансплантатной модели у мышей FaDu. На *фигуре 8A*: бестимусным мышам подкожно имплантировали трансдуцированные люциферазой FaDu ( $5 \times 10^6$  клеток на пятно) в правое бедро. Через 13 дней после инокуляции мышей случайным образом распределяли по группам ( $n=6$ ) и внутривенно вводили с помощью инъекции соединение (1) в дозе 90 мкг/кг в день 1 и день 8 с или без RT (лучевая терапия), составляющей 18 Гр в день 4 и день 11. Количество трансдуцированных люциферазой FaDu анализировали с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). Данные показывают средний относительный уровень биолюминисценции в день 1 и SEM ( $n=6$ ). SEM= среднеквадратическая ошибка среднего. \*  $P < 0,05$  в сравнении с не получившими лечение в день 29 (t-критерий для независимых выборок). На *фигуре 8B*: репрезентативные изображения биолюминисценции 6 мышей из каждой группы в день 29. RT= лучевая терапия.

[0031] На *фигуре 9* показаны противоопухолевые активности соединения (1) в комбинации с антителом к mPD-1. Подкожную сингенную модель CT26 на мышях (карцинома толстой кишки) лечили с помощью соединения (1) и антитела к mPD-1 по схеме Q7D и по схеме два раза в неделю, соответственно, в течение 3 недель. Результаты показаны как среднее  $\pm$  SEM объемов опухолей ( $\text{мм}^3$ ) ( $n=8$ ).

[0032] На *фигуре 10A* показан бесклеточный анализ полимеризации тубулина. Соединение (1) характеризуется ингибирующей активностью в отношении полимеризации тубулина. На *фигуре 10B* показан анализ динамики микротрубочек. Соединение (1) также характеризуется ингибирующей активностью в отношении динамика микротрубочек.

[0033] На *фигуре 11* показано, что соединение (1) представляет собой высокоактивное антипролиферативное средство в отношении клеточных линий рака пищевода (OE21, OE33 и TE-8) и рака матки (MES-SA, MES-SA/Dx5-Rx1).

[0034] На *фигуре 12* показано, что соединение (1) характеризуется высокой противоопухолевой активностью в подкожных ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы и рака яичника (KPL-4 и COLO-704, соответственно) в качестве монотерапии.

[0035] На *фигуре 13* показан эффект соединения (1) на микроокружение опухолей. Как показано, соединение (1) увеличивает плотность микрососудистой сети. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  по сравнению с отсутствием лечения (критерий множественных сравнений Даннетта).

[0036] На *фигуре 14* показан эффект соединения (1) на микроокружение опухолей. Как показано, соединение (1) снижает количество  $\alpha$ -SMA-положительных CAF.

[0037] На *фигуре 15* показано, что соединение (1) уменьшает белки ECM из CAF в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu. Ксенотрансплантатные опухоли FaDu собирали в день 6 после однократного введения соединения (1) 180 мкг/кг + цетуксимаб в день 1.

[0038] На *фигуре 16* показано, что соединение (1) проявляет зависимый от дозы сочетанный эффект с цетуксимабом в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu. Однократная доза,  $n = 6$ . Соединение (1) и цетуксимаб (CTX) вводили в день 1 в ксенотрансплантатной модели FaDu.

[0039] На *фигуре 17* показаны противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях саркомы мягких тканей у мышей в качестве монотерапии. Показаны MES-SA (саркома матки человека), HT-1080 (фибросаркома человека) и CTG-2041 (ангиосаркома человека).

[0040] На *фигуре 18* показаны противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях рака эндометрия у мышей в качестве монотерапии. Показаны HEC-108 и AN3CA (рак эндометрия).

### **Определения**

[0041] Используемый в настоящем документе термин “соль” относится к любой и ко всем солям и охватывает фармацевтически приемлемые соли. Термин “фармацевтически приемлемая соль” относится к тем солям, которые в рамках обоснованного медицинского суждения подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа и тому подобного, и соразмерны с разумным соотношением пользы/риска. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в настоящей области техники. Например, *Berge с соавт.* подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению включают в себя соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей присоединения кислот являются соли

аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота или с использованием других способов, известных в настоящей области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в себя адипат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепопионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, соли валерата и тому подобное. Соли, полученные из соответствующих оснований, включают в себя соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов, соли аммония и соли  $N^+(C_{1-4} \text{ алкила})_4^-$ . Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают в себя соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают в себя, когда это целесообразно, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Кроме того, предусмотрено соединение (1) в виде свободного основания, и его можно вводить в виде свободного основания.

**[0042]** Также следует понимать, что соединения, которые характеризуются одинаковой молекулярной формулой, но различаются либо по природе последовательности связывания их атомов, либо расположению их атомов в пространстве, называются “изомерами”. Изомеры, которые отличаются расположением своих атомов в пространстве, называются “стереоизомерами”.

**[0043]** Термины “композиция” и “состав” используют взаимозаменяемо.

**[0044]** “Субъект”, которому предусмотрено введение, относится к человеку (т.е. к мужчине или женщине любой возрастной группы, например, к педиатрическому субъекту (например, младенцу, ребенку или подростку) или взрослому субъекту (например, молодому взрослому, взрослому среднего возраста или пожилому взрослому)) или не являющемуся человеком животному. Согласно некоторым вариантам осуществления животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее (например, примат

(например, яванский макак или макак-резус), коммерчески значимое млекопитающее (например, крупный рогатый скот, свинья, лошадь, овца, коза, кошка или собака) или птицу (например, коммерчески значимая птица, такая как курица, утка, гусь или индейка)). Согласно определенным вариантам осуществления животное, отличное от человека, представляет собой рыбу, рептилию или амфибию. Животное, отличное от человека, может представлять собой самца или самку на любой стадии развития. Животное, не являющееся человеком, может представлять собой трансгенное животное или генно-инженерное животное. Термин “пациент” относится к человеку, нуждающемуся в лечении заболевания.

**[0045]** Термин “вводить”, “осуществление введения” или “введение” относится к имплантации, абсорбции, проглатыванию, инъекции, ингаляции или иному введению соединения, описанного в настоящем документе, или его композиции, субъекту или на тело субъекта.

**[0046]** Термины “лечение”, “лечить” и “осуществление лечения” относятся к обратному развитию, облегчению, задержке начала или подавлению развития заболевания, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение можно вводить после того, как один или несколько признаков или симптомов заболевания развились или обнаружены. Согласно другим вариантам осуществления лечение можно вводить при отсутствии признаков или симптомов заболевания. Например, лечение можно вводить предрасположенному субъекту до появления симптомов. Лечение также можно продолжить после устранения симптомов, например, для отсрочки или предотвращения рецидива.

**[0047]** “Эффективное количество” описанного в настоящем документе соединения относится к количеству, достаточному для того, чтобы вызвать требуемый биологический ответ. Эффективное количество соединения, описанного в настоящем документе, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как требуемая биологическая конечная точка, фармакокинетика соединения, состояние, которое лечат, способ введения, а также возраст и состояние здоровья субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. Альтернативно, в отдельном способе или применении настоящее изобретение можно использовать, если это показано и эффективно, в качестве профилактического лечения. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество представляет собой количество соединения, описанного в настоящем документе, в однократной дозе. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество представляет собой объединенные количества соединения, описанного в настоящем документе, в многократных дозах.

**[0048]** “Терапевтически эффективное количество” описанного в настоящем документе соединения представляет собой количество, достаточное для обеспечения терапевтического действия при лечении состояния или для задержки или минимизации одного или нескольких симптомов, связанных с состоянием. Терапевтически эффективное количество соединения означает количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с другими видами терапии, которое обеспечивает терапевтическое действие при лечении состояния. Термин “терапевтически эффективное количество” может охватывать количество, которое улучшает всю терапию, уменьшает или устраняет симптомы, признаки или причины состояния и/или усиливает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для лечения любого описанного заболевания или состояния.

**[0049]** Используемые в настоящем документе термины “ингибирование”, “осуществление ингибирования”, “ингибировать” и “ингибитор” и тому подобное, относятся к способности соединения снижать, замедлять, останавливать или предотвращать активность биологического процесса (например, роста опухоли). Согласно определенным вариантам осуществления ингибирование составляет приблизительно 45% - 50%. Согласно определенным вариантам осуществления ингибирование составляет приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99,9% или 100%.

**[0050]** Термины “новообразование” и “опухоль” используют в настоящем документе взаимозаменяемо, и они относятся к аномальной массе ткани, в которой рост массы превосходит и не координируется с ростом нормальной ткани. Новообразование или опухоль могут являться “доброкачественными” или “злокачественными” в зависимости от следующих характеристик: степени клеточной дифференцировки (включая в себя морфологию и функциональность), скорости роста, локальной инвазии и метастазирования. “Доброкачественное новообразование”, как правило, хорошо дифференцировано, характеризуется характерно более медленным ростом, чем злокачественное новообразование, и остается локализованным в месте происхождения. Кроме того, доброкачественное новообразование не обладает способностью к инфильтрации, инвазии или метастазированию в отдаленные участки. Напротив, “злокачественное новообразование”, как правило, слабо дифференцировано (анаплазия) и характеризуется характерно быстрым ростом, сопровождающимся прогрессирующей инфильтрацией, инвазией и разрушением окружающих тканей. Кроме того, злокачественное новообразование, как правило, обладает способностью метастазировать в отдаленные

участки. Термин “метастазирование”, “метастатический” или “метастазировать” относится к распространению или миграции раковых клеток из первичной или исходной опухоли в другой орган или ткань и, как правило, определяется по наличию “вторичной опухоли” или “вторичной клеточной массы” типа ткани первичной или исходной опухоли, а не типа ткани органа или ткани, в которой расположена вторичная (метастатическая) опухоль

**[0051]** Термин “рак” относится к классу заболеваний, характеризующихся развитием аномальных клеток, которые неконтролируемо пролиферируют и обладают способностью инфильтрировать и разрушать нормальные ткани организма.

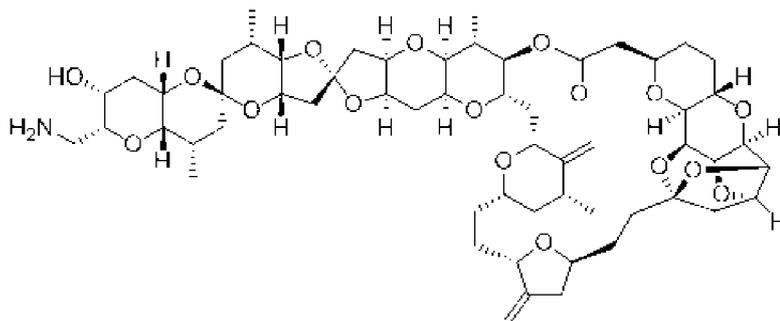
**[0052]** Термин “редкая форма рака” относится к формам рака, возникающим у относительно небольшого числа пациентов. Редкие формы рака включают в себя без ограничения саркому (например, саркома мягких тканей, липосаркома, саркомы матки, лейомиосаркома, миксофибросаркома, остеосаркома, ангиосаркома, саркома Юинга, синовиальная саркома, рабдомиосаркома), злокачественные лимфомы, рак тимуса (например, тимомы), мезотелиому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), нейроэндокринный рак, рак глаза, опухоли головного мозга, опухоли кости, опухоли мягких тканей, рак кожи и герминогенные опухоли.

**[0053]** Термин “противораковое средство” относится к любому терапевтическому средству, которое является применимым для лечения рака у субъекта (например, ингибирования рака или роста опухоли у субъекта). Противораковые средства включают в себя биотерапевтические противораковые средства, а также химиотерапевтические средства.

#### **Подробное раскрытие определенных вариантов осуществления**

**[0054]** Настоящее изобретение подробно описано ниже со ссылкой на варианты осуществления настоящего изобретения и тому подобное. Настоящее изобретение относится к соединениям (например, соединению (1)), и его фармацевтически приемлемым солям или меченым радиоактивным изотопом производным, и их фармацевтическим композициям. Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования роста опухоли и/или лечения рака у субъекта, предусматривающим введение субъекту эффективного количества соединения или композиции, предусмотренных в настоящем документе. Соединение или композицию можно вводить в качестве монотерапии или в комбинации с другой терапией, как описано в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам получения соединения (1) и синтетическим промежуточным соединениям, применимым для этой цели.

**[0055]** Настоящее изобретение включает в себя соединение со структурой:



Соединение (1),

или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, которые необязательно могут находиться в форме гидрата, сольвата или полиморфа, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе или вспомогательном веществе.

**[0056]** Соединение (1) может существовать в виде кристаллического полиморфа, и соединение согласно настоящему изобретению может находиться в любой из монокристаллических форм или в смеси двух или более кристаллических форм. Соединение (1) может находиться в аморфной форме или может являться ангидридом или сольватом, таким как гидрат.

**[0057]** Настоящее изобретение включает в себя меченные радиоактивным изотопом производные соединения (1) и их фармацевтически приемлемые соли. Меченное радиоактивным изотопом соединение эквивалентно соединению (1) за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом(ами), который(ые) характеризуется(ются) атомной массой или массовым числом, отличающимися от тех, которые обычно встречаются в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединение согласно настоящему изобретению, включают в себя изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, йода, брома и хлора, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{123}\text{I}$  и  $^{125}\text{I}$ .

**[0058]** Меченное радиоактивным изотопом соединение, такое как соединение, в которое включен радиоактивный изотоп, например,  $^3\text{H}$  и/или  $^{14}\text{C}$ , является применимым для анализа распределения в ткани для лекарственного средства и/или матрицы. Изотопы  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$  считаются применимыми, поскольку эти изотопы могут быть легко получены и обнаружены. Изотопы  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$  являются применимыми в ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Изотоп  $^{125}\text{I}$  считается применимым в СПЕКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) и может являться применимым для получения изображений головного мозга. Замена более тяжелым изотопом, таким как  $^2\text{H}$ , вызывает, из-за его более

высокой метаболической стабильности, некоторые преимущества при обработке, например, увеличение периода полувыведения *in vivo* или уменьшение необходимой дозы, и, следовательно, считается применимым при заданных обстоятельствах. Меченное радиоактивным изотопом соединение можно получить аналогичным образом с использованием легкодоступного меченного радиоактивным изотопом реагента вместо не меченного радиоактивным изотопом реагента и путем выполнения способов, раскрытых в схемах и/или примерах, описанных ниже.

**[0059]** Соединение (1) можно использовать в качестве химического зонда для захвата целевого белка биологически активного соединения с низкой молекулярной массой. В частности, соединение согласно настоящему изобретению можно трансформировать в зонд для аффинной хроматографии, фотоаффинный зонд или тому подобное путем введения группы мечения, линкера или тому подобного в фрагмент, отличный от структурного фрагмента, необходимого для экспрессии активности соединения посредством способа, описанного в *J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.*, том 51, № 5, 2003, с. 492-498, WO 2007/139149 или тому подобное.

**[0060]** Примеры группы мечения, линкера или тому подобного, используемых в таком химическом зонде, включают в себя группы, принадлежащие к следующим группам (1) - (5). (1) Группы мечения белка, такие как группы для фотоаффинного мечения (такие как бензоильная группа, бензофеноновая группа, азидная группа, карбонилазидная группа, диазиридиновая группа, еноновая группа, диазогруппа и нитрогруппа) и группы химической аффинности (такие как кетонная группа, в которой альфа-атом углерода замещен атомом галогена, карбамоильная группа, сложноэфирная группа, алкилтиогруппа, акцептор Михаэля  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного кетона, сложный эфир или тому подобное, и оксирановая группа); (2) расщепляемые линкеры, такие как S-S, O-Si-O, моносахарид (такой как группа глюкозы или галактозная группа) и дисахарид (такой как лактоза), и олигопептидные линкеры, которые можно расщепить с помощью ферментативной реакции; (3) группы меток типа «рыболовного крючка», такие как биотин и 3-(4,4-дифтор-5,7-диметил-4Н-3а,4а-диаза-4-бора-*s*-индацен-3-ил)пропиоильная группа; (4) группы радиоактивного мечения, такие как  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$ ; группы флуоресцентного мечения, такие как флуоресцеин, родамин, дансил, умбеллиферон, 7-нитрофуразанил и 3-(4,4-дифтор-5,7-диметил-4Н-3а,4а-диаза-4-бора-*s*-индацен-3-ил)пропиоильная группа; хемилюминесцентные группы, такие как люциферин и люминол; и маркеры, способные обнаруживать ионы тяжелых металлов, такие как ионы лантаноидных металлов и ионы радия; и (5) группы, которые должны быть связаны с твердофазным носителем, таким как стеклянные шарики, стеклянный слой, титрационный микропланшет, агарозные шарики,

агарозный слой, полистирольные шарики, полистирольный слой, нейлоновые шарики и нейлоновый слой.

**[0061]** Зонд, полученный путем введения в соединение согласно настоящему изобретению группы мечения или тому подобного, выбранных из вышеописанных групп (1) - (5), способом, описанным в любом из вышеупомянутых литературных источников или тому подобном, можно использовать в качестве химического зонда для идентификации маркерного белка, применимого для исследования новой потенциальной мишени лекарственного средства.

**[0062]** Примеры используемого в настоящем документе термина “соль” включают в себя соли с неорганическими кислотами, соли с органическими кислотами и соли с кислыми аминокислотами, и, в частности, предпочтительными являются фармацевтически приемлемые соли. Кроме того, соль соединения согласно настоящему изобретению включает в себя ангидрид его фармацевтически приемлемой соли и сольват фармацевтически приемлемой соли, такой как гидрат. Предпочтительные примеры соли с неорганической кислотой включают в себя соли с соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой, фосфорной кислотой и тому подобное, и предпочтительные примеры соли с органической кислотой включают в себя соли с уксусной кислотой, янтарной кислотой, фумаровой кислотой, малеиновой кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, молочной кислотой, стеариновой кислотой, бензойной кислотой, метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой и тому подобное. Предпочтительные примеры соли с кислотой аминокислотой включают в себя соли с аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой и тому подобное.

**[0063]** В случае, когда соединение (1) согласно настоящему изобретению получают в виде соли соединения (1) или гидрата соединения (1), соль и гидрат можно превратить в свободную форму соединения (1) общепринятым способом.

#### *Фармацевтические композиции, наборы и введение*

**[0064]** Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Согласно определенным вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение, или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, предусмотрены в эффективном количестве в фармацевтической композиции (например, терапевтически эффективным количестве).

**[0065]** Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции можно получить с помощью любого способа, известного в области фармакологии. Как правило, такие способы получения предусматривают приведение соединения (1) (т.е. “активного ингредиента”) в ассоциацию с носителем или вспомогательным веществом, и/или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами, и затем, если это необходимо и/или желательно, придание формы и/или упаковку продукта в требуемую одно- или многодозовую единицу. Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно получить согласно известному способу, такому как способ, описанный в общих правилах для препаратов согласно *Японской фармакопее*, 16 изд., *Фармакопее США* и *Европейской фармакопее*, 9 изд. Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить пациентам соответствующим образом в зависимости от лекарственной формы.

**[0066]** Фармацевтические композиции можно получить, упаковать и/или продать оптом, в виде единичной стандартной дозы и/или в виде множества единичных стандартных доз. “Стандартная доза” представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента, как правило, равно дозировке активного ингредиента, которую вводят субъекту, и/или удобной доле такой дозировки, такой как половина или треть такой дозировки.

**[0067]** Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, будут варьироваться в зависимости от индивидуума, размеров и/или состояния субъекта, которого лечат, и, кроме того, в зависимости от пути, которым должна вводиться композиция. Композиция может содержать от 0,1 до 100% (масс./масс.) активного ингредиента.

**[0068]** Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, используемые в производстве предусмотренных фармацевтических композиций, включают в себя инертные разбавители, диспергирующие и/или гранулирующие средства, поверхностно-активные средства и/или эмульгаторы, средства для улучшения распадаемости, связующие средства, консерванты, буферные средства, смазывающие средства и/или масла. Вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий, красящие средства, средства для нанесения покрытия, подсластители, ароматизаторы и отдушки, также могут присутствовать в композиции.

**[0069]** Предусмотренное в настоящем документе соединение, как правило, составляют в единичной лекарственной форме для простоты введения и однородности

дозировки. Тем не менее, следует понимать, что общее суточное использование композиций, описанных в настоящем документе, будет определяться врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для любого конкретного субъекта или организма будет зависеть от множества факторов, включая в себя следующее: заболевание, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого активного ингредиента; конкретная используемая композиция; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета субъекта; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого активного ингредиента; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным используемым активным ингредиентом; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

**[0070]** Соединение согласно настоящему изобретению (соединение (1)) и его композиции, предусмотренные в настоящем документе, можно вводить любым путем, включая в себя следующее: энтеральное (например, пероральное), парентеральное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интрамедуллярное, интратекальное, подкожное, интравентрикулярное, трансдермальное, интердермальное, ректальное, интравагинальное, внутрибрюшинное, местное (например, с помощью порошков, мазей, кремов и/или капель), чресслизистое, назальное, трансбуккальное, сублингвальное; путем интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; и/или в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля. Конкретно предусмотренными путями являются пероральное введение, внутривенное введение (например, системная внутривенная инъекция), региональное введение посредством кровотока и/или лимфотока и/или прямое введение в пораженный участок. В общем, наиболее подходящий путь введения будет зависеть от множества факторов, включая в себя природу средства (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, способен ли субъект переносить пероральное введение).

**[0071]** Точное количество соединения (1), необходимое для достижения эффективного количества, будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости, например, от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести побочных эффектов или нарушения, характерных признаков конкретного соединения, способа введения и тому подобного. Эффективное количество может быть включено в одну дозу (например, однократную пероральную дозу) или несколько доз (например, многократные пероральные дозы). Согласно определенным вариантам осуществления, когда множественные дозы вводят субъекту или наносят на ткань или клетку, любые две дозы из множественных доз включают в себя разные или по существу одинаковые количества соединения, описанного

в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления, когда множественные дозы вводят субъекту или наносят на ткань или клетку, частота введения множественных доз субъекту или нанесения множественных доз на ткань или клетку может составлять, в неограничивающих примерах, следующее: три дозы в день, две дозы в день, одна доза в день, одна доза через день, одна доза каждые три дня, одна доза каждую неделю, одна доза каждые две недели, одна доза каждые три недели или одна доза каждые четыре недели или даже медленная контролируемая доставки дозы в течение выбранного периода времени с использованием устройства для доставки лекарственного средства. Согласно определенным вариантам осуществления частота введения множественных доз субъекту или нанесения множественных доз на ткань или клетку составляет одну дозу в день. Согласно определенным вариантам осуществления частота введения множественных доз субъекту или нанесения множественных доз на ткань или клетку составляет две дозы в день. Согласно определенным вариантам осуществления частота введения множественных доз субъекту или нанесения множественных доз на ткань или клетку составляет три дозы в день. Согласно определенным вариантам осуществления, когда множественные дозы вводят субъекту или наносят на ткань или клетку, продолжительность между первой дозой и последней дозой множественных доз составляет приблизительно или по меньшей мере один день, два дня, четыре дня, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, шесть месяцев, девять месяцев, один год, два года, три года, четыре года, пять лет, семь лет, десять лет, пятнадцать лет, двадцать лет или продолжительность жизни субъекта, ткани или клетки. Согласно определенным вариантам осуществления продолжительность между первой дозой и последней дозой из множественных доз составляет приблизительно или по меньшей мере три месяца, шесть месяцев или один год. Согласно определенным вариантам осуществления продолжительность между первой дозой и последней дозой из множественных доз является продолжительностью жизни субъекта, ткани или клетки. Согласно определенным вариантам осуществления доза (например, однократная доза или любая доза из многократных доз), описанная в настоящем документе, независимо включает в себя от 0,001 мг/кг до 0,01 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 0,1 мг/кг или от 0,1 мг/кг и 1 мг/кг включительно соединения (1). Примерами являются лекарственные формы, содержащие по меньшей мере приблизительно 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 или 50 мг активного соединения, или его соли, в лекарственной форме.

**[0072]** Описанные в настоящем документе диапазоны доз представляют руководство для введения предусмотренных фармацевтических композиций взрослому человеку. Количество, которое должно быть введено, например, ребенку или подростку, может быть

определено практикующим врачом или специалистом в настоящей области техники и может быть ниже или таким же, как и количество, вводимое взрослому.

**[0073]** Раскрытие настоящего изобретения также охватывает наборы (например, фармацевтические упаковки). Предусмотренные наборы могут содержать фармацевтическую композицию или соединение (1) и контейнер (например, флакон, ампулу, бутылку, шприц и/или упаковку с дозатором или другой подходящий контейнер). Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные наборы могут необязательно дополнительно включать в себя второй контейнер, содержащий фармацевтическое вспомогательное вещество для разбавления или суспензию фармацевтической композиции или соединения (1). Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию или соединение (1), предусмотренные в первом контейнере и втором контейнере, объединяют с образованием одной единичной лекарственной формы. Описанный в настоящем документе набор может включать в себя одно или несколько дополнительных фармацевтических средств, описанных в настоящем документе, в виде отдельной композиции.

#### *Способы лечения и применения*

**[0074]** Как показано в настоящем документе, соединение (1) характеризуется значительными эффектами ремоделирования сосудов опухоли и активностью против САФ, и, следовательно, характеризуется потенциальным применением для лечения рака и/или ингибирования роста опухоли.

**[0075]** В настоящем документе предусмотрен способ лечения рака у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченого радиоактивным изотопом производного, или их фармацевтической композиции. Настоящее изобретение также относится к соединению (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченому радиоактивным изотопом производному, или их фармацевтической композиции, для применения при лечении рака у субъекта. Настоящее изобретение также относится к соединению (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченого радиоактивным изотопом производного, или их фармацевтической композиции, для производства лекарственного средства для лечения рака.

**[0076]** Также в настоящем документе предусмотрен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченого радиоактивным изотопом производного, или их фармацевтической композиции. Также в настоящем документе

предусмотрено соединение (1), или его фармацевтически приемлемая соль или меченное радиоактивным изотопом производное, или их фармацевтическая композиция, для применения в ингибировании роста опухоли у субъекта. Настоящее изобретение также относится к применению соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченого радиоактивным изотопом производного, или их фармацевтической композиции, для производства лекарственного средства для ингибирования роста опухоли.

**[0077]** Согласно определенным вариантам осуществления способов и применений, предусмотренных в настоящем документе, рак представляет собой рак головы и шеи, рак молочной железы, рак пищевода, рак матки, рак яичника, рак толстой и прямой кишки, рак эндометрия, рак желудка, рак тонкой кишки, рак мочевого пузыря или саркому.

**[0078]** Согласно определенным вариантам осуществления способов и применений, предусмотренных в настоящем документе, рак представляет собой рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак ротовой полости, рак горла, рак слюнных желез, рак языка, аденокистозная карцинома). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой аденокистозную карциному. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак молочной железы (например, HER2-позитивный рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой HER2-позитивный рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак толстой и прямой кишки (например, карцинома толстой кишки). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой карциному толстой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак пищевода (например, аденокарцинома пищевода). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой аденокарциному пищевода. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак матки (например, саркома матки). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой саркому матки. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак яичника. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой саркому (например, саркома матки, фибросаркома, ангиосаркома, синовиальная саркома, карцинома мягких тканей). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой фибросаркому. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой ангиосаркому. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой

синовиальную саркому. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой карциному мягких тканей. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак желудка. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак кишечника (например, рак тонкой кишки, аденокарцинома тонкой кишки). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак тонкой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой аденокарциному тонкой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря (например, уротелиальный рак). Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой уротелиальный рак. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой рак эндометрия. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой редкую форму рака.

#### *Комбинированная терапия*

**[0079]** Помимо введения в качестве монотерапии соединение (1) можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами или способами лечения. Согласно определенным вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело. Согласно определенным вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой моноклональное антитело. Соединение согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другим терапевтическим средством, таким как анти-EGFR терапия, анти-HER2 терапия, анти-PD-1 терапия, анти-PD-L1 терапия или лучевая терапия.

**[0080]** Согласно определенным вариантам осуществления соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, или их фармацевтическую композицию, вводят в комбинации с анти-EGFR терапией (например, моноклональное антитело (mAb) к EGFR, такое как цетуксимаб). Согласно определенным вариантам осуществления анти-EGFR терапия представляет собой антитело к EGFR. Например, в настоящем документе предусмотрен способ лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, или их фармацевтической композиции, в комбинации с терапией с помощью mAb к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). Согласно определенным вариантам осуществления mAb к EGFR представляет собой цетуксимаб (CTX).

**[0081]** Согласно определенным вариантам осуществления соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, или их фармацевтическую композицию, вводят в комбинации с анти-HER2 терапией (например, моноклональное антитело (mAb) к HER2, такое как трастузумаб). Согласно определенным вариантам осуществления анти-HER2 терапия представляет собой антитело к HER2. Например, в настоящем документе предусмотрен способ лечения рака молочной железы у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, или их композиции, в комбинации с терапией с помощью mAb к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека). Согласно определенным вариантам осуществления mAb к HER2 представляет собой трастузумаб.

**[0082]** Согласно определенным вариантам осуществления соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, или их фармацевтическую композицию, вводят в комбинации с анти-PD-1 или анти-PD-L1 терапией (например, моноклональное антитело к PD-1 или к PD-L1). Согласно определенным вариантам осуществления анти-PD-1 или анти-PD-L1 терапия представляет собой антитело. Например, в настоящем документе предусмотрен способ лечения рака толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту соединения (1), или его фармацевтически приемлемой соли или меченного радиоактивным изотопом производного, или их композиции, в комбинации с анти-PD-1 или анти-PD-L1 терапией (например, терапией с помощью mAb).

**[0083]** Согласно определенным вариантам осуществления соединение (1), или его фармацевтически приемлемую соль или меченное радиоактивным изотопом производное, или их фармацевтическую композицию, используют в комбинации с лучевой терапией (RT). Согласно определенным вариантам осуществления соединение вводят в комбинации с операцией.

## **ПРИМЕРЫ**

### ***Синтез соединения (1)***

#### ***Общие процедуры и способы***

**[0084]** Соединение согласно настоящему изобретению можно получить с помощью способов, описанных в примерах ниже. Тем не менее, эти примеры предусмотрены только для иллюстративных целей, и соединение согласно настоящему изобретению не ограничено каким бы то ни было образом конкретными примерами, упомянутыми ниже.

[0085] В примерах, если специально не указано иное, силикагель для очистки с использованием колоночной хроматографии на силикагеле представлял собой колонку Hi-Flash™ (силикагель, 30 мкм 60 Å или 40 мкм 60 Å, Yamazen Corporation), силикагель для очистки с использованием колоночной хроматографии на силикагеле NH представлял собой силикагель Chromatorex NH (Fuji Silysia Chemical LTD). Аналитическую тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили с использованием силикагеля TLC 60 F<sub>254</sub> с толщиной слоя 0,25 мм (Merck KGaA), или силикагеля TLC NH Chromatorex F<sub>254</sub> с толщиной слоя 0,25 мм (Fuji Silysia Chemical LTD). Пластины ТСХ визуализировали путем окрашивания с помощью красителя п-анизальдегида, красителя фосфомолибденовой кислоты или красителя Hanessian.

[0086] Все реакции, чувствительные к влаге, проводили в инертной атмосфере. Реагенты и растворители были технического качества и их использовали в том виде, в котором они поставляются, если не указано иное.

[0087] Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре JEOL ECZ500R (500 МГц), JEOL ECZ400S (400 МГц), Varian Inova 500 (500 МГц), Varian Mercury 400 (400 МГц) или Bruker Avance (600 МГц). Химические сдвиги представлены в частях на миллион (м.д.). Для спектров <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> и/или CD<sub>3</sub>OD) в качестве внутреннего стандарта использовали пик остаточного растворителя (7,27 м.д. в CDCl<sub>3</sub>; 7,16 м.д. в C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>; 3,31 м.д. в CD<sub>3</sub>OD).

[0088] Результаты аналитических масс-спектров (MS) получали с использованием UPLC Waters Acquity, оборудованного одним квадрупольным детектором (SQ Detector 2) или LTQ Orbitrap XL™ (ThermoScientific).

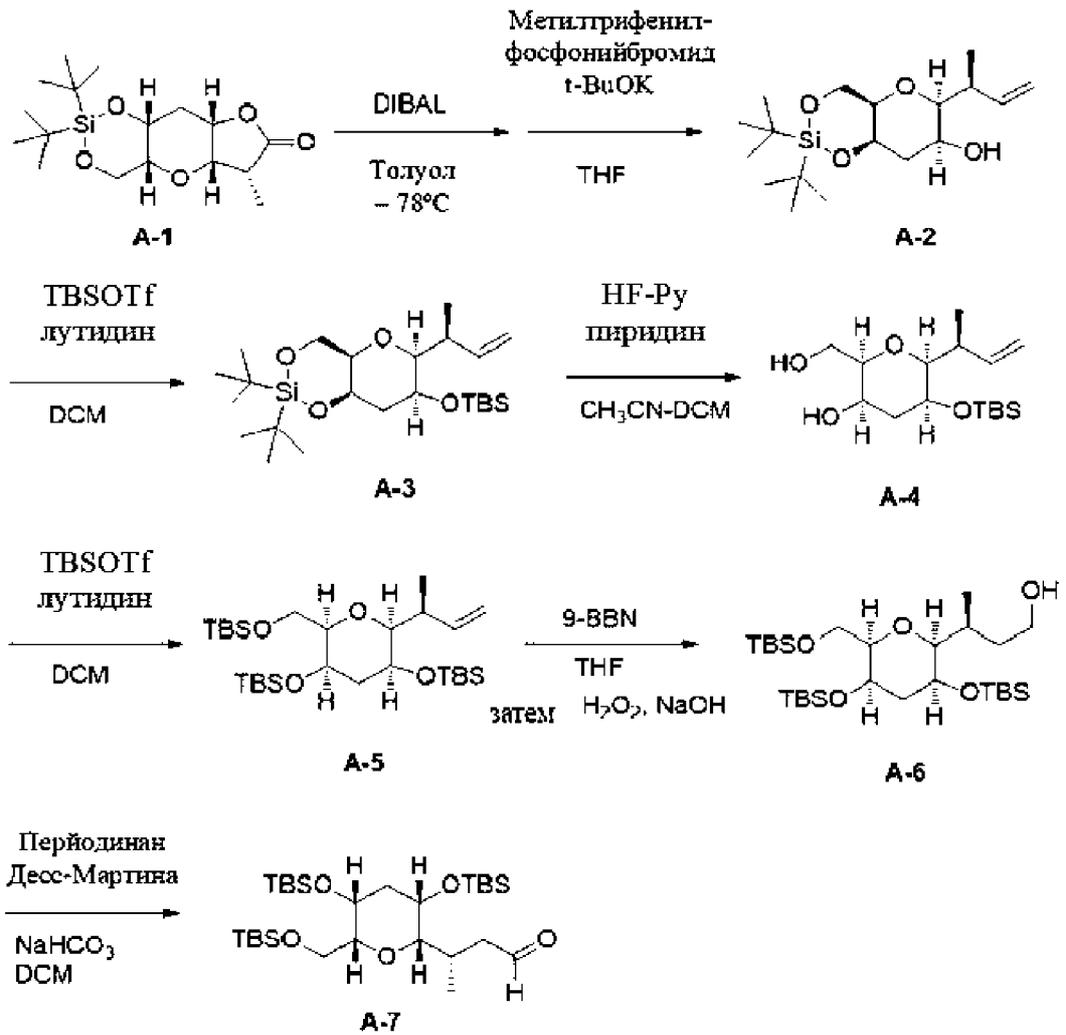
[0089] Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили с помощью Shimadzu LC-10AD на УФ-спектрофотометрическом детекторе (200 нм, Shimadzu SPD-10A).

[0090] Использованные в настоящем документе сокращения: AIBN: 2,2'-азобис(изобутиронитрил); 9-BBN: 9-борабицикло[3.3.1]нонан; Bu<sub>3</sub>SnH: три-нормальный-бутилтингидрид; (+)-CSA: (1S)-(+)-10-камфорсульфоновая кислота; DMAP: 4-диметиламинопиридин; DCM: дихлорметан; DDQ: 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон; DIBAL: диизобутилалюминийгидрид; DMF: *N,N*-диметилформамид; DMSO: диметилсульфоксид; Et<sub>3</sub>N: триэтиламин; EtOAc: этилацетат; HF-пиридин: фторводород пиридина; ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография; IPA: изопропиловый спирт; MeCN: ацетонитрил; MeOH: метанол; МПМ: *para*-метоксибензил; PPh<sub>3</sub>: трифенилфосфин; *t*-BuOH: *tert*-бутиловый спирт; *t*-BuLi: *tert*-бутиллитий; TBME: метил-*tert*-бутиловый эфир; TBAF: тетрабутиламмонийфторид; TBS: *tert*-

бутилдиметилсилил; THF: тетрагидрофуран; TMS: триметилсилил; Ts: *para*-толуолсульфонил.

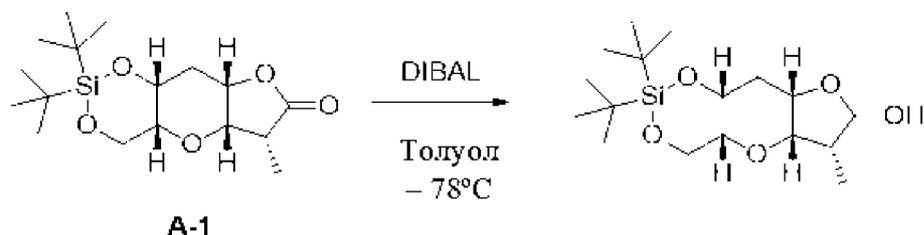
[0091] Подразумевается, что раскрытые в настоящем документе синтетические промежуточные соединения являются частью настоящего изобретения.

Схема А; Получение соединения А-7



**Пример 1**

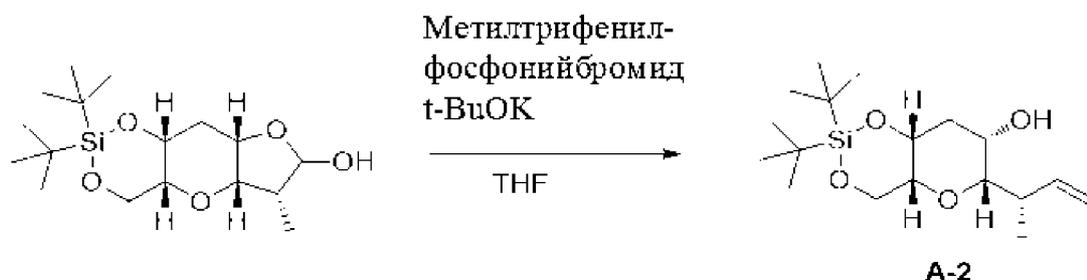
(4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-ди-*трет*-бутил-6-метилоктагидрофууро[2',3':5,6]пирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилин-7-ол



**[0092]** В атмосфере азота к раствору соединения **A-1**: (4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-ди-*трет*-бутил-6-метилгексагидрофууро[2',3':5,6]пирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилин-7(8aH)-она (**A-1** 18,5 г, 54,0 ммоль), полученного с помощью способа, описанного в Organic Letters (2009), 11(2), 409-412 (CAS №: 1095280-04-8) в толуоле (275 мл) при -78 °С, DIBAL (70,2 мл, 70,2 ммоль, 1,0 М раствор толуола) добавляли в течение 30 мин. Затем реакционную смесь перемешивали при -78 °С. Через 90 мин реакцию осторожно гасили с помощью MeOH (4,37 мл) при -78 °С, затем удаляли охлаждающую баню. Насыщенный раствор тетрагидрата тартрата калия-натрия (300 мл) добавляли к реакционной смеси, продолжали перемешивание в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали в делительную воронку, затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (300 мл). Объединенные органические экстракты промывали рассолом (300 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении. Сырой лактол использовали для следующей реакции без очистки.

**Пример 2**

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-2,2-ди-*трет*-бутилгексагидропирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилин-7-ол (соединение **A-2**)



**[0093]** В атмосфере азота к суспензии метилтрифенилфосфонийбромида (73,30 г, 205,2 ммоль) в THF (200 мл), *трет*-бутоксид калия (17,27 г, 153,9 ммоль) добавляли при -

5 °С в течение 10 мин, а затем перемешивали в течение 60 мин при -5 °С. Раствор сырого лактола, описанный в примере 1, в THF (40 мл) переносили в реакционную смесь при -5 °С в течение 10 мин, затем перемешивали при -5 °С в течение 1 ч, при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили с помощью ледяной воды (400 мл), затем разбавляли с помощью ТВМЕ (400 мл) и затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью ТВМЕ (400 мл). Объединенные органические экстракты промывали рассолом (400 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток суспендировали с помощью смеси гептан/EtOAc = 1/1 (100 мл). Полученную суспензию фильтровали, промывали смесью гептан/EtOAc = 1/1 (100 мл) для удаления полученного из трифенилфосфина материала. Затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле (400 г, силикагель 60, сферический, 40-50 мкм, Kanto Chemical) с использованием 0% - 20% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **A-2**, 16,7 г, 90% выход).

**[0094]** <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 1,03 (d, J=6,8 Гц, 3 H) 1,05 (s, 9 H) 1,07 (s, 9 H) 1,75 (dt, J=14,5, 3,0 Гц, 1 H) 2,37 (dt, J=14,5, 2,9 Гц, 1 H) 2,65 - 2,76 (m, 1 H) 3,03 (dd, J=9,8, 1,0 Гц, 1 H) 3,31 (m, 1 H) 3,69 (d, J=15,0 Гц, 1 H) 3,75 - 3,79 (m, 1 H) 4,16 - 4,31 (m, 2 H) 4,41 (t, J=2,9 Гц, 1 H) 4,95 - 5,09 (m, 2 H) 6,02 (ddd, J=17,3, 10,5, 6,3 Гц, 1 H).

### Пример 3

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-2,2-ди-*трет*-бутил-7-((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)гексагидропирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилин (соединение **A-3**)



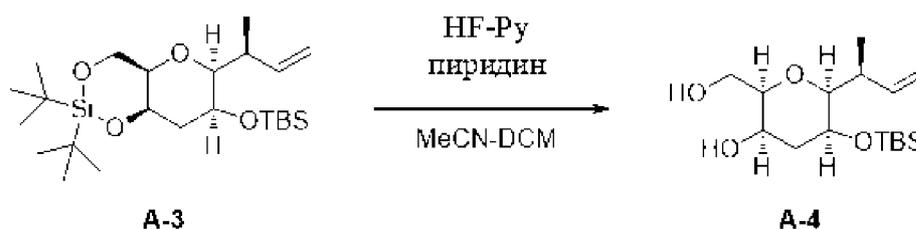
**[0095]** В атмосфере азота к раствору соединения **A-2**: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-2,2-ди-*трет*-бутилгексагидропирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилин-7-ола (9,85 г, 28,8 ммоль), описанного в примере 2, в DCM (150 мл) при 0 °С добавляли 2,6-лутидин (6,68 мл, 57,5 ммоль) и *трет*-бутилдиметилсилилтрифторметансульфонат (9,25 мл, 40,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 30 мин, затем при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью диэтилового эфира. Органический слой промывали 0,5 н. водным раствором HCl, насыщенным водным

раствором  $\text{NaHCO}_3$  и затем рассолом. Объединенные органические слои сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали (небольшое количество  $\text{SiO}_2$ ) и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 15% смеси  $\text{EtOAc}$ /гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **A-3**, 12,0 г, 91% выход).

[0096]  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,10 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,96 (d,  $J=6,3$  Гц, 3 H) 1,02 (s, 9 H) 1,06 (s, 9 H) 1,73 (dt,  $J=15,0, 4,0$  Гц, 1 H) 2,26 (dt,  $J=15,0, 2,5$  Гц, 1 H) 2,66 - 2,74 (m, 1 H) 2,95 (dd,  $J=9,5, 2,2$  Гц, 1 H) 3,17 (m, 1 H) 3,81 - 3,84 (m, 1 H) 4,12 - 4,22 (m, 2 H) 4,24 (t,  $J=2,7$  Гц, 1 H) 4,93 - 5,06 (m, 2 H) 6,08 (ddd,  $J=17,3, 10,5, 6,3$  Гц, 1 H).

#### Пример 4

(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-5-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-2-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ол (соединение A-4)



[0097] В атмосфере азота к раствору соединения **A-3**: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-2,2-ди-трет-бутил-7-((трет-бутилдиметилсилил)окси)гексагидропирано[3,2-d][1,3,2]диоксасилина (12 г, 26,3 ммоль), описанного в примере 3, в  $\text{MeCN}$  (120 мл) и  $\text{DCM}$  (40 мл) при  $-10^\circ\text{C}$  добавляли предварительно смешанный раствор  $\text{HF}$ -пиридина (4,0 мл) и пиридина (20 мл) в 20 мл  $\text{MeCN}$ . Реакционную смесь перемешивали при  $-10^\circ\text{C}$  в течение 15 мин, затем при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора  $\text{NaHCO}_3$  при  $0^\circ\text{C}$  и разбавляли с помощью  $\text{DCM}$ , затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью  $\text{DCM}$ . Объединенные органические экстракты промывали рассолом. Объединенный органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 15% - 60% смеси  $\text{EtOAc}$ /гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **A-4**, 8,4 г, количеств. выход).

[0098]  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,13 (s, 3 H) 0,19 (s, 3 H) 0,94 (s, 9 H) 0,96 (d,  $J=6,8$  Гц, 3 H) 1,72 (dt,  $J=14,6, 2,9$  Гц, 1 H) 2,15 (dd,  $J=9,8, 2,4$  Гц, 1 H) 2,23 (dt,  $J=14,6, 2,9$  Гц, 1 H) 2,55 - 2,65 (m, 1 H) 3,03 (d,  $J=9,8$  Гц, 1 H) 3,41 - 3,46 (m, 1 H) 3,49 (d,  $J=11,7$  Гц,

1 H) 3,62 - 3,72 (m, 2 H) 3,92 (ddd, J=11,7, 8,3, 2,4 Гц, 1 H) 4,02 (t, J=2,7 Гц, 1 H) 5,01 - 5,12 (m, 2 H) 5,93 (ddd, J=17,4, 10,4, 7,3 Гц, 1 H).

### Пример 5

(((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-бут-3-ен-2-ил)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-3,5-диил)бис(окси))бис(*трет*-бутилдиметилсилан) (соединение **A-5**)

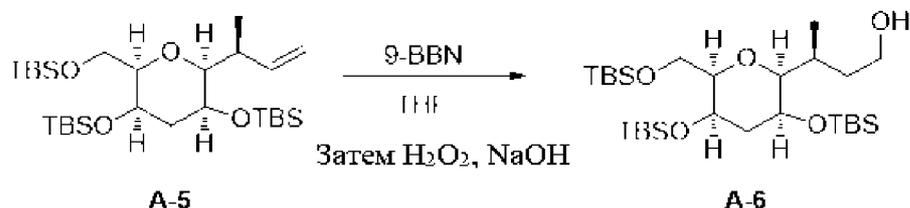


**[0099]** В атмосфере азота к раствору соединения **A-4**: (2R,3R,5S,6S)-6-((S)-бут-3-ен-2-ил)-5-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-2-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ола (997 мг, 3,15 ммоль), описанного в примере 4, в DCM (10 мл) при 5 °C добавляли 2,6-лутидин (1,83 мл, 15,8 ммоль) и *трет*-бутилдиметилсилилтрифторметансульфонат (2,17 мл, 9,45 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью диэтилового эфира и гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, затем слои разделяли. Объединенные органические экстракты последовательно промывали с помощью 0,5 н. водного раствора HCl, насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, а затем рассола. Органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 5% смеси EtOAc/гептан (содержащей 1% Et<sub>3</sub>N) давала указанное в заголовке соединение (соединение **A-5**, 1,69 г, 98% выход).

**[00100]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 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 Гц, 3 H) 1,82 (dt, J=14,9, 4,8 Гц, 1 H) 2,00 (dt, J=14,9, 2,9 Гц, 1 H) 2,62 - 2,72 (m, 1 H) 2,93 (dd, J=9,3, 2,0 Гц, 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 Гц, 1 H).

**Пример 6**

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)бутан-1-ол (соединение **A-6**)



**[00101]** К раствору соединения **A-5**: (((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-бут-3-ен-2-ил)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-3,5-диил)бис(окси))бис(*трет*-бутилдиметилсилана) (1,32 г, 2,42 ммоль), описанного в примере 5, в THF (10 мл) при 0 °C добавляли 9-BBN (9,69 мл, 0,5 М THF раствор, 4,84 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 1,5 ч. 3,0 М водный раствор NaOH (3 мл, 9,00 ммоль) и перекись водорода (35% в воде, 3 мл) добавляли к реакционной смеси при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 мин, затем при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (3 раза). Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 20% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединения (соединение **A-6**, 1,36 г, 100% выход).

**[00102]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,03 (s, 3 H) 0,05 - 0,08 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,88 (d,  $J=6,8$  Гц, 3 H) 0,89 - 0,93 (m, 27 H) 1,55 - 1,65 (m, 1H) 1,82 (dt,  $J=15,4, 4,4$  Гц, 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,  $J=7,8, 3,9$  Гц, 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  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 585,62  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

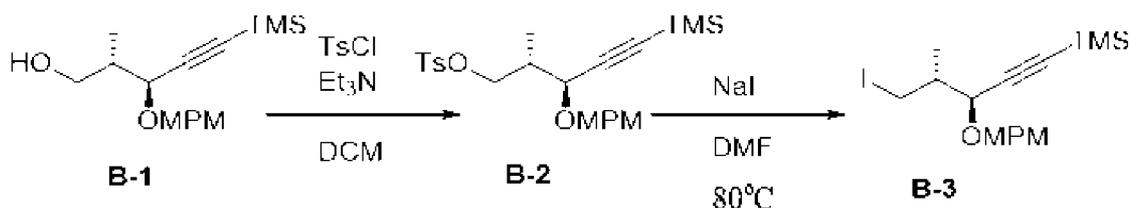
**Пример 7**

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)бутаналь (соединение **A-7**)



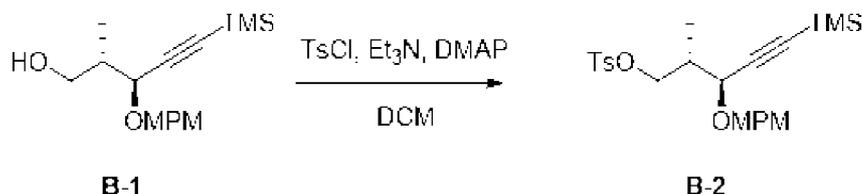
**[00103]** В атмосфере азота к раствору соединения **A-6**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)бутан-1-ола (1100 мг, 1,954 ммоль), описанного в примере 6, в DCM (30 мл) при 5 °С добавляли NaHCO<sub>3</sub> (41,0 мг, 0,49 ммоль) и перйодинан Десс-Мартина (1077 мг, 2,54 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 3 ч реакцию смесь разбавляли с помощью DCM и гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub> и насыщенного водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 25% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **A-7**, 950 мг, 87% выход).

**[00104]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 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 Гц, 1 H) 2,01 (dt, J=15,0, 2,5 Гц, 1 H) 2,28 (ddd, J=16,0, 7,3, 2,4 Гц, 1 H) 2,53 -2,58 (m, 1 H) 2,74 (ddd, J=16,0, 5,5, 2,0 Гц, 1 H) 2,94 (dd, J=9,0, 1,7 Гц, 1 H) 3,29 (td, J=5,9, 2,0 Гц, 1 H) 3,68 (d, J=5,9 Гц, 2 H) 3,75 - 3,82 (m, 1 H) 3,82 - 3,90 (m, 1 H) 9,73 (t, J=2,4 Гц, 1 H).

*Схема В; Получение соединения В-3*

**Пример 8**

(2S,3S)-3-((4-метоксибензил)окси)-2-метил-5-(триметилсилил)пент-4-ин-1-ил-4-метилбензолсульфонат (соединение В-2)

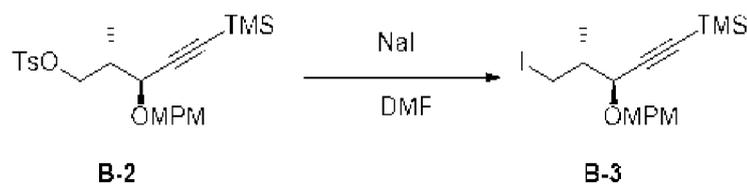


**[00105]** В атмосфере азота к раствору соединения **В-1**: (2S,3S)-3-((4-метоксибензил)окси)-2-метил-5-(триметилсилил)пент-4-ин-1-ола (11,08 г, 36,15 ммоль), полученного с помощью способа, описанного в международной патентной публикации WO 9317690 A1/US 5436238 A (CAS №: 157323-41-6), в DCM (330 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (12,6 мл, 90,4 ммоль) и *n*-толуолсульфонилхлорид (8,27 г, 43,4 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь промывали с помощью насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub> и рассола, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали, затем концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле (силикагель 60, сферический, 40-50 мкм, Kanto Chemical) с использованием 0% - 10% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **В-2**, 17,7 г, 93% выход).

**[00106]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 0,17 (s, 9 H) 1,02 (d, J=6,8 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,04 - 4,07 (m, 2 H) 4,33 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 4,66 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 6,87 (d, J=8,3 Гц, 2 H) 7,21 (d, J=8,3 Гц, 2 H) 7,33 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,77 (d, J=8,8 Гц, 2 H).

**Пример 9**

((3S,4R)-5-йод-3-((4-метоксибензил)окси)-4-метилпент-1-ин-1-ил)триметилсилан (соединение В-3)

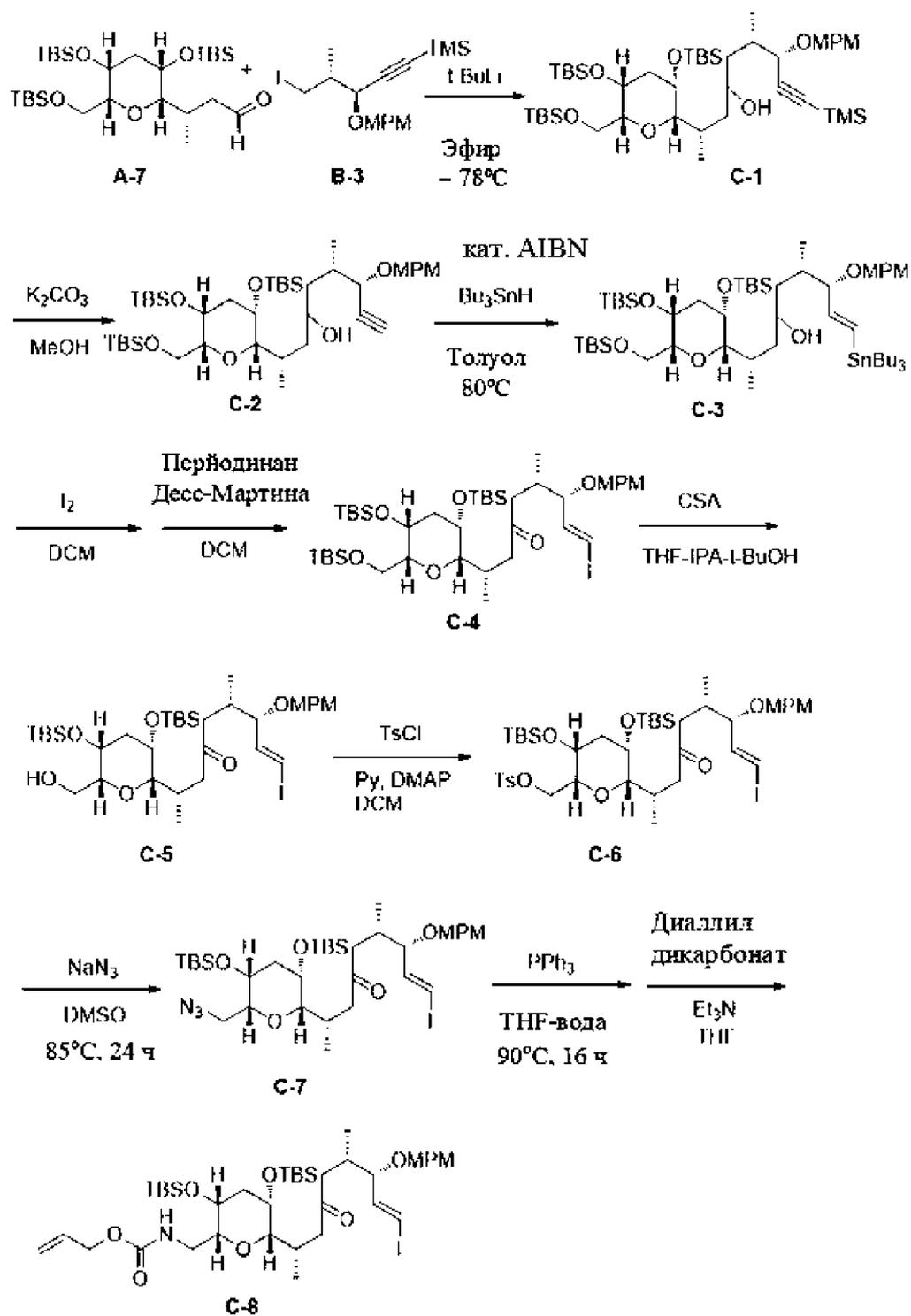


**[00107]** В атмосфере азота к раствору соединения **В-2**: (2S,3S)-3-((4-метоксибензил)окси)-2-метил-5-(триметилсилил)пент-4-ин-1-ил-4-метилбензолсульфоната (17,7 г, 38,4 ммоль), описанного в примере 8, в DMF (360 мл) добавляли NaI (7,49 г, 50,0 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 80 °С в течение

2 ч. В реакционную смесь добавляли еще 2,0 г NaI. Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при 80 °С, затем охлаждали до комнатной температуры. Смесь разбавляли с помощью диэтилового эфира, промывали водой и рассолом, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле (силикагель 60, сферический, 40-50 мкм, Kanto Chemical) с использованием 10% - 20% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **В-3**, 14,3 г, 89% выход).

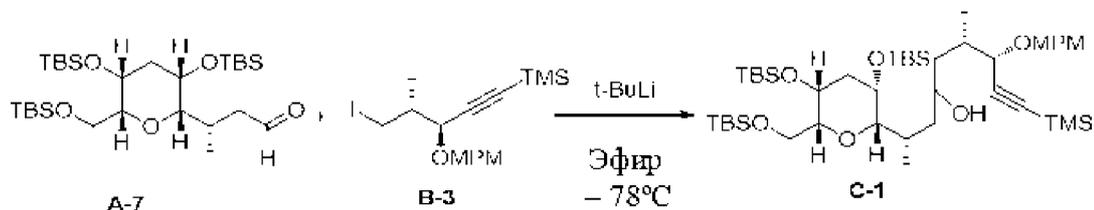
**[00108]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 0,21 (s, 9 H) 1,10 (d, J=6,8 Гц, 3 H) 1,74 - 1,84 (m, 1 H) 3,30 - 3,37 (m, 2 H) 3,82 (s, 3 H) 3,96 (d, J=7,3 Гц, 1 H) 4,44 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 4,73 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 6,89 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,30 (d, J=8,8 Гц, 2 H).

## Схема С; Получение соединения С-8



**Пример 10**

(2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-9-(триметилсилил)нон-8-ин-4-ол (соединение **C-1**)

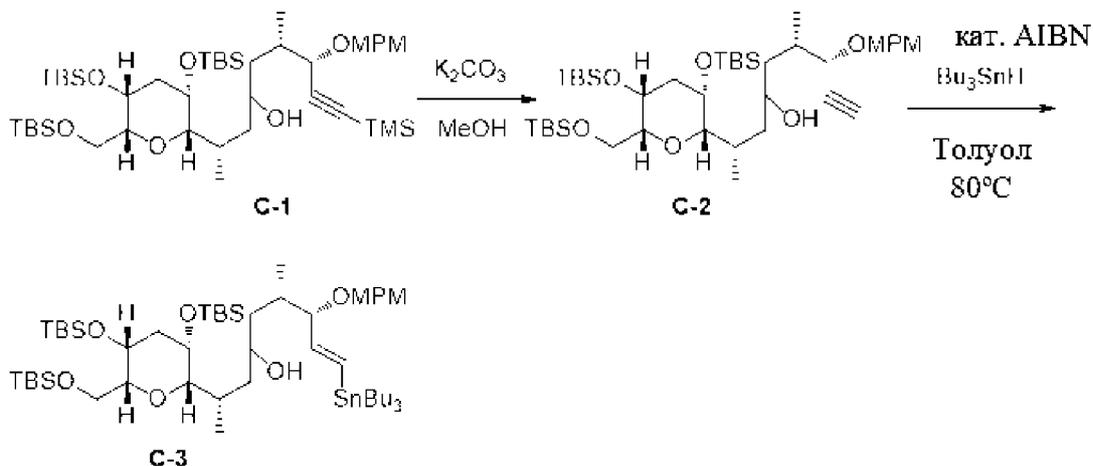


**[00109]** В атмосфере аргона к раствору соединения **B-3**: ((3S,4R)-5-йод-3-((4-метоксибензил)окси)-4-метилпент-1-ин-1-ил)триметилсилана (1408 мг, 3,382 ммоль), описанного в примере 9, в диэтиловом эфире (25 мл) при  $-78^{\circ}\text{C}$  добавляли трет-бутиллитий (1,61 М в пентане, 4,11 мл, 6,62 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при  $-78^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин. Соединение **A-7**: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)бутаналь (825 мг, 1,47 ммоль), описанное в примере 7, в 5,0 мл диэтилового эфира добавляли в реакционную смесь при  $-78^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали при  $-78^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Органический слой промывали рассолом, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , затем концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 25% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединения (соединение **C-1**, 1167 мг, 93% выход).

**[00110]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,00 - 0,12 (m, 21 H) 0,15 - 0,24 (m, 6 H) 0,82 - 0,96 (m, 30 H) 1,03 (d,  $J=6,3$  Гц, 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,  $J=9,75$  Гц, 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).

**Пример 11**

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-9-(трибутилстаннил)нон-8-ен-4-ол (соединение **C-3**)



**[00111]** К раствору соединения **C-1**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-9-(триметилсилил)нон-8-ин-4-ола (1165 мг, 1,37 ммоль), описанного в примере 10, в MeOH (20 мл) при 20°C добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (189 мг, 1,37 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc и гасили с помощью насыщенного водного раствора NH<sub>4</sub>Cl, затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 15% смеси EtOAc/гептан давала соединение **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ин-4-ол (1050 мг, 98% выход. ESI-MS (m/z): 801,50 [M+Na]<sup>+</sup>

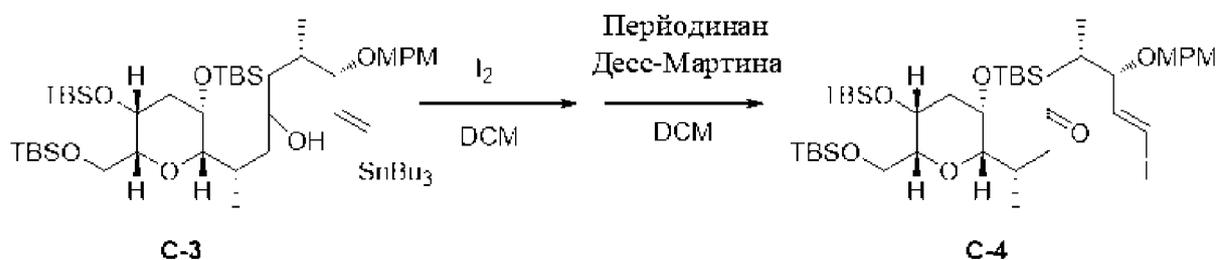
**[00112]** В атмосфере азота к раствору соединения **C-2**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ин-4-ола (780 мг, 1,00 ммоль), полученного выше, в толуоле (15 мл) при 20°C добавляли три-*n*-бутилтингидрид (2,5 мл, 9,36 ммоль) и 2,2'-азобис(изобутиронитрил) (82 мг, 0,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 15 мин. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография

остатка на силикагеле с использованием 0% - 15% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-3**, 970 мг, 91% выход).

**[00113]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 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 Гц, 1 H) 6,05 - 6,13 (m, 1 H) 6,83 - 6,90 (m, 2 H) 7,24 (d,  $J=8,8$  Гц, 2 H).

### Пример 12

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-он (соединение **C-4**)



**[00114]** В атмосфере азота к раствору соединения **C-3**: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-9-(трибутилстаннил)нон-8-ен-4-ола (970 мг, 0,91 ммоль), описанного в примере 11, в 30 мл DCM при 5°C добавляли йод (242 мг, 0,95 ммоль) в DCM (6 мл), пока он сохранял йодный цвет. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические экстракты промывали рассолом. Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 25% смеси EtOAc/гептан давала (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-ол (768 мг, 93% выход).

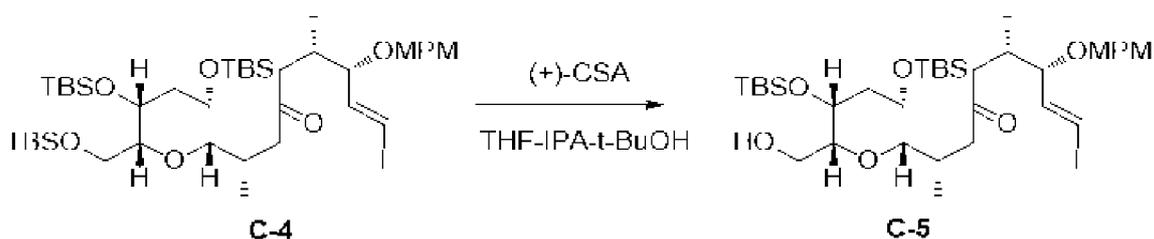
**[00115]** В атмосфере азота к раствору (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-

метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-ола (768 мг, 0,85 ммоль), полученного выше, в DCM (25 мл) при комнатной температуре добавляли  $\text{NaHCO}_3$  (17,8 мг, 0,21 ммоль) и периодиан Десс-Мартина (485 мг, 1,14 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM и гасили с помощью насыщенного водного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и насыщенного водного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , а затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 20% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-4**, 776 мг, количеств. выход).

**[00116]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,00 (s, 3 H) 0,03 - 0,07 (m, 12 H) 0,10 (s, 3 H) 0,81 (d,  $J=6,3$  Гц, 3 H) 0,84 (d,  $J=6,3$  Гц, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,80 (dt,  $J=15,0, 4,5$  Гц, 1 H) 1,99 (dt,  $J=15,0, 2,5$  Гц, 1 H) 2,17 (dd,  $J=16,6, 10,2$  Гц, 1 H) 2,20 - 2,29 (m, 2 H) 2,43 - 2,48 (m, 1 H) 2,54 (d,  $J=12,7$  Гц, 1 H) 2,87 (dd,  $J=9,0, 1,7$  Гц, 1 H) 2,99 (dd,  $J=16,6, 2,9$  Гц, 1 H) 3,27 (td,  $J=5,8, 2,4$  Гц, 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,  $J=11,7$  Гц, 1 H) 4,50 (d,  $J=11,7$  Гц, 1 H) 6,26 (d,  $J=14,6$  Гц, 1 H) 6,42 (dd,  $J=14,6, 7,8$  Гц, 1 H) 6,87 (d,  $J=8,3$  Гц, 2 H) 7,21 (d,  $J=8,3$  Гц, 2 H). ESI-MS ( $m/z$ ): 927,39  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### Пример 13

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-он (соединение **C-5**)



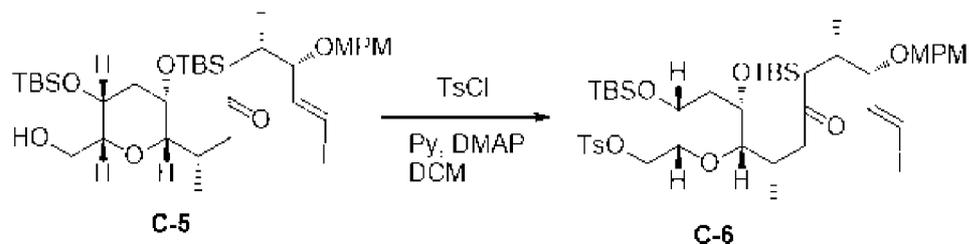
**[00117]** К раствору соединения **C-4**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-она (600 мг, 0,66 ммоль), описанного в примере 12, в THF (5,0 мл), IPA (5,0 мл) и *трет*-BuOH (5,0 мл) при 4°C добавляли (1S)-(+)-10-камфорсульфовую кислоту (154 мг, 0,66 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при

4 °С в течение 20 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc и гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 35% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-5**, 500 мг, 95% выход).

**[00118]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 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 Гц, 1 H) 1,93 - 2,00 (dt, J=14,9, 4,8 Гц, 1 H) 2,19 - 2,26 (m, 1 H) 2,29 (dd, J=14,9, 5,6 Гц, 1 H) 2,39 (dd, J=16,6, 8,3 Гц, 1 H) 2,44 - 2,66 (m, 4 H) 2,91 (dd, J=9,5, 1,7 Гц, 1 H) 3,36 - 3,41 (m, 1 H) 3,48 (td, J=11,3, 2,7 Гц, 1 H) 3,59 (t, J=7,1 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,46 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 6,28 (d, J=14,6 Гц, 1 H) 6,43 (dd, J=14,6, 7,8 Гц, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,21 (d, J=8,8 Гц, 2 H). ESI-MS (m/z): 813,30 [M+Na]<sup>+</sup>

#### Пример 14

((2R,3R,5S,6S)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-((2S,6S,7S,E)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-4-оксонон-8-ен-2-ил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил-4-метилбензолсульфонат (соединение **C-6**)



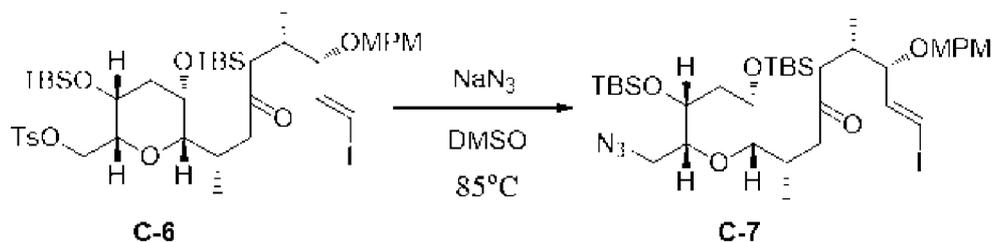
**[00119]** В атмосфере азота к раствору соединения **C-5**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-она (500 мг, 0,63 ммоль), описанного в примере 13, в DCM (10 мл) при 5°С добавляли пиридин (2,54 мл, 31,6 ммоль), *n*-толуолсульфонилхлорид (723 мг, 3,79 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (77 мг, 0,63 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. *n*-Толуолсульфонилхлорид (150 мг, 0,79 ммоль) добавляли в реакционную смесь при комнатной температуре. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM и гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, затем слои разделяли. Водный слой

экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 25% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-6**, 560 мг, 94% выход).

**[00120]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*) δ м.д. 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 Гц, 3 H) 0,83 (s, 9 H) 0,86 (d, J=6,8 Гц, 3 H) 0,89 (s, 9 H) 1,81 (dt, J=14,9, 4,5 Гц, 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 Гц, 1 H) 2,77 (dd, J=16,6, 3,4 Гц, 1 H) 2,87 (dd, J=9,0, 1,7 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,08 - 4,16 (m, 1 H) 4,28 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 4,51 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 6,30 (d, J=14,6 Гц, 1 H) 6,45 (dd, J=14,6, 7,8 Гц, 1 H) 6,88 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,24 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,31 (d, J=8,3 Гц, 2 H) 7,76 (d, J=8,3 Гц, 2 H).

### Пример 15

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(азидометил)-3,5-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-он (соединение C-7)



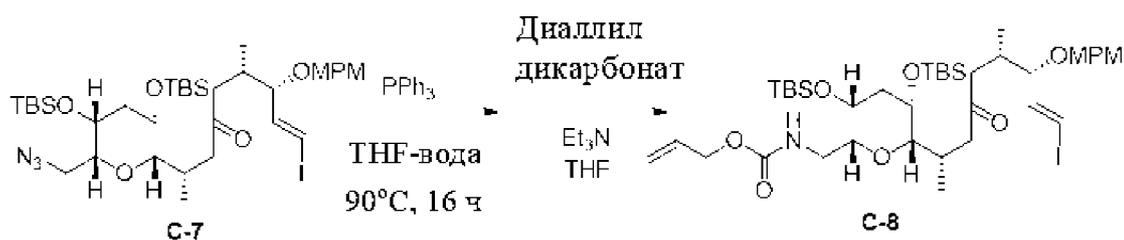
**[00121]** В атмосфере азота к раствору соединения **C-6**: ((2R,3R,5S,6S)-3,5-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-6-((2S,6S,7S,E)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-4-оксонон-8-ен-2-ил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил-4-метилбензолсульфоната (560 мг, 0,59 ммоль), описанного в примере 14, в DMSO (5,6 мл) при 20°C добавляли азид натрия (385 мг, 5,92 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 85 °C. Через 2 ч азид натрия (100 мг, 1,54 ммоль) добавляли в реакционную смесь, затем реакционную смесь перемешивали при 85 °C в течение 14 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc и гасили с помощью H<sub>2</sub>O, затем слои разделяли. Органические экстракты последовательно промывали водой и рассолом. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого остатка. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 15% смеси

EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-7**, 298 мг, 62% выход).

**[00122]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,03 (s, 3 H) 0,06 (s, 3 H) 0,07 (s, 3 H) 0,10 (s, 3 H) 0,84 (d,  $J=6,8$  Гц, 3 H) 0,85 (d,  $J=6,8$  Гц, 3 H) 0,91 (s, 9 H) 0,92 (s, 9 H) 1,86 (dt,  $J=15,0, 4,7$  Гц, 1 H) 1,98 (dt,  $J=15,0, 2,9$  Гц, 1 H) 2,19 - 2,32 (m, 3 H) 2,41 - 2,49 (m, 1 H) 2,58 (d,  $J=12,7$  Гц, 1 H) 2,94 (dd,  $J=16,6, 2,9$  Гц, 1 H) 2,98 (dd,  $J=8,8, 2,0$  Гц, 1 H) 3,02 (dd,  $J=12,7, 2,9$  Гц, 1 H) 3,47 (dt,  $J=8,8, 2,7$  Гц, 1 H) 3,49 - 3,54 (m, 1 H) 3,63 (dd,  $J=12,7, 8,8$  Гц, 1 H) 3,69 - 3,73 (m, 1 H) 3,81 (s, 3H) 3,83 - 3,88 (m, 1 H) 4,26 (d,  $J=11,7$  Гц, 1 H) 4,50 (d,  $J=11,7$  Гц, 1 H) 6,26 (d,  $J=14,6$  Гц, 1 H) 6,42 (dd,  $J=14,6, 7,8$  Гц, 1 H) 6,87 (d,  $J=8,8$  Гц, 2 H) 7,22 (d,  $J=8,8$  Гц, 2 H).

### Пример 16

(((2R,3R,5S,6S)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-6-((2S,6S,7S,E)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-4-оксонон-8-ен-2-ил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)метил)карбамат (соединение **C-8**)

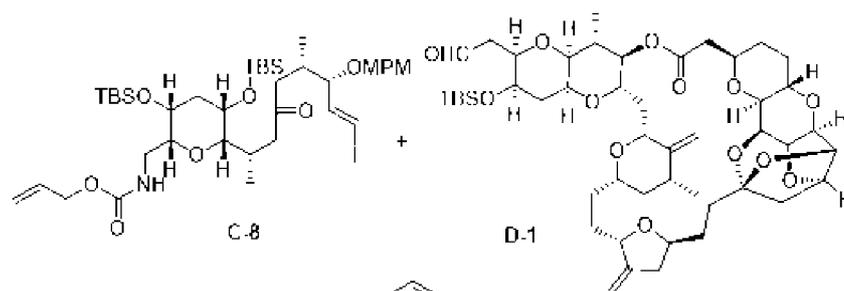


**[00123]** К раствору соединения **C-7**: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(азидометил)-3,5-бис((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилнон-8-ен-4-она (298 мг, 0,37 ммоль), описанного в примере 15, в THF (10 мл) и воде (1,0 мл) при 20°C добавляли трифенилфосфин (1437 мг, 5,478 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 70 °C в течение 1,5 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением сырого амина. К раствору полученного выше сырого амина в THF (10 мл) при 5°C добавляли Et<sub>3</sub>N (0,51 мл, 3,66 ммоль) и диаллилдикарбонат (341 мг, 1,83 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 60 мин. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 0% - 25% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **C-8**, 300 мг, 94% выход).

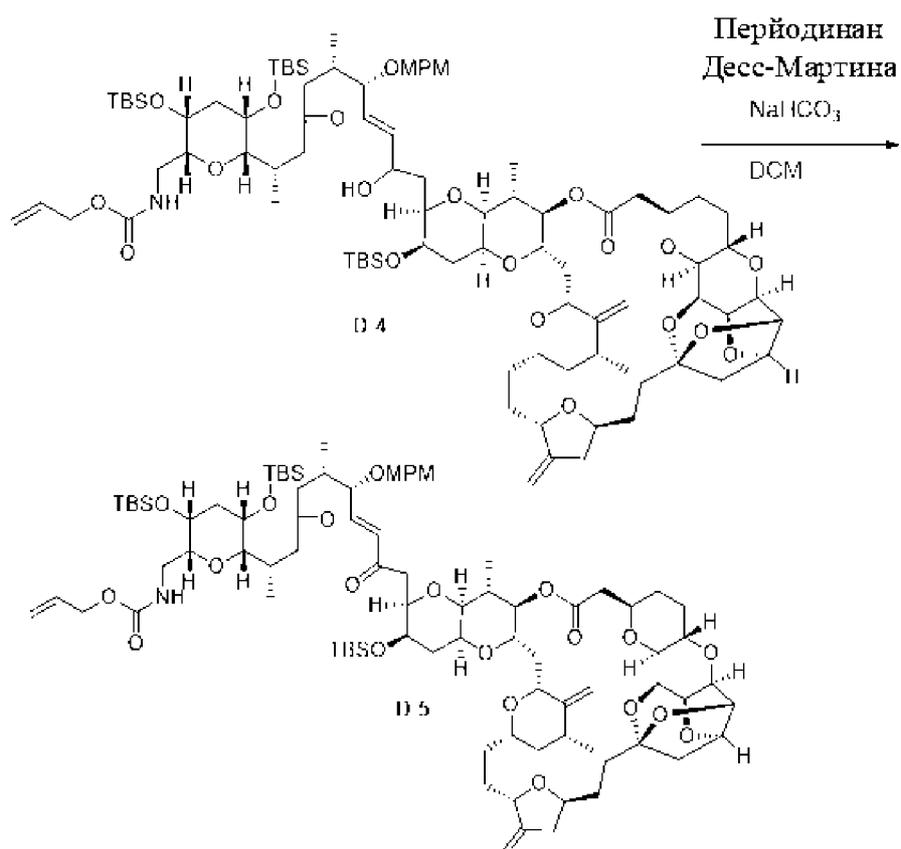
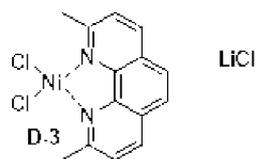
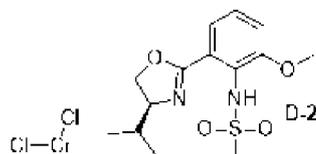
**[00124]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, хлороформ-*d*)  $\delta$  м.д. 0,05 - 0,07 (m, 9 H) 0,11 (s, 3 H) 0,85 (d,  $J=6,3$  Гц, 3 H) 0,87 (d,  $J=6,3$  Гц, 3 H) 0,90 (s, 9 H) 0,93 (s, 9 H) 1,80 (dt,  $J=15,0, 4,4$  Гц,

1 H) 1,96 (dt, J=15,0, 2,8 Гц, 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 Гц, 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 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,46 (d, J=11,2 Гц, 1 H) 4,53 - 4,63 (m, 2 H) 5,19 (dd, J=10,7, 1,5 Гц, 1 H) 5,32 (d, J=17,1 Гц, 1 H) 5,47 (d, J=6,8 Гц, 1 H) 5,88 - 5,99 (m, 1 H) 6,28 (d, J=14,6 Гц, 1 H) 6,43 (dd, J=14,6, 7,8 Гц, 1 H) 6,87 (d, J=8,8 Гц, 2 H) 7,21 (d, J=8,8 Гц, 2 H). ESI-MS (m/z): 896,34 [M+Na]<sup>+</sup>

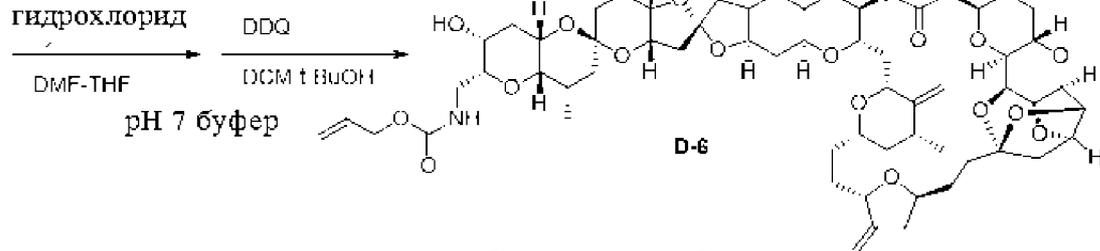
## Схема D; Получение соединения D-7



1,8-  
бис(диметиламино)  
нафталин  
MeCN

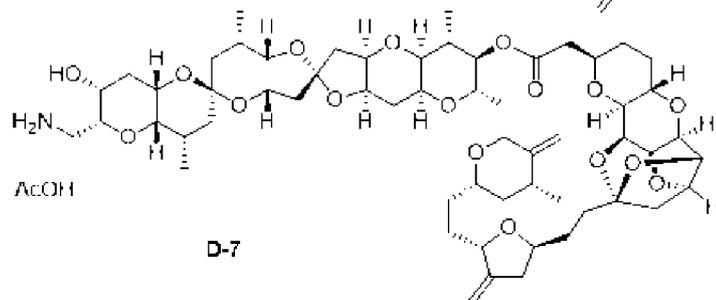


ТВАФ  
 имидазол  
 гидрохлорид

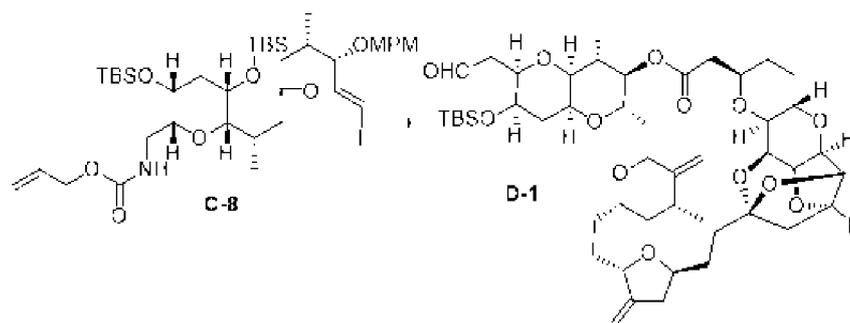


$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$   
 пирролидин

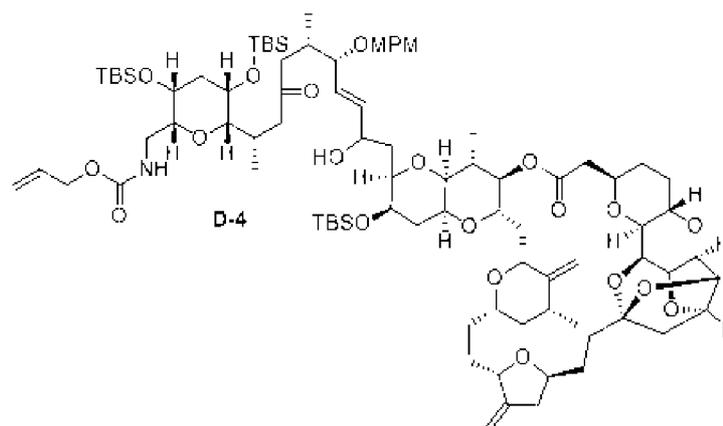
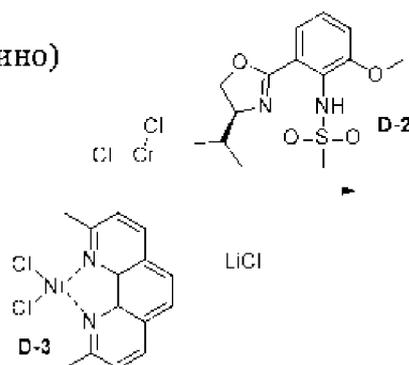
DCM



## Пример 17

Соединение D-4

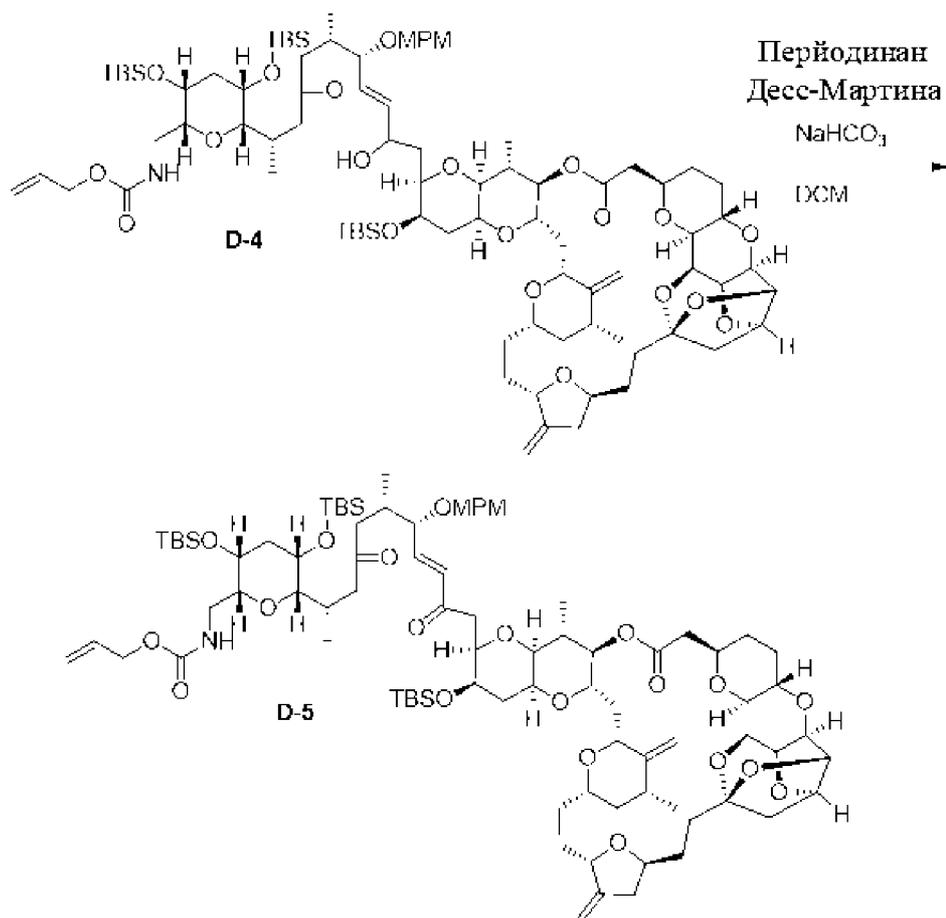
1,8-  
бис(диметиламино)  
нафталин  
MeCN



**[00125]** В атмосфере азота (в перчаточном боксе) к раствору соединения **D-2**: (S)-N-(2-(4-изопропил-4,5-дигидрооксазол-2-ил)-6-метоксифенил)метансульфонамида (155 мг, 0,497 ммоль), полученного с помощью способа, описанного в Organic Letters (2002), 4 (25), 4431-4434 (CAS №: 546141-34-8) и 1,8-бис(диметиламино)нафталина (107 мг, 0,497 ммоль) в MeCN (0,75 мл) добавляли хлорид хрома (II) (55,5 мг, 0,452 ммоль) и затем полученную смесь перемешивали в перчаточном боксе при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный зеленый раствор добавляли к смеси соединения **C-8**: аллил-(((2R,3R,5S,6S)-3,5-бис((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-((2S,6S,7S,E)-9-йод-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метил-4-оксонон-8-ен-2-ил)тетрагидро-2H-пиран-2-

ил)метил)карбамата (99,0 мг, 0,113 ммоль), описанного в примере 16, соединения **D-1**(80,0 мг, 0,09 ммоль), полученного с помощью способа, описанного в *Journal of the American Chemical Society* (1992), 114 (8), 3162-3164 (CAS №: 157322-23-1), соединения **D-3**: дихлор(2,9-диметил-1,10-фенантролин)никеля (0,46 мг, 1,36 мкмоль), полученного с помощью способа, описанного в *Journal of the American Chemical Society* (2009), 131(42), 15387 - 15393 (CAS №: 21361-04-6) и хлорида лития (3,83 мг, 0,09 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в перчаточном боксе при комнатной температуре в течение 60 мин. Реакционную смесь затем вынимали из перчаточного бокса, разбавляли с помощью смеси диэтилового эфира-EtOAc (5,0 мл - 5,0 мл), затем к смеси добавляли Florisil<sup>®</sup> (1600 мг, 15,94 ммоль) (CAS №: 1343-88-0). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь фильтровали (Celite<sup>®</sup>), промывали с помощью смеси EtOAc/гептан = 2/1, затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 3% - 55% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **D-4**, 140 мг, 95% выход).

## Пример 18

Соединение D-5

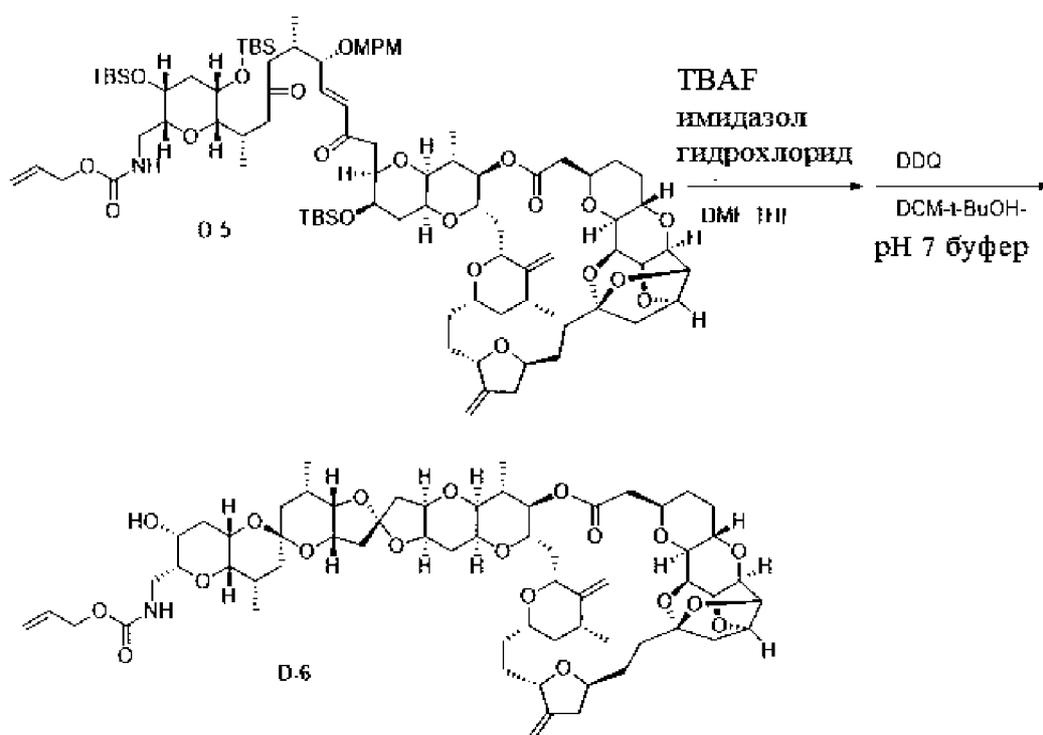
**[00126]** В атмосфере азота к раствору соединения **D-4** (140 мг, 0,09 ммоль), описанного в примере 17, в DCM (5,0 мл) при 5°C добавляли NaHCO<sub>3</sub> (28,8 мг, 0,34 ммоль) и периодинан Десс-Мартина (72,7 мг, 0,17 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 60 мин. Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM и гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub> и насыщенного водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, а затем слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM. Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле с использованием 2% - 60% смеси EtOAc/гептан давала указанное в заголовке соединение (соединение **D-5**, 120 мг, 86%).

**[00127]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, бензол-*d*6) δ м.д. 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 Гц, 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 Гц, 3 H) 1,31 - 1,37 (m, 3 H) 1,41 (dd, J=12,8, 4,9 Гц, 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 Гц, 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 Гц, 1H) 4,48 - 4,58 (m, 1 H) 4,49 (d, J=11,0 Гц, 1H) 4,65 - 4,70 (m, 2 H) 4,68 (d, J=5,5 Гц, 1H) 4,74 - 4,86 (m, 2H) 4,78 (s, 1H) 4,93 (s, 1 H) 5,05 (d, J=10,4 Гц, 1 H) 5,09 (br. s., 1 H) 5,19 (br. s., 1 H) 5,30 (dd, J=17,1, 1,2 Гц, 1 H) 5,82 (d, J=8,0 Гц, 1 H) 5,86 - 5,96 (m, 1 H) 6,46 (d, J=15,9 Гц, 1 H) 6,84 - 6,92 (m, 3 H) 7,31 (d, J=8,6 Гц, 2 H).

### Пример 19

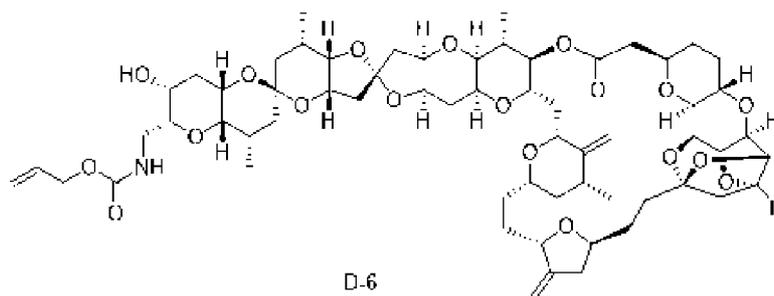
#### Соединение D-6



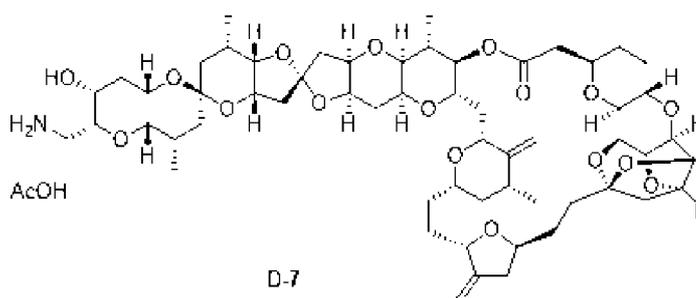
**[00128]** Гидрохлорид имидазола (155 мг, 1,48 ммоль) растворяли в DMF (2,9 мл) с получением 0,5 М раствора гидрохлорида имидазола в DMF. 1,0 мл этого раствора смешивали с 1,0 мл TBAF (1,0 М, раствор THF) с получением предварительно смешанного раствора 0,5 М TBAF и 0,25 М гидрохлорида имидазола в THF-DMF (1:1). В атмосфере азота к раствору соединения **D-5** (80,0 мг, 0,05 ммоль), описанного в примере 18, в DMF (7,0 мл) при 20°C добавляли 0,588 мл предварительно смешанного раствора TBAF (0,5 М) и гидрохлорид имидазола (0,25 М) в THF-DMF (1:1), полученный выше. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. 1,6 г CaCO<sub>3</sub> и 4,0 г Dowex<sup>®</sup> 50WX8 (водородная форма, 200-400 меш, SIGMA-ALDRICH) добавляли в реакционную

смесь. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем смесь разбавляли с помощью EtOAc, затем фильтровали (Celite<sup>®</sup>), промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением сырого остатка. 1000 мг CaCO<sub>3</sub> и 2,25 г Dowex<sup>®</sup> 50WX8 добавляли к раствору сырого остатка в EtOAc (6,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Затем смесь разбавляли с помощью EtOAc, фильтровали (Celite<sup>®</sup>), промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением сырого остатка (63,0 мг). К раствору полученного выше сырого остатка (63,0 мг) в DCM (6,0 мл), *трет*-BuOH (0,6 мл) и фосфатного буфера с pH 7 (0,6 мл, 1/15 M) при комнатной температуре добавляли DDQ (111 мг, 0,49 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, затем разбавляли с помощью DCM и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью DCM (3 раза). Объединенные органические экстракты сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле NH с использованием 10% - 100% смеси EtOAc/гептан, затем 10% смеси MeOH/EtOAc давала грубо очищенное указанное в заголовке соединение (соединение **D-6**, 15,0 мг, 27%).

**[00129]** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, метанол-*d*<sub>4</sub>) δ м.д. 0,97 (d, J=7,0 Гц, 3 H) 0,97 (d, J=7,0 Гц, 3 H) 1,00 - 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, J=7,3 Гц, 3 H) 1,09 (d, J=6,3 Гц, 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 Гц, 2 H) 2,39 (dd, J=13,4, 6,1 Гц, 1 H) 2,44 (dd, J=17,6, 2,0 Гц, 1 H) 2,55 (dd, J=17,6, 9,3 Гц, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,97 (dd, J=9,3, 2,0 Гц, 1 H) 3,21 (dd, J=6,6, 4,6 Гц, 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 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,02 - 4,11 (m, 4 H) 4,17 (dd, J=6,6, 4,6 Гц, 1 H) 4,23 (dd, J=11,5, 2,2 Гц, 1 H) 4,29 (br.s, 1 H) 4,31 (td, J=9,3, 3,9 Гц, 1 H) 4,44 (d, J=10,2 Гц, 1 H) 4,51 (d, J=5,4 Гц, 2 H) 4,59 (t, J=4,9 Гц, 1 H) 4,61 (dd, J=7,3, 4,9 Гц, 1 H) 4,69 (t, J=4,6 Гц, 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 Гц, 1 H) 5,28 (dd, J=17,1, 2,0 Гц, 1 H) 5,92 (m, 1 H). ESI-MS (m/z): 1172,57 [M+Na]<sup>+</sup>

**Пример 20****Соединение D-7**

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$   
 пириролидин  
 DCM



**[00130]** В атмосфере азота к раствору соединения **D-6** (15,0 мг, 0,013 ммоль), описанного в примере 19, пириролидин (10,8 мкл, 0,13 ммоль) в DCM (2,0 мл) при комнатной температуре добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0) (7,53 мг, 6,52 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография остатка на силикагеле NH с использованием 50% смеси EtOAc/гептан, затем 0% - 20% смеси MeOH/EtOAc давала грубо очищенный продукт. Полученный грубо очищенный продукт очищали с помощью ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (**D-7**, 7,0 мг, 47%, время удерживания = 13,8 мин).

**[00131]** Условия ВЭЖХ:

Колонка: YMC Pak Pro C18 (20 мм × 250 мм)

Длина волны обнаружения: 200 нм

Температура колонки: комнатная температура

Подвижная фаза: MeCN-вода (0,05% AcOH)

Скорость потока: 8 мл/мин

Элюат:

MeCN/вода 25% (iso, 2 мин), затем

MeCN/вода 25% - 60% (градиент, 20 мин)

**[00132]**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, метанол-*d*4)  $\delta$  м.д. 0,99 (d, J=6,7 Гц, 3 H) 1,00 - 1,03 (m, 1 H) 1,04 (d, J=7,3 Гц, 3 H) 1,06 (d, J=7,3 Гц, 3 H) 1,10 (d, J=6,1 Гц, 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 Гц, 1 H) 2,45 (dd, J=17,6, 2,2 Гц, 1 H) 2,56 (dd, J=17,6, 9,8 Гц, 1 H) 2,75 - 2,84 (m, 1 H) 2,98 (dd, J=9,8, 1,8 Гц, 1 H) 3,12 (dd, J=12,8, 3,7 Гц, 1 H) 3,22 (dd, J=6,4, 4,6 Гц, 1 H) 3,26 (dd, J=13,2, 7,8 Гц, 1 H) 3,39 (d, J=1,8 Гц, 1 H) 3,61 (d, J=12,8 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,03 - 4,15 (m, 4 H) 4,18 (dd, J=6,4, 4,6 Гц, 1 H) 4,25 (ddd, J=11,0, 4,3, 1,8 Гц, 1 H) 4,27 - 4,36 (m, 2 H) 4,46 (d, J=11,0 Гц, 1 H) 4,57 - 4,65 (m, 2 H) 4,70 (t, J=4,6 Гц, 1 H) 4,81 (d, J=1,2 Гц, 1 H) 5,02 (br. s, 1 H) 5,06 (d, J=1,8 Гц, 1 H). ESI-MS (m/z): 1066,96 [M+H]<sup>+</sup>, 1090,19 [M+Na]<sup>+</sup>

**[00133]** Соединение (1) (бессолевая форма соединения **D-7**):  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, метанол-*d*4)  $\delta$  м.д. 0,98 (d, J=7,2 Гц, 3 H) 1,00 (d, J=6,8 Гц, 3 H) 1,02 (m, 1 H) 1,05 (d, J=6,8 Гц, 3 H) 1,09 (d, J=6,4 Гц, 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 Гц, 1 H) 1,94 - 2,11 (m, 8 H) 2,14 - 2,34 (m, 9 H) 2,39 (dd, J=13,2, 6,0 Гц, 1 H) 2,44 (dd, J=17,4, 1,9 Гц, 1 H) 2,56 (dd, J=17,6, 9,6 Гц, 1 H) 2,69 (dd, J=13,2, 4,2 Гц, 1 H) 2,79 (ddq, J=15,9, 7,6, 2,0 Гц, 1 H) 2,92 (dd, J=13,2, 8,3 Гц, 1 H) 2,97 (dd, J=9,6, 1,7 Гц, 1 H) 3,21 (dd, J=6,4, 4,9 Гц, 1 H) 3,29 (m, 1 H) 3,34 (dd, J=8,3, 4,15 Гц, 1 H) 3,58 (br. s., 1 H) 3,60 (br.d, J=11,3 Гц, 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 Гц, 1 H) 4,03 - 4,13 (m, 4 H) 4,17 (dd, J=6,4, 4,9 Гц, 1 H) 4,24 (ddd, J=11,3, 4,5, 1,5 Гц, 1 H) 4,29 (dd, J=4,0, 1,9 Гц, 1 H) 4,32 (td, J=10,2, 4,2 Гц, 1 H) 4,44 (br. d, J=11,0 Гц, 1 H) 4,59 (t, J=4,5 Гц, 1 H) 4,62 (dd, J=7,4, 4,7 Гц, 1 H) 4,69 (t, J=4,7 Гц, 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 Гц, 1 H)

**[00134]** ESI-MS (m/z): 1066,57 [M+H]<sup>+</sup>, 1088,55 [M+Na]<sup>+</sup>

### **Примеры фармакологических испытаний**

#### *Общая информация*

**[00135]** Природные соединения галихондрина и их модифицированные соединения известны из литературы (см., например, D. Uemura *et al.* "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985); Marc Litaudon *et al.* "Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge *Lissodendoryx sp.*" *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 1868-1871). Тем не менее, большинство из них не являются легко доступными. Например, доктор Uemura с соавт. выделили 12,5 мг галихондрина B, 35,0 мг норгалихондрина A и 17,2 мг гомогалихондрина A из вплоть до 600 кг *Halichondria okadai* Kadota (см., например, D. Uemura *et al.* "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" *J.*

*Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). Среди природных соединений галихондрина, галихондрин В проявляет наибольшую противоопухолевую активность против клеток меланомы B-16 *in vitro* и очень активен против лейкемии L-1210 *in vivo* (см., например, D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). Галихондрин С также активен в различных моделях *in vivo*, но является нестабильным в водном растворе по сравнению с галихондрином В. Норгалихондрин В намного слабее, чем галихондрин В, не только *in vitro*, но и *in vivo*. См, например, D. Uemura *et al.* “Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge” *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4796 (1985)). В следующих фармакологических испытаниях используют галихондрин В (Hali-B) в качестве эталонных соединений при необходимости.

#### Пример фармакологического испытания 1. Анализ ингибирования роста FaDu

**[00136]** В этом анализе измеряли ингибирующую рост активность исследуемых соединений на клеточной линии FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN). Клетки FaDu содержали в среде RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 187-02021), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS: Nichirei, 12D168), и пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 75 мкл клеточной суспензии FaDu, доведенной до концентрации, составляющей  $4 \times 10^4$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 25 мкл соединения (1) или галихондрина В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Концентрацию исследуемого соединения, необходимую для ингибирования клеточного роста на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>) рассчитывали, и она показана в таблице 1.

Таблица 1

Исследуемое соединение	FaDu (IC <sub>50</sub> (нМ))
Галихондрин В	0,124
Соединение (1)	0,0714

Пример фармакологического испытания 2. Анализ ингибирования роста MDA-MB231

[00137] В этом анализе измеряли ингибирующую рост активность исследуемых соединений на клеточной линии рака молочной железы человека MDA-MB231. Клетки MDA-MB231 содержали в среде Игла в модификации Дульбекко (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 044-29765), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS: Nichirei, 12D168), а также пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 75 мкл суспензии клеток MDA-MB231, доведенной до концентрации, составляющей 4×10<sup>4</sup> клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день, 25 мкл соединения (1) или галихондрина В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Концентрацию исследуемого соединения, необходимую для ингибирования клеточного роста на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>) рассчитывали, и она показана в таблице 2.

Таблица 2

Исследуемое соединение	MDA-MB231 (IC <sub>50</sub> (нМ))
Галихондрин В	1,000
Соединение (1)	0,109

Пример фармакологического испытания 3. Анализ ингибирования роста HCC1954

**[00138]** В этом анализе измеряли ингибирующую рост активность исследуемых соединений на клеточной линии рака молочной железы человека HCC1954. Клетки HCC1954 содержали в среде RPMI-1640, модифицированной так, чтобы она содержала 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 1 мМ пируват натрия, 4500 мг/л глюкозы и 1500 мг/л бикарбоната натрия (ATCC 30-2001), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS: Nichirei, 12D168), а также пенициллин и стрептомицин инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 75 мкл суспензии клеток HCC1954, доведенной до концентрации, составляющей 4×10<sup>4</sup> клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 25 мкл соединения (1) или галихондрин В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Концентрацию исследуемого соединения, необходимую для ингибирования клеточного роста на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>) рассчитывали, и она показана в таблице 3.

**Таблица 3**

<b>Исследуемое соединение</b>	<b>HCC1954 (IC<sub>50</sub> (нМ))</b>
Галихондрин В	0,154
Соединение (1)	0,0668

Пример фармакологического испытания 4. Противоопухолевые эффекты в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu у мышей в качестве монотерапии

**[00139]** Клеточную линию плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN) FaDu, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей 4,8×10<sup>7</sup> клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 7 недель (CAnN.Cg-

Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через девять дней после инокуляции клеток самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Регрессия опухоли (%) = (1 – минимальный RTV) × 100

**[00140]** На основании объемов опухолей, полученных в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Каждое исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере до использования. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли в водном растворе хлорида натрия с 100 мкМ гидроксипропил-β-циклодекстрина. Каждый оцениваемый образец внутривенно вводили в максимально переносимой дозе (MTD). В данном случае, эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 4 мышей. Регрессия опухоли (%) каждого исследуемого соединения показана в таблице 4.

**Таблица 4**

<b>Исследуемое соединение</b>	<b>Доза (мг/кг)</b>	<b>Регрессия опухоли (%)</b>
Галихондрин В	0,05	0
Соединение (1)	0,2	43

Пример фармакологического испытания 5. Противоопухолевая активность против OSC-19 в подкожной ксенотрансплантатной модели у мышей в качестве монотерапии

**[00141]** Клеточную линию OSC-19 плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде DMEM/среде Хэма F-12 (1:1), содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $1 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью PBS для получения клеточной суспензии, и суспензию смешивали с Matrigel™ (BD Bioscience, № по кат. 366237) в соотношении, составляющем 1:1, для получения клеточной суспензии в концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в

подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 5 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через шесть дней после инокуляции клеток самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Регрессия опухоли (%) = (1 – минимальный RTV) × 100

**[00142]** На основании объемов опухолей, полученных в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Исследуемое соединение растворяли в водном растворе хлорида натрия и внутривенно вводили в дозах от 0,06 мг/кг до 0,18 мг/кг один раз в неделю в течение 2 недель (схема Q7D×2). Регрессия опухоли (%) каждой исследуемой дозы показана в таблице 5.

**Таблица 5**

<b>Исследуемое соединение</b>	<b>Доза (мг/кг)</b>	<b>Регрессия опухоли (%)</b>
Соединение (1)	0,06	59
Соединение (1)	0,18	90

Пример фармакологического испытания 6. Противоопухолевая активность против HCC1806 в подкожной ксенотрансплантатной модели у мышей в качестве монотерапии

**[00143]** Клеточную линию HCC1806 рака молочной железы человека, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $1 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью PBS для получения клеточной суспензии, и суспензию смешивали с Matrigel™ (BD Bioscience, № по кат. 366237) в соотношении, составляющем 1:1, для получения клеточной суспензии в концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 5 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.).

Через 12 дней после инокуляции клеток самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Регрессия опухоли (%) = (1 – минимальный RTV) × 100

**[00144]** На основании объемов опухолей, полученных в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Исследуемое соединение растворяли в водном растворе хлорида натрия и внутривенно вводили в дозе, составляющей 0,18 мг/кг, один раз в неделю в течение 2 недель (схема Q7D×2). Регрессия опухоли (%) для соединения (1) показана в таблице 6.

**Таблица 6**

<b>Исследуемое соединение</b>	<b>Доза (мг/кг)</b>	<b>Регрессия опухоли (%)</b>
Соединение (1)	0,18	90

Пример фармакологического испытания 7. Противоопухолевые эффекты в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu в комбинации с цетуксимабом у мышей

**[00145]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, довели до концентрации, составляющей 5×10<sup>7</sup> клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 7 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Регрессия опухоли в день 35 (%) = (1 – RTV в день 35) × 100

**[00146]** На основании объемов опухолей, полученных в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Каждое исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере до использования. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли в водном растворе хлорида натрия с 100 мкМ гидроксипропил-β-циклодекстрина. Каждое исследуемое соединение и внутривенно вводили в дозах от 1/4 MTD до 1/2 MTD в комбинации с цетуксимабом (Erbitux, Merck Serono Co., Ltd.). В данном случае, эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 4 мышей. Регрессия опухоли в день 35 (%) каждого исследуемого соединения показана в таблице 7.

Таблица 7

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Цетуксимаб (мг/кг)	Регрессия опухоли в день 35 (%)
-	-	20	-242
Галихондрин В	0,0125	20	-38
	0,025	20	-2
Соединение (1)	0,05	20	38
	0,1	20	60

Пример фармакологического испытания 8. Противоопухолевая активность в подкожной ксенотрансплантатной модели KPL-4 в комбинации с трастузумабом у мышей

**[00147]** Клеточную линию KPL-4 HER-2-положительного рака молочной железы человека, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, довели до концентрации, составляющей 1×10<sup>8</sup> клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 7 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 16 дней после инокуляции клеток самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой

мышь измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Регрессия опухоли (%) = (1 – минимальный RTV) × 100

**[00148]** На основании объемов опухолей, полученных в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Каждое исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере до использования. Непосредственно перед введением, маточный раствор разбавляли в водном растворе хлорида натрия. Исследуемое соединение внутривенно вводили в дозе, составляющей 0,09 мг/кг или 0,18 мг/кг в комбинации с трастузумабом (Herceptin, Genentech, Inc.). Регрессия опухоли для соединения (1) показана в таблице 8.

**Таблица 8**

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Трастузумаб (мг/кг)	Регрессия опухоли (%)
-	-	10	0
Соединение (1)	0,09	-	43
	0,09	10	83
	0,18	-	87
	0,18	10	100

Пример фармакологического испытания 9. Эффект на CD31-положительный сосуд в подкожной модели FaDu у мышей

**[00149]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей 5×10<sup>7</sup> клеток/мл, с помощью PBS для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 7 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River

Laboratories Japan, Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия с 100 мкМ гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина внутривенно вводили в дозах от 1/2 MTD до MTD. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 3 мышей. Через 5 дней после введения образцы опухоли собирали и фиксировали с помощью фиксатора для ИГХ на основе цинка ИНС Zinc Fixative (BD Pharmingen) при 4 °С в течение 24 ч. Залитые в парафин ткани разрезали (3 мкм), устанавливали на положительно заряженные предметные стекла и сушили на воздухе. Иммуногистохимическое окрашивание CD31 проводили с использованием устройства для автоматического окрашивания Ventana модели Discover XT (Roche Diagnostics) в соответствии с протоколом производителя. Срезы депарафинизировали, кондиционировали и антигены извлекали с помощью CC1 (Ventana Medical Systems). Предметные стекла блокировали с помощью блокаторов Blocker A и Blocker B (набор для блокирования эндогенного биотина, Roche Diagnostics). Крысиное антитело IgG к CD31 мыши (Dianova GmbH) применяли в концентрации 2 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение 6 часов с последующей 32-минутной инкубацией с биотинилированным антителом к IgG крысы (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в концентрации 2,2 мкг/мл. Обнаружение проводили с помощью стрептавидина-HRP D в течение 16 минут с последующей инкубацией с DAB D и DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D (набор DABMap, Ventana Medical Systems, Inc) в течение 8 минут. Предметные стекла окрашивали гематоксилином II (Roche Diagnostics) в течение 16 минут с последующей инкубацией с реагентом Bluing в течение 4 минут. Срезы обезвоживали в градуированных этанолах, обезжировали при замене ксилола и покрывали DPX (Merck KGaA).

**[00150]** Иммуноокрашенные предметные стекла сканировали с использованием автоматизированной системы визуализации предметных стекол Vectra 2 Automated Slide Imaging System (Perkin Elmer Inc.). Количество кровеносных сосудов во всей опухоли определяли количественно путем подсчета CD31-положительных объектов с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь области опухоли измеряли путем оценки площади окрашивания гематоксилином с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Количество кровеносных сосудов нормализовали по площади области опухоли. Скорость увеличения количества кровеносных сосудов в группе, получившей исследуемое соединение, рассчитывали по приведенной ниже формуле, и она показана в таблице 9.

Коэффициент увеличения количества кровеносных сосудов (%) = ((количество кровеносных сосудов в группе, получившей исследуемое соединение — количество

кровеносных сосудов контрольной группы) / количество кровеносных сосудов контрольной группы)  $\times 100$

Таблица 9

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Коэффициент увеличения количества кровеносных сосудов (%)
Галихондрин В	0,025	31
	0,05	39
Соединение (1)	0,10	69
	0,20	154

Пример фармакологического испытания 10. Эффект на  $\alpha$ -SMA-положительные САФ в подкожной модели FaDu

**[00151]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью PBS для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 5-6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия с 100 мкМ гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина внутривенно вводили в дозе, составляющей 1/2 MTD и MTD. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 3 мышей. Через 2 дня после введения образцы опухоли собирали и фиксировали с помощью фиксатора для ИГХ на основе цинка ИНС Zinc Fixative (BD Pharmingen) при 4 °C в течение 24 ч. Залитые в парафин ткани разрезали (3 мкм), устанавливали на положительно заряженные предметные стекла и сушили на воздухе в течение 6 часов. Иммуногистохимическое окрашивание  $\alpha$ -SMA проводили с использованием устройства для автоматического окрашивания Ventana модели Discover XT (Roche Diagnostics). Срезы депарафинизировали, кондиционировали и антигены извлекали с помощью запатентованных буферов, EZPrep и CC1 (Ventana Medical Systems). Мышиное моноклональное антитело к  $\alpha$ -SMA, конъюгированное с щелочной фосфатазой (клон 1A4, Sigma), применяли в концентрации 5 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение 6 часов. Обнаружение проводили с помощью набора RedMap (Ventana Medical Systems, Inc). Срезы обезвоживали в градуированных этанолах, обезжировали при замене ксилола и

покрывали DPX (Merck KGaA). Серийные срезы опухоли депарафинизировали и окрашивали гематоксилином Майера (Muto Pure Chemicals) в течение 1 мин. Срезы обезжировали в градуированных этанолах, обезжирировали при замене ксилола и покрывали DPX (Merck KGaA).

**[00152]** Иммуноокрашенные предметные стекла сканировали с использованием автоматизированной системы визуализации предметных стекол Vectra 2 Automated Slide Imaging System (Perkin Elmer Inc.). Площадь  $\alpha$ -SMA-положительной области во всей опухоли определяли количественно путем подсчета  $\alpha$ -SMA-положительных объектов с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь области опухоли измеряли путем оценки площади окрашивания гематоксилином с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь  $\alpha$ -SMA-положительной области нормализовали к площади области опухоли. Коэффициент подавления  $\alpha$ -SMA-положительной области в группе, получившей исследуемое соединение, рассчитывали по приведенной ниже формуле, и она показана в таблице 10.

**Таблица 10**

<b>Исследуемое соединение</b>	<b>Доза (мг/кг)</b>	<b>Коэффициент подавления <math>\alpha</math>-SMA-положительной области (%)</b>
Галихондрин В	0,025	7
	0,05	3
Соединение (1)	0,10	21
	0,20	28

Коэффициент подавления  $\alpha$ -SMA-положительной области (%) =  $\frac{((\alpha\text{-SMA-положительная область группы, получившей исследуемое соединение} - \alpha\text{-SMA-положительная область контрольной группы}) / \alpha\text{-SMA-положительная область контрольной группы}) \times 100}{\alpha\text{-SMA-положительная область контрольной группы}}$

Пример фармакологического испытания 11. Модель ортотопической трансплантации HSC-2 на мышах

**[00153]** Трансдуцированные люциферазой клетки HSC-2-Luc получали с помощью опосредованного ретровирусами переноса генов. Сначала фрагмент ДНК, кодирующий люциферазу светлячка, получали из плазмиды pGL3-энхансера (GenBank №: U47297) и субклонировали в ретровирусный вектор pCX4puro (GenBank №: AB086386). Затем получали рекомбинантные ретровирусы без хелпера путем трансфекции вышеуказанного ретровирусного экспрессионного вектора вместе с плазмидами pGP и pE-

Ampho (Takara Bio; Сига, Япония) в клетки 293Т (АТСС; Манассас, США). Затем клетки HSC-2 инфицировали рекомбинантными ретровирусами и культивировали в течение двух недель в присутствии пурамицина (2 мкг/мл). Инфицированные клетки выбирали из поликлональной пролиферативной популяции культуры.

**[00154]** Под анестезией клеточную линию SCCHN человека, HSC-2-Luc, инокулировали в язык самок бестимусных мышей ( $1 \times 10^6$  клеток в 50 мкл PBS) 6-недельного возраста (мыши CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj; Charles River, Inc.; Сидзуока, Япония). Через семь дней после трансплантации объем опухоли анализировали с использованием сигнала биолюминесценции от клеток HSC-2-Luc. Для визуализации биолюминесценции 0,1 мл 15-мг/мл D-люциферина (Promega, Madison, WI) вводили внутривенно бестимусным мышам при вдыхании изофлурановой анестезии от 1 до 2%. Сигнал биолюминесценции подвергали мониторингу с использованием серии IVIS SPECTRUM (PerkinElmer, Waltham, MA), состоящей из высокочувствительной охлаждаемой камеры с прибором с зарядовой связью. Программное обеспечение Living Image (PerkinElmer, Waltham, MA) использовали для построения сетки данных изображения и интеграции суммарного сигнала биолюминесценции в каждой представляющей интерес области (ROI). Все биолюминесцентные изображения получали с экспозицией в 1 секунду. Данные проанализировали с использованием суммарного излучения потока фотонов (фотонов в секунду) в ROI.

**[00155]** На основании суммарного излучения потока фотонов, полученного в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения суммарного излучения потока фотонов были по существу одинаковыми среди групп. Соединение (1) или цисплатин вводили внутривенно с цетуксимабом или без него (Erbix, Merck Serono Co., Ltd.) один раз в неделю в течение 3 недель (схема Q7D $\times$ 3). Два эксперимента проводили с использованием идентичной процедуры и все данные собирали из экспериментов. Каждая группа состояла из 16 мышей.

**[00156]** Данные визуализации показали, что только лечение с помощью соединения (1) с цетуксимабом явно снижало сигнал биолюминесценции у всех мышей после 14-го дня (фиг. 6А-6В). Среднее время выживания (MST) рассчитывали для каждой группы лечения в качестве медианы дней смерти. Увеличение продолжительности жизни (ILS) рассчитывали по следующей формуле:  $ILS (\%) = (MST \text{ животных, получивших лечение с помощью исследуемого соединения} - MST \text{ контрольных животных}) / MST \text{ контрольных животных} \times 100$ . Показано ILS (%) каждого исследуемого соединения показана в таблице 11.

Таблица 11

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Цетуксимаб (мг/кг)	ILS (%)
-	-	5	231
Цисплатин	5	-	0
	5	5	150
Соединение (1)	0,09	-	238
	0,09	5	>1150

Пример фармакологического испытания 12. Подкожная ксенотрансплантатная модель FaDu в комбинации с лучевой терапией

**[00157]** Трансдуцированные люциферазой клетки FaDu-Luc получали с помощью опосредованного ретровирусами переноса генов. Сначала фрагмент ДНК, кодирующий люциферазу светлячка, получали из плазмиды pGL3-энхансера (GenBank №: U47297) и субклонировали в ретровирусный вектор рCX4pug (GenBank №: AB086386). Затем получали рекомбинантные ретровирусы без хелпера путем трансфекции вышеуказанного ретровирусного экспрессионного вектора вместе с плазмидами рGP и рE-Ampho (Takara Bio; Сига, Япония) в клетки 293Т (АТСС; Манассас, США). Затем клетки FaDu инфицировали рекомбинантными ретровирусами и культивировали в течение двух недель в присутствии пурамицина (2 мкг/мл). Инфицированные клетки выбирали из поликлональной пролиферативной популяции культуры.

**[00158]** Трансдуцированную люциферазой клеточную линию FaDu-Luc SCCNН человека, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, довели до концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бедра бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 13 дней после инокуляции клеток объем опухоли анализировали с использованием сигнала биолюминесценции от клеток FaDu-Luc. Для визуализации биолюминесценции 0,1 мл 15-мг/мл D-люциферина (Promega, Madison, WI) вводили внутривентриально бестимусным мышам при вдыхании изофлурановой анестезии от 1 до 2%. Сигнал биолюминесценции подвергали мониторингу с использованием серии IVIS SPECTRUM (PerkinElmer, Waltham, MA), состоящей из высокочувствительной охлаждаемой камеры с прибором с зарядовой связью. Программное обеспечение Living Image (PerkinElmer, Waltham, MA) использовали

для построения сетки данных изображения и интеграции суммарного сигнала биолюминесценции в каждой представляющей интерес области (ROI). Все биолюминесцентные изображения получали с экспозицией в 1 секунду. Данные проанализировали с использованием суммарного излучения потока фотонов (фотонов в секунду) в ROI. Суммарное излучение потока фотонов было рассчитано в соответствии со следующими расчетными формулами:

Относительный уровень биолюминесценции = суммарное излучение потока фотонов (день X) / суммарное излучение потока фотонов (первый день)

Регрессия опухоли (%) = (1 – минимальный относительный уровень биолюминесценции) × 100

**[00159]** На основании суммарного излучения потока фотонов, полученного в первый день введения, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения суммарного излучения потока фотонов были по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Соединение (1) вводили посредством инъекции в хвостовую вену в день 1 и 8. Облучение проводили в дозе 18 Гр в день 4 и день 11. Регрессия опухоли для соединения (1) показана в таблице 12.

**Таблица 12**

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Облучение (Гр)	Регрессия опухоли (%)
-	-	18	16
Соединение (1)	0,09	-	0
	0,09	18	97

Пример фармакологического испытания 13. Противоопухолевая активность в подкожной сингенной модели CT26 в комбинации с антителом к mPD-1 у мышей

**[00160]** Мышиную недифференцированную клеточную линию CT26 карциномы толстой кишки, которую культивировали в среде RPMI-1640 содержащей 10% FBS, а также пенициллин и стрептомицин, довели до концентрации, составляющей  $2 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. В день 1 клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока мышей BALB/c возрастом 6 недель (BALB/cAnNCrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 2 дня после инокуляции клеток мышей случайным образом разделили на 4 группы, и каждая группа

состояла из 8 мышей. Самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующей расчетной формулой:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

T/C = (средний объем опухоли группы, получившей лечение)/средний объем опухоли контрольной группы)

Ингибирование роста опухоли (%) = (1-T/C) × 100

**[00161]** Исследуемое соединение внутривенно вводили в дозе, составляющей 0,09 мг/кг, в дни 3 и 11. Антитело к mPD-1 (BE0146, Bio X Cell) внутривенно вводили в дозе 10 мг/кг, в дни 3, 7, 11 и 15. Ингибирование роста опухоли в день 15 (%) каждого исследуемого соединения показано в таблице **13**.

**Таблица 13**

Исследуемое соединение	Доза (мг/кг)	Антитело к mPD-1 (мг/кг)	Ингибирование роста опухоли в день 15 (%)
-	-	10	32
Соединение (1)	0,09	-	30
	0,09	10	62

Пример фармакологического испытания 14. Эффект на полимеризацию тубулина *in vitro* (фигура 10A)

**[00162]** Набор для анализа полимеризации тубулина приобретали у Cytoskeleton, Inc. (№ по кат.: ВК011Р). Набор содержал 1 флакон лиофилизированного белка тубулина, очищенного от головного мозга свиньи, 3 пробирки лиофилизированного GTP, 2 флакона лиофилизированного буфера для анализа и 1 флакон тубулинового буфера на основе глицерина. Буфер для анализа получали растворением содержимого в 10 мл деионизированной и стерилизованной воды. Этот раствор содержал 80 ммоль/л полуторной соли натрия и пиперазин-*N,N'*-бис[2-этансульфоновой кислоты], 2,0 ммоль/л хлорида магния, 0,5 ммоль/л этиленгликоль-бис(2-аминоэтилового эфира) *N,N,N',N'*-тетрауксусной кислоты, рН 6,9 и 10 мкмоль/л флуоресцентного репортера. Буфер хранили при -70 °С до использования. Тубулиновый буфер на основе глицерина состоял из 80 ммоль/л полуторной соли натрия и пиперазин-*N,N'*-бис[2-этансульфоновой кислоты], 2,0 ммоль/л хлорида магния, 0,5 ммоль/л этиленгликоль-бис(2-аминоэтилового эфира) *N,N,N',N'*-тетрауксусной

кислоты и 60% объем./объем. глицерина, рН 6,9. Его хранили при 4°C до использования. Маточный раствор GTP получали путем растворения содержимого каждой пробирки в 100 мкл деионизированной и стерилизованной воды до достижения концентрации 100 ммоль/л GTP. Аликвоты этого маточного раствора хранили при -70 °С до использования. Маточный раствор тубулина (10 мг/мл) получали путем растворения порошка тубулина с добавлением 1,1 мл смеси буфера для анализа и маточного раствора GTP (100:1, объем./объем.). Аликвоты замораживали в жидком азоте, а затем хранили при -70°C до использования.

**[00163]** В анализе полимеризации тубулина реакционную смесь получали путем смешивания 820 мкл буфера для анализа, 17,6 мкл маточного раствора GTP и 600 мкл тубулинового буфера на основе глицерина. Реакционную смесь (1015 мкл) объединяли с 240 мкл маточного раствора тубулина. Этот раствор называли тубулиновой реакционной смесью и использовали для измерения в исследуемой и контрольной лунках. Реакционную смесь без тубулина получали путем смешивания 89,85 мкл реакционной смеси и 21,25 мкл буфера для анализа для измерения холостых лунок. Раствор соединения (1) (6,25-100 мкмоль/л; конечные концентрации 0,625-10 мкмоль/л) или несущую среду добавляли в объеме 5 мкл в отдельные лунки 96-луночного титрационного микропланшета с половинным объемом лунок. Тубулинову реакционную смесь или реакционную смесь без тубулина добавляли при 45 мкл в каждую лунку планшета. Излучение флуоресценции при 460 нм (длина волны возбуждения при 360 нм) измеряли каждые 2 минуты в течение 90 минут с использованием устройства для считывания микропланшетов SpectraMax® M5e (Molecular Devices). Полимеризация тубулина сопровождалась усилением флуоресценции вследствие включения репортера флуоресценции в микротрубочки по мере того, как происходила полимеризация. Анализ выполняли в двух параллелях. Анализ показал, что соединение (1) ингибировало полимеризацию тубулина зависимым от концентрации образом. Интенсивность флуоресценции в каждой временной точке рассчитывали по следующим формулам:

Интенсивность флуоресценции = среднее измерение флуоресценции в исследуемых или контрольных лунках - среднее измерение флуоресценции в холостых лунках; холостая лунка: с несущей средой без тубулина; контрольная лунка: с несущей средой и тубулином; исследуемая лунка: с соединениями и тубулином.

Пример фармакологического испытания 15. Клеточный анализ динамики микротрубочек (фигура 10B)

**[00164]** Клеточный анализ динамики микротрубочек (MT) проводили с клеточной линией остеосаркомы U2OS-EB3-AG, в которой стабильно экспрессировался

слитый белок EB3 (микротрубочка вместе с концевым связывающим белком) и Azami-Green (EB3-AG). Клетки U2OS-EB3-AG культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и пенициллин-стрептомицин, при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Динамику МТ в живых клетках можно визуализировать как движение кометоподобной структуры EB3-AG. Клетки U2OS-EB3-AG, помещенные на планшеты для культивирования на стеклянной основе (планшет EZVIEW, AGC Techno Glass, Япония), обрабатывали соединением (1) в указанной концентрации, и динамику микротрубочек подвергали мониторингу с помощью покадровой визуализации с использованием флуоресцентного микроскопа с масляным объективом с 60-кратным увеличением (BZ-X710, KEYENCE, Япония). Неподвижные изображения в указанные моменты времени представлены на *фигуре 10В*. Виды с более высоким увеличением областей в рамках показаны во вставках. При обработке соединением (1) в концентрации 0,5 нМ (значение IC<sub>50</sub> для антипролиферативной активности в клетках U2OS-EB3-AG) кометоподобные структуры стало трудно наблюдать приблизительно через 60 минут после добавления соединения. Эти результаты ясно продемонстрировали, что соединение (1) обладает способностью подавлять динамику МТ.

Пример фармакологического испытания 16. *In vitro* антипролиферативная активность (*фигура 11*)

**[00165]** Антипролиферативные анализы *in vitro* для соединения (1) проводили с использованием небольшой панели клеточных линий рака, включая в себя плоскоклеточную карциному пищевода человека (OE21, TE-8), аденокарциному пищевода человека (OE33) и саркому матки человека (MES-SA, MES-SA-Dx5-Rx1). Все клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин (среда для культивирования), в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 75 мкл клеточной суспензии, доведенной до концентрации, составляющей 4×10<sup>4</sup> клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 25 мкл соединения (1) в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 72 ч в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения 2013 EnVision™ (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и

значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Концентрацию соединения (1), необходимую для ингибирования роста клеток на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>) рассчитывали, и она показана на *фигуре 11*. Восприимчивость к P-gr рассчитывали как соотношение значения IC<sub>50</sub> в клетках MES-SA-Dx5-Rx1, которые избыточно экспрессируют P-gr, к значению IC<sub>50</sub> в клетках MES-SA.

Пример фармакологического испытания 17. Противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях KPL-4 у мышей в качестве монотерапии; противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях COLO-704 у мышей в качестве монотерапии (фигура 12)

**[00166]** Клеточную линию KPL-4 HER-2-положительного рака молочной железы человека, которую культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин, довели до концентрации, составляющей  $1 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 8 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через 11 дней после инокуляции клеток (день 1) самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Относительная масса тела (RBW) = масса тела (день X) / масса тела (первый день)

**[00167]** На основании объемов опухолей, полученных в день 1, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из шести мышей. Исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили один раз в неделю в дозе 20 мкг/кг, 60 мкг/кг или 180 мкг/кг в течение 2 недель (в день 1 и день 8). Регрессию опухоли наблюдали в группах, получивших лечение в дозах 60 мкг/кг и 180

мкг/кг, и введение в дозе 180 мкг/кг полностью устраняло ксенотрансплантатные опухоли у всех мышей на 15-й день.

**[00168]** Клеточную линию COLO-704 рака яичника человека, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $1 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 5 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через девять дней после инокуляции клеток (день 1) самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) = самый длинный диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

Относительная масса тела (RBW) = масса тела (день X) / масса тела (первый день)

**[00169]** На основании объемов опухолей, полученных в день 1, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из шести мышей. Исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили один раз в неделю в дозе 20 мкг/кг, 60 мкг/кг или 180 мкг/кг в течение 2 недель (в день 1 и день 8). Лечение с помощью соединения индуцировало регрессию опухоли в дозе, составляющей 180 мкг/кг, и задержку роста опухоли в дозе, составляющей 60 мкг/кг. Введение в дозе, составляющей 180 мкг/кг, полностью устраняло ксенотрансплантатные опухоли у всех мышей на 22-й день.

Пример фармакологического испытания 18. Эффект на CD31-положительный сосуд в подкожной модели FaDu у мышей (фигура 13)

**[00170]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин (среда для культивирования), доводили до концентрации,

составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Каждое исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением, маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили в дозе, составляющей 20 мкг/кг, 60 мкг/кг или 180 мкг/кг. Через пять дней после однократного введения образцы опухоли собирали и фиксировали с помощью фиксатора для ИГХ на основе цинка ИС Zinc Fixative (BD Pharmingen) при 4 °С в течение 24 часов. Залитые в парафин ткани разрезали (3 мкм), устанавливали на положительно заряженные предметные стекла и сушили на воздухе. Иммуногистохимическое окрашивание CD31 проводили с использованием устройства для автоматического окрашивания Ventana модели Discover XT (Roche Diagnostics) в соответствии с протоколом производителя. Срезы депарафинизировали, кондиционировали и антигены извлекали с помощью CC1 (Ventana Medical Systems). Предметные стекла блокировали с помощью блокаторов Blocker A и Blocker B (набор для блокирования эндогенного биотина, Roche Diagnostics). Крысиное антитело IgG к CD31 мыши (Dianova GmbH) применяли в концентрации 2 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение 6 часов с последующей 32-минутной инкубацией с биотинилированным антителом к IgG крысы (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в концентрации 2,2 мкг/мл. Обнаружение проводили с помощью стрептавидина-HRP D в течение 16 минут с последующей инкубацией с DAB D и DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D (набор DABMap, Ventana Medical Systems, Inc.) в течение 8 минут. Предметные стекла окрашивали гематоксилином II (Roche Diagnostics) в течение 16 минут с последующей инкубацией с реагентом Bluing в течение 4 минут. Срезы обезвоживали в градуированных этанолах, обезжировали при замене ксилола и покрывали DPX® (Merck KGaA). Иммуноокрашенные предметные стекла сканировали с использованием автоматизированной системы визуализации предметных стекол Vectra® 2 Automated Slide Imaging System (Perkin Elmer Inc.). Количество кровеносных сосудов во всей опухоли определяли количественно путем подсчета CD31-положительных объектов с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь области опухоли измеряли, оценивая область окрашивания гематоксилином с использованием

программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Количество кровеносных сосудов нормализовали по площади области опухоли. Однократное введение исследуемого соединения в дозах 20, 60 и 180 мкг/кг увеличивало количество кровеносных сосудов опухоли. Соотношения количества кровеносных сосудов в группах, получавших исследуемое соединение, по сравнению с группой, не получившей лечение, рассчитывали по приведенной ниже формуле:

Соотношение сосудов опухоли = количество кровеносных сосудов в группе, получившей исследуемое соединение / количество кровеносных сосудов в группе, не получившей лечение)

Пример фармакологического испытания 19. Эффект на  $\alpha$ -SMA-положительные CAF в подкожной модели FaDu у мышей (фигура 14)

**[00171]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин (среда для культивирования), доводили до концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 5 мышей. Каждое исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили в дозах, составляющих 20 мкг/кг, 60 мкг/кг или 180 мкг/кг. Через два дня или пять дней после однократного введения образцы опухоли собирали и фиксировали с помощью фиксатора для ИГХ на основе цинка IHC Zinc Fixative (BD Pharmingen) при 4 °C в течение 24 часов. Залитые в парафин ткани разрезали (3 мкм), устанавливали на положительно заряженные предметные стекла и сушили на воздухе. Срезы депарафинизировали, кондиционировали и антигены извлекали с использованием микроволновой печи с 1 mM EDTA при pH 6,0. Срезы блокировали с помощью 1% BSA в TBS. Мышиное моноклональное антитело к  $\alpha$ -SMA, конъюгированное с щелочной фосфатазой (клон 1A4, Sigma), применяли в концентрации 5 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение 2,5 часов. Обнаружение проводили с помощью набора субстратов Fast

red II (Nichirei Bioscience Inc.). Срезы контрастно окрашивали с гематоксилином Майера (Muto Pure Chemicals) в течение 50 секунд. Срезы обезвоживали в градуированных этанолах, обезжировали при замене ксилола и покрывали DPX (Merck KGaA). Иммуноокрашенные предметные стекла сканировали с использованием автоматизированной системы визуализации предметных стекол Vectra 2 Automated Slide Imaging System (Perkin Elmer Inc.). Площадь  $\alpha$ -SMA-положительной области во всей опухоли определяли количественно путем подсчета  $\alpha$ -SMA-положительных объектов с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь области опухоли измеряли путем оценки площади, окрашенной гематоксилином, с использованием программного обеспечения inForm 2 (PerkinElmer Inc.). Площадь  $\alpha$ -SMA-положительной области нормализовали по площади области опухоли. Однократное введение исследуемого соединения значительно уменьшало  $\alpha$ -SMA положительную область в дозах, составляющих 60 и 180 мкг/кг, в день 3 и в дозе, составляющей 180 мкг/кг, в день 6. Коэффициент подавления  $\alpha$ -SMA-положительной области для получившей исследуемое соединение группы рассчитывали по приведенной ниже формуле:

Соотношение  $\alpha$ -SMA =  $\alpha$ -SMA-положительная область группы, получившей исследуемое соединение /  $\alpha$ -SMA-положительная область группы, не получившей лечение

Пример фармакологического испытания 20. Эффекты на тенасцин-С и EDA-фибронектин в подкожной модели FaDu у мышей (фигура 15)

**[00172]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, а также пенициллин-стрептомицин (среда для культивирования), доводили до концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования с получением клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 5 мышей. Соединение (1) растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Соединение (1) (180 мкг/кг) и цетуксимаб (CTX, Erbitux<sup>®</sup>, Merck Serono Co. Ltd.) (10 мг/кг) разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия и внутривенно вводили инъекцией в день 1. Через пять дней после однократного введения образцы опухоли собирали и фиксировали фиксатором ИС Zinc Fixative (BD Pharmingen) при 4 °C в течение 24 часов. Залитые в

парафин ткани разрезали (3 мкм), устанавливали на положительно заряженные предметные стекла и сушили на воздухе. Срезы депарафинизировали, кондиционировали и антигены извлекали с использованием микроволновой печи с 1 мМ EDTA при pH 6,0 для тенасцина-С. Для EDA-фибронектина процедура извлечения антигенов не была необходима. Срезы инкубировали с блокирующим раствором BLOXALL (Vector Labs) в течение 10 минут для блокирования эндогенной пероксидазы и блокирующим реагентом Mouse on Mouse Ig Blocking Reagent (Vector Labs) в течение 1 часа, а затем с 2,5% нормальной лошадиной сывороткой в течение 30 минут. Для иммуногистохимического окрашивания тенасцина-С применяли мышинное моноклональное антитело к тенасцину-С (клон 4C8MS, IBL) в концентрации 5 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение ночи при 4 °С. Для иммуногистохимического окрашивания EDA-фибронектина мышинное моноклональное антитело к EDA-фибронектину (клон IST-9, Abcam) применяли в концентрации 1,5 мкг/мл. Срезы инкубировали с антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. Обнаружение проводили с помощью набора для пероксидазного полимера Mouse On Mouse ImmPRESS™ Peroxidase Polymer Kit (Vector Labs). Срезы контрастно окрашивали с помощью гематоксилина Майера (Muto Pure Chemicals) в течение 50 с. Срезы обезжировали в градуированных этанолах, обезжировали при замене ксилола и покрывали DPX (Merck KGaA). Иммуноокрашенные предметные стекла сканировали с использованием автоматизированной системы визуализации предметных стекол Vectra 2 Automated Slide Imaging System (Perkin Elmer Inc.). Уровни экспрессии как тенасцина-С, так и ED-A фибронектина, были снижены в опухолях, обработанных соединением (1) и СТХ, по сравнению с контрольными опухолями.

Пример фармакологического испытания 21. Противоопухолевые эффекты в подкожной ксенотрансплантатной модели FaDu в комбинации с цетуксимабом у мышей (фигура 16)

**[00173]** Клеточную линию FaDu плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека (SCCHN), которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и пенициллин-стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $5 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса, для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, возраст - 7 недель, Charles River Japan Inc.). Через 10 дней после инокуляции клеток (день 1) длину и ширину опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного

цифрового штангенциркуля (Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующей расчетной формулой:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00174]** На основании TV мышей случайным образом распределяли по группам (день 1). Каждая группа состояла из шести мышей. Соединение (1) растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Соединение (1) (20, 60 или 180 мкг/кг) и цетуксимаб (CTX, Erbitux®, Merck Serono Co., Ltd.) (10 мг/кг) разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия и внутривенно вводили инъекцией в день 1. Изменения RTV каждой группы показаны на *фигуре 16*. В дозах, составляющих 180 мкг/кг и 60 мкг/кг, противоопухолевые эффективности соединения (1) с CTX были сильнее, чем таковые для монотерапии CTX, с регрессией опухоли. Противоопухолевая эффективность соединения (1) в дозах, составляющих 20 мкг/кг, в комбинации с CTX, как правило, была сильнее, чем противоопухолевая эффективность монотерапии CTX.

Пример фармакологического испытания 22. Противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях саркомы мягких тканей у мышей в качестве монотерапии (фигура 17)

*MES-SA*

**[00175]** Клеточную линию саркомы матки человека MES-SA, которую культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и пенициллин-стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $2 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса, для получения клеточной суспензии, и суспензию смешивали с Geltrex® (Thermo Fisher Scientific Inc., № по кат. A1413202) в соотношении, составляющем 1:1, для получения клеточной суспензии в концентрации, составляющей  $1 \times 10^8$  клеток/мл. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через 6 дней после инокуляции клеток (день 1) самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) = самый длинный диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00176]** На основании объемов опухолей, полученных в день 1, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из 6 мышей. Исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили один раз в неделю в дозе, составляющей 180 мкг/кг в течение 2 недель (в день 1 и день 8). Наблюдала противоопухолевую активность с задержкой роста опухоли в получившей лечение группе.

#### *HT-1080*

**[00177]** Клеточную линию фибросаркомы человека HT-1080, которую культивировали в среде E-MEM, содержащей 10% FBS, NEAA и антибиотики, довели до концентрации, составляющей  $3 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью среды для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, возраст - 6 недель, Charles River Japan Inc.). Через 6 дней после инокуляции клеток (день 1) длину и ширину опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующей расчетной формулой:

Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) = самый длинный диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)  $\times$  самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00178]** На основании TV мышей случайным образом распределяли по группам (день 1). Каждая группа состояла из шести мышей. Соединение (1) растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Соединение (1) (180 мкг/кг) разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия и внутривенно вводили с помощью инъекции в день 1 и день 8. Изменения RTV каждой группы показана на фигуре 17. Наблюдала противоопухолевую активность с регрессией опухоли в получившей лечение группе.

*CTG-2041*

**[00179]** Фрагменты опухоли ангиосаркомы человека CTG-2041 имплантировали подкожно в левый бок самок мышей. Рост опухоли подвергали мониторингу два раза в неделю с использованием цифрового штангенциркуля, чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующей расчетной формулой:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00180]** Когда объем опухолей достигал приблизительно 200 мм<sup>3</sup>, животных относили по объему опухоли в группы лечения или контрольную группу и начинала введение доз в день 1. Каждая группа состояла из пяти мышей. Соединение (1) растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Соединение (1) (100 мкг/кг) разбавляли в водном растворе хлорида натрия и внутривенно вводили с помощью инъекции в день 1 и день 8. Изменения RTV каждой группы показаны на *фигуре 17*. Наблюдали противоопухолевую активность с регрессией опухоли в получившей лечение группе.

Пример фармакологического испытания 23. Противоопухолевые эффекты в ксенотрансплантатных моделях саркомы эндометрия у мышей в качестве монотерапии (фигура 18)

*HEC-108*

**[00181]** Клеточную линию HEC-108 рака эндометрия человека, которую культивировали в среде E-MEM, содержащей 15% FBS и антибиотиков, доводили до концентрации, составляющей  $7,14 \times 10^7$  клеток/мл, с помощью среды для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 150 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, возраст - 6 недель, Charles River Japan Inc.). Через 13 дней после инокуляции клеток (день 1) длину и ширину опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующей расчетной формулой:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00182]** На основании TV мышей случайным образом распределяли по группам (день 1). Каждая группа состояла из шести мышей. Соединение (1) растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Соединение (1) (180 мкг/кг) разбавляли в водном растворе хлорида натрия и внутривенно вводили с помощью инъекции в день 1 и день 8. Изменения RTV каждой группы показаны на фигуре 18. Наблюдали противоопухолевую активность с задержкой роста опухоли в получившей лечение группе.

### AN3CA

**[00183]** Клеточную линию рака эндометрия человека AN3CA, которую культивировали в среде E-MEM, содержащей 10% FBS, и пенициллин-стрептомицин, доводили до концентрации, составляющей  $1,4 \times 10^8$  клеток/мл, с помощью сбалансированного солевого раствора Хенкса, для получения клеточной суспензии, и суспензию смешивали с Geltrex<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., № по кат.: A1413202) в соотношении, составляющем 1:1, для получения клеточной суспензии в концентрации, составляющей  $7 \times 10^7$  клеток/мл. Клеточную суспензию инокулировали в объеме, составляющем 100 мкл, в подкожную часть правого бока бестимусных мышей возрастом 6 недель (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, самки, Charles River Laboratories Japan Inc.). Через 12 дней после инокуляции клеток (день 1) самый короткий диаметр и самый длинный диаметр опухоли у каждой мыши измеряли с использованием электронного цифрового штангенциркуля (штангенциркуль Digimatic™, Mitutoyo Corporation), чтобы вычислить объем опухоли в соответствии со следующими расчетными формулами:

Объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = самый длинный диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм) × самый короткий диаметр (мм)/2

Относительный объем опухоли (RTV) = объем опухоли (день X) / объем опухоли (первый день)

**[00184]** На основании объемов опухолей, полученных в день 1, мышей распределяли по группам таким образом, чтобы средние значения объемов опухоли являлись по существу одинаковыми среди групп. Эксперимент проводили на группах, каждая из которых состояла из пяти мышей. Исследуемое соединение растворяли в DMSO и раствор хранили в морозильной камере перед использованием. Непосредственно перед введением маточный раствор разбавляли с помощью водного раствора хлорида натрия. Исследуемое соединение в водном растворе хлорида натрия внутривенно вводили один раз

в неделю в дозе, составляющей 180 мкг/кг, в течение 2 недель (в день 1 и день 8). Наблюдали противоопухолевую активность с регрессией опухоли в получившей лечение группе.

Пример фармакологического испытания 24. Анализ ингибирования роста NCI-N87 и MKN-28

**[00185]** В этом анализе измеряли ингибирующие рост активности исследуемых соединений в клеточных линиях рака желудка человека NCI-N87 и MKN-28, соответственно. Клетки NCI-N87 и MKN-28 содержали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 100 мкл суспензии клеток NCI-N87 или MKN-28, доведенной до концентрации, составляющей 3×10<sup>4</sup> клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 100 мкл соединения (1) или галихондрин В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Рассчитывали концентрации исследуемого соединения, необходимые для ингибирования роста клеток на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>), и они показаны в таблице 14.

**Таблица 14**

	<b>NCI-N87</b>	<b>MKN-28</b>
<b>Исследуемое соединение</b>	<b>(IC<sub>50</sub> (нМ))</b>	<b>(IC<sub>50</sub> (нМ))</b>
Галихондрин В	0,007	0,017
Соединение (1)	0,002	0,015

Пример фармакологического испытания 25. Анализ ингибирования роста HuTu 80

**[00186]** В этом анализе измеряли ингибирующие рост активности исследуемых соединений в клеточной линии HuTu 80 рака тонкой кишки человека, которую выделяли из ткани двенадцатиперстной кишки. Клетки HuTu 80 содержали в среде EMEM, содержащей 10% FBS, пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 100 мкл суспензии

клеток HuTu80, доведенной до концентрации, составляющей  $3 \times 10^4$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 100 мкл соединения (1) или галихондрин В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Рассчитывали концентрации исследуемых соединений, необходимые для ингибирования роста клеток на 50% (т.е. значение IC<sub>50</sub>), и они показаны в таблице 15.

Таблица 15

Исследуемое соединение	HuTu 80 (IC <sub>50</sub> (нМ))
Галихондрин В	0,031
Соединение (1)	0,019

Пример фармакологического испытания 26. Анализ ингибирования роста SW780

**[00187]** В этом анализе измеряли ингибирующие рост активности исследуемых соединений в клеточной линии уротелиального рака человека SW780. Клетки SW780 содержали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219), добавляли 100 мкл суспензии клеток SW780, доведенной до концентрации, составляющей  $3 \times 10^4$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). На следующий день 100 мкл соединения (1) или галихондрин В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Рассчитывали концентрации исследуемых

соединений, необходимые для ингибирования роста клеток на 50% (т.е. значение  $IC_{50}$ ), и они показаны в таблице 16.

Таблица 16

Исследуемое соединение	SW780
	( $IC_{50}$ (нМ))
Галихондрин В	0,032
Соединение (1)	0,017

Пример фармакологического испытания 27. Анализ ингибирования роста HS-SY-II

[0001] В этом анализе измеряли ингибирующие рост активности исследуемых соединений в клеточной линии синовиальной саркомы человека HS-SY-II. Клетки HS-SY-II содержали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, пенициллин и стрептомицин в инкубаторе с 5%  $CO_2$  (37 °C). В каждую лунку 96-луночного планшета (Becton, Dickinson and Company, 353219) добавляли 100 мкл суспензии клеток HS-SY-II, доведенной до концентрации, составляющей  $3 \times 10^4$  клеток/мл, с помощью среды для культивирования, и клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5%  $CO_2$  (37 °C). На следующий день 100 мкл соединения (1) или галихондрина В в серии трехкратных разбавлений, суспендированных в среде для культивирования, добавляли в каждую лунку, и полученный продукт инкубировали в течение 3 дней в инкубаторе с 5%  $CO_2$  (37 °C). Затем жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo<sup>®</sup> (Promega) с помощью многоканального устройства для прочтения EnVision 2103 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Значение лунок, содержащих клетки без добавления исследуемых соединений, определяли как 100% и значение лунок, не содержащих клетки, определяли как 0%. Рассчитывали концентрации исследуемых соединений, необходимые для ингибирования роста клеток на 50% (т.е. значение  $IC_{50}$ ), и они показаны в таблице 17.

Таблица 17

Исследуемое соединение	HS-SY-II
	( $IC_{50}$ (нМ))
Галихондрин В	0,010
Соединение (1)	0,002

### Эквиваленты и объем

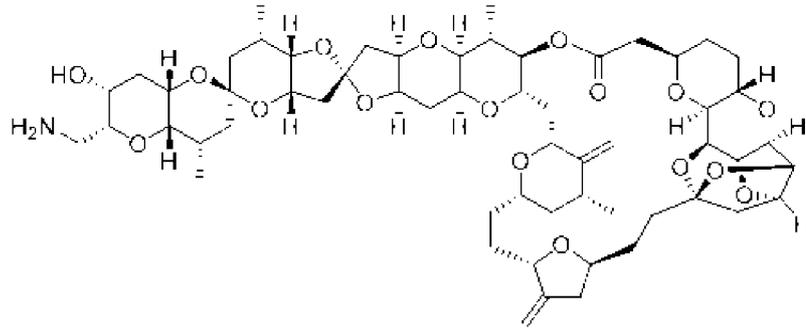
**[0002]** В формуле изобретения формы единственного числа могут означать один или более чем один, если не указано иное или иное не очевидно из контекста. Пункты формулы или описания, которые включают в себя “или” между одним или несколькими представителями группы, считаются выполнимыми, если один, более одного или все представители группы присутствуют, использованы или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если не указано иное или иным образом не очевидно из контекста. Изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует, использован или иным образом относится к данному продукту или процессу. Настоящее изобретение включает в себя варианты осуществления, в которых более одного или все представители группы присутствуют, использованы или иным образом относятся к данному продукту или процессу.

**[0003]** Кроме того, изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько признаков, элементов, частей формулы изобретения и описательных выражений из одного или нескольких перечисленных пунктов формулы изобретения введены в другой пункт формулы изобретения. Например, любой пункт формулы, который зависит от другого пункта формулы, можно модифицировать, чтобы включить одно или несколько признаков, обнаруженных в любом другом пункте формулы, который зависит от того же основного пункта формулы. Когда элементы представлены в виде перечней, например, в формате группы Маркуша, также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой(ые) элемент(ы) может(могут) быть удален(ы) из группы. Следует понимать, что, в общем, когда настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения упоминаются как включающие в себя конкретные элементы и/или признаки, определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или состоят по существу из таких элементов и/или признаков. В целях простоты эти варианты осуществления не были конкретно изложены в тех же выражениях в настоящем документе. Также отмечается, что, как подразумевается, термины “включающий в себя” и “содержащий” являются открытыми и допускают включение в себя дополнительных элементов или стадий. Там, где указаны диапазоны, включены и конечные точки. Кроме того, если иное не указано или не очевидно из контекста и понимания специалиста в настоящей области техники, значения, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления настоящего изобретения с точностью до десятых нижней границы диапазона, если контекст явно не предписывает иное.

**[0004]** Специалисты в настоящей области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Объем настоящих вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, не предназначен для ограничения приведенным выше описанием, а является таким, как изложено в прилагаемой формуле изобретения. Специалистам в настоящей области техники понятно, что различные изменения и модификации этого описания можно осуществить без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения, как определено в приведенной ниже формуле изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1, или его фармацевтически приемлемую соль, в фармацевтически приемлемом носителе.
3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 для применения в ингибировании роста опухоли или рака, характеризующихся ангиогенезом, инвазией или метастазированием.
4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 для применения при лечении опухоли или рака, характеризующихся ангиогенезом, инвазией или метастазированием.
5. Соединение для применения по п. 3 или 4, причем рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи, рак молочной железы, рак пищевода, рак матки, рак яичника, рак толстой и прямой кишки, рак эндометрия, рак желудка, рак тонкой кишки, рак мочевого пузыря или саркому.
6. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи.
7. Соединение для применения по п. 6, причем рак или опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).

8. Соединение для применения по п. 6, причем рак представляет собой аденокистозную карциному.
9. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак молочной железы.
10. Соединение для применения по п. 9, причем рак или опухоль представляет собой HER2-позитивный рак молочной железы.
11. Соединение для применения по п. 9, причем рак или опухоль представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.
12. Соединение для применения по п. 9, причем рак или опухоль представляет собой трижды негативный рак молочной железы.
13. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак толстой и прямой кишки.
14. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак пищевода.
15. Соединение для применения по п. 14, причем рак или опухоль представляет собой аденокарциному пищевода.
16. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак матки.
17. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак яичника.
18. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой саркому.

19. Соединение для применения по п. 18, причем рак или опухоль представляет собой саркому матки, фибросаркому, синовиальную саркому, саркому мягких тканей или ангиосаркому.
20. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак желудка.
21. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак тонкой кишки.
22. Соединение для применения по п. 21, причем рак или опухоль представляет собой аденокарциному тонкой кишки.
23. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой рак мочевого пузыря.
24. Соединение для применения по п. 5, причем рак или опухоль представляет собой уротелиальный рак.
25. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с антителом к белку 1 программируемой смерти (PD-1).
26. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с антителом к белку L1 программируемой смерти (PD-L1).
27. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с антителом к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).
28. Соединение для применения по п. 27, причем антитело к EGFR представляет собой моноклональное антитело к EGFR.
29. Соединение для применения по п. 27 или 28, причем рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи.

30. Соединение для применения по п. 29, причем рак или опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).
31. Соединение для применения по любому из пп. 28-30, причем моноклональное антитело к EGFR представляет собой цетуксимаб.
32. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с антителом к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека).
33. Соединение для применения по п. 32, причем антитело к HER2 представляет собой моноклональное антитело к HER2.
34. Соединение для применения по п. 32 или 33, причем рак представляет собой рак молочной железы.
35. Соединение для применения по п. 33 или 34, причем моноклональное антитело к HER2 представляет собой трастузумаб.
36. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с лучевой терапией.
37. Соединение для применения по любому из пп. 4-24 для применения в комбинации с операцией.
38. Способ лечения опухоли или рака, характеризующихся ангиогенезом, инвазией или метастазированием, у субъекта, предусматривающий введение субъекту соединения по п. 1, или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе.
39. Способ по п. 38, при котором рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи, рак молочной железы, рак пищевода, рак матки, рак яичника, рак толстой и прямой кишки, рак эндометрия, рак желудка, рак тонкой кишки, рак мочевого пузыря или саркому.
40. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи.

41. Способ по п. 40, при котором рак или опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).

42. Способ по п. 40, при котором рак представляет собой аденокистозную карциному.

43. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак молочной железы.

44. Способ по п. 43, при котором рак или опухоль представляет собой HER2-позитивный рак молочной железы.

45. Способ по п. 43, при котором рак или опухоль представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.

46. Способ по п. 43, при котором рак или опухоль представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

47. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак толстой и прямой кишки.

48. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак пищевода.

49. Способ по п. 48, при котором рак или опухоль представляет собой аденокарциному пищевода.

50. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак матки.

51. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак яичника.

52. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой саркому.

53. Способ по п. 52, при котором рак или опухоль представляет собой саркому матки, фибросаркому, синовиальную саркому, саркому мягких тканей или ангиосаркому.
54. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак желудка.
55. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак тонкой кишки.
56. Способ по п. 55, при котором рак или опухоль представляет собой аденокарциному тонкой кишки.
57. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой рак мочевого пузыря.
58. Способ по п. 39, при котором рак или опухоль представляет собой уротелиальный рак.
59. Способ по любому из пп. 39-58, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью антитела к белку 1 программируемой смерти (PD-1).
60. Способ по любому из пп. 39-58, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью антитела к белку L1 программируемой смерти (PD-L1).
61. Способ по любому из пп. 39-58, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью антитела к EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).
62. Способ по п. 61, при котором антитело к EGFR представляет собой моноклональное антитело к EGFR.
63. Способ по п. 61 или 62, при котором рак или опухоль представляет собой рак головы и шеи.
64. Способ по п. 63, при котором рак или опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).

65. Способ по любому из пп. 62-64, при котором моноклональное антитело к EGFR представляет собой цетуксимаб.

66. Способ по любому из пп. 39-58, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью антитела к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека).

67. Способ по п. 66, при котором антитело к HER2 представляет собой моноклональное антитело к HER2.

68. Способ по п. 66 или 67, при котором рак представляет собой рак молочной железы.

69. Способ по п. 67 или 68, при котором моноклональное антитело к HER2 представляет собой трастузумаб.

70. Способ лечения HER2-негативного рака молочной железы или плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) у субъекта, предусматривающий введение субъекту соединения по п. 1, или его фармацевтически приемлемой соли.

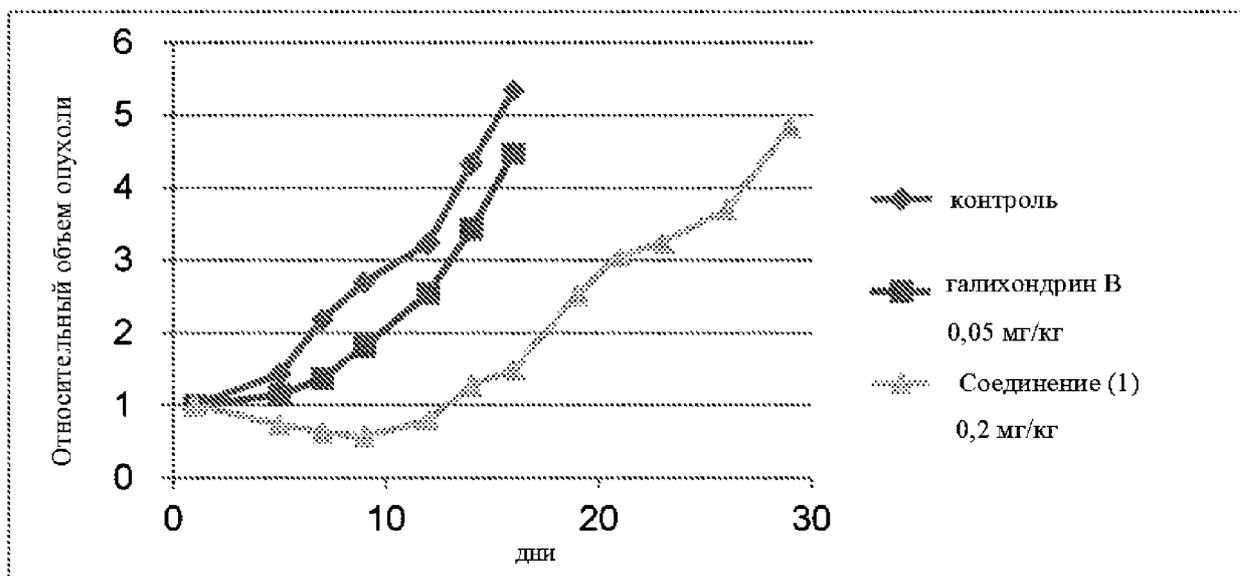
71. Способ по любому из пп. 39-70, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью лучевой терапии.

72. Способ по любому из пп. 39-71, дополнительно предусматривающий лечение субъекта с помощью операции.

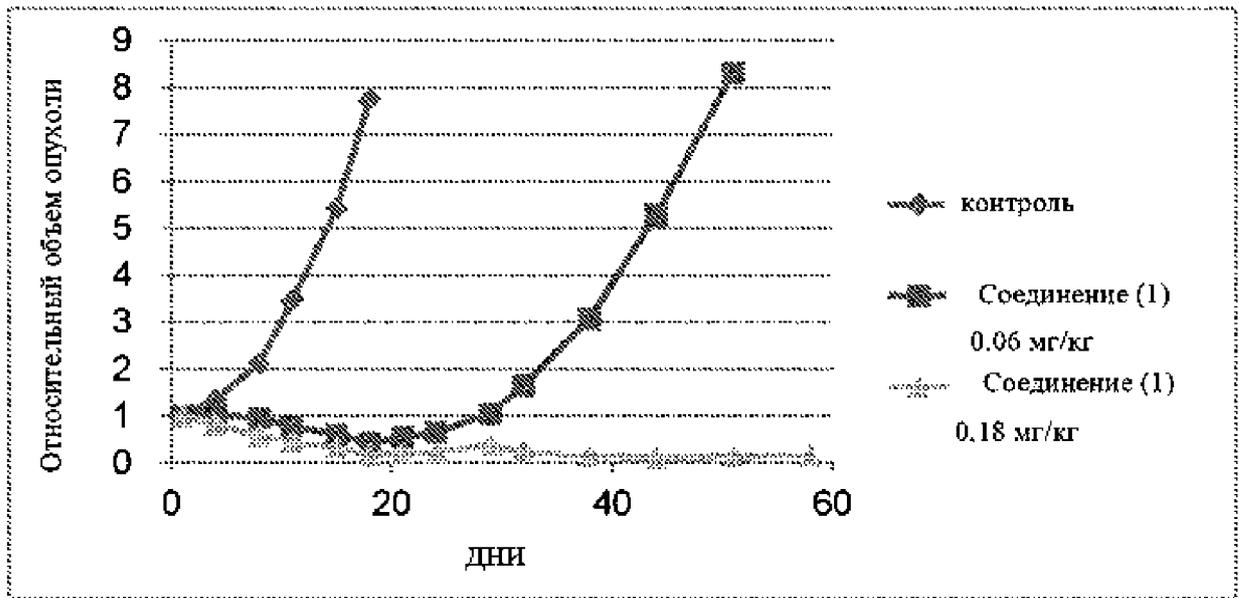
73. Способ по любому из пп. 39-72, при котором субъект представляет собой человека.

74. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п. 1 для производства лекарственного средства для ингибирования роста опухоли или рака, характеризующихся ангиогенезом, инвазией или метастазированием.

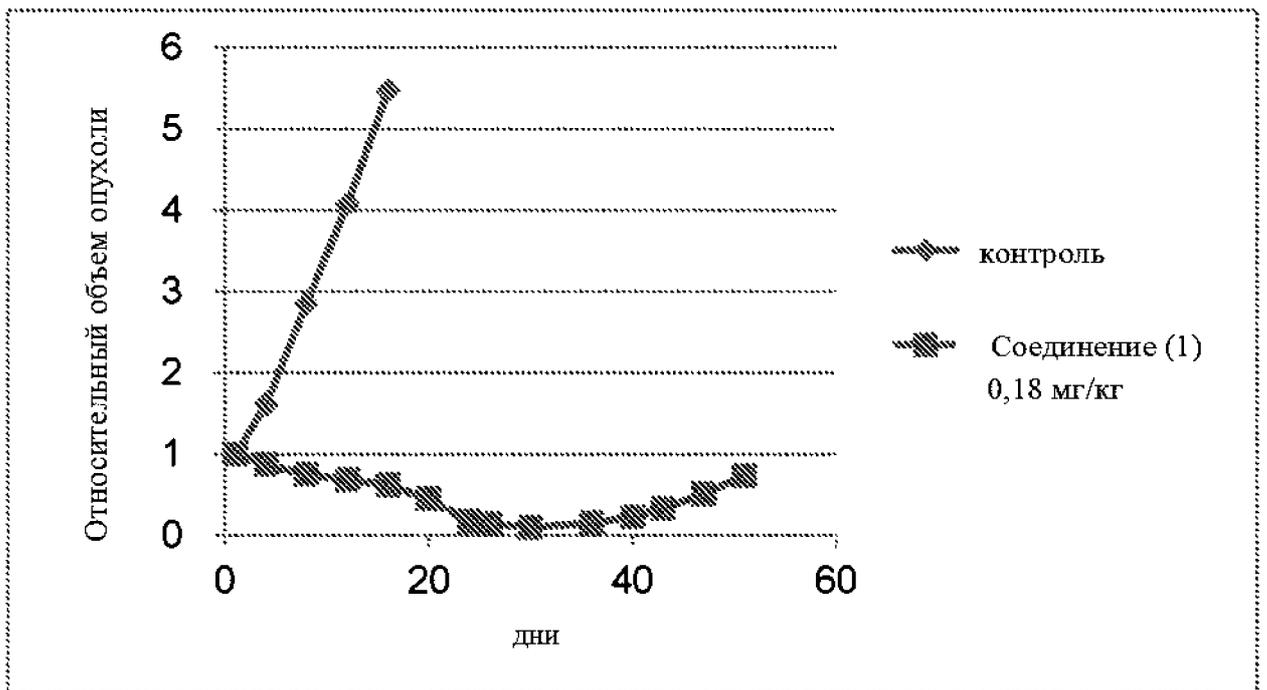
75. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п. 1 для производства лекарственного средства для лечения опухоли или рака, характеризующихся ангиогенезом, инвазией или метастазированием.



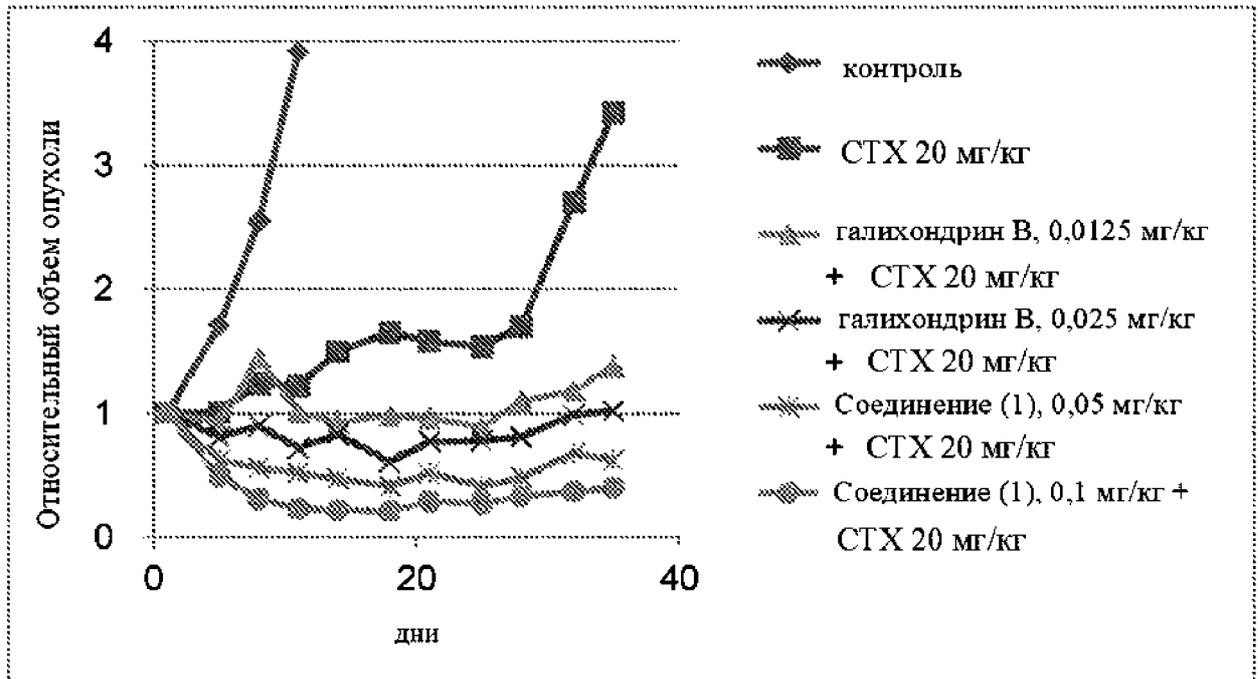
ФИГУРА 1



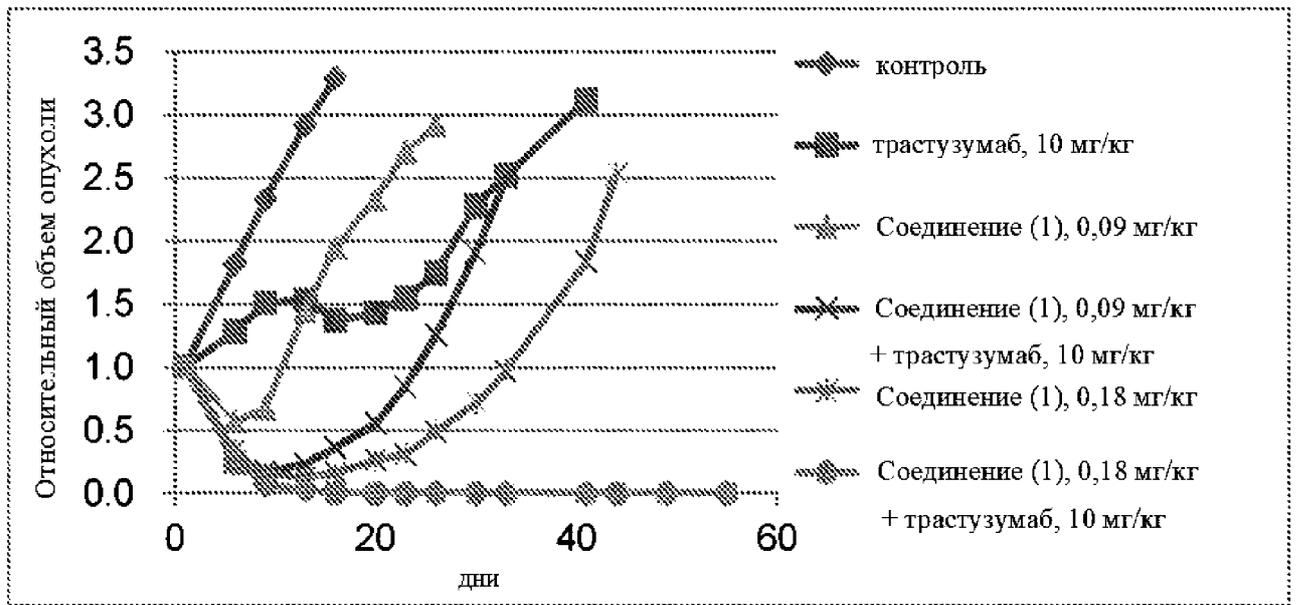
ФИГУРА 2



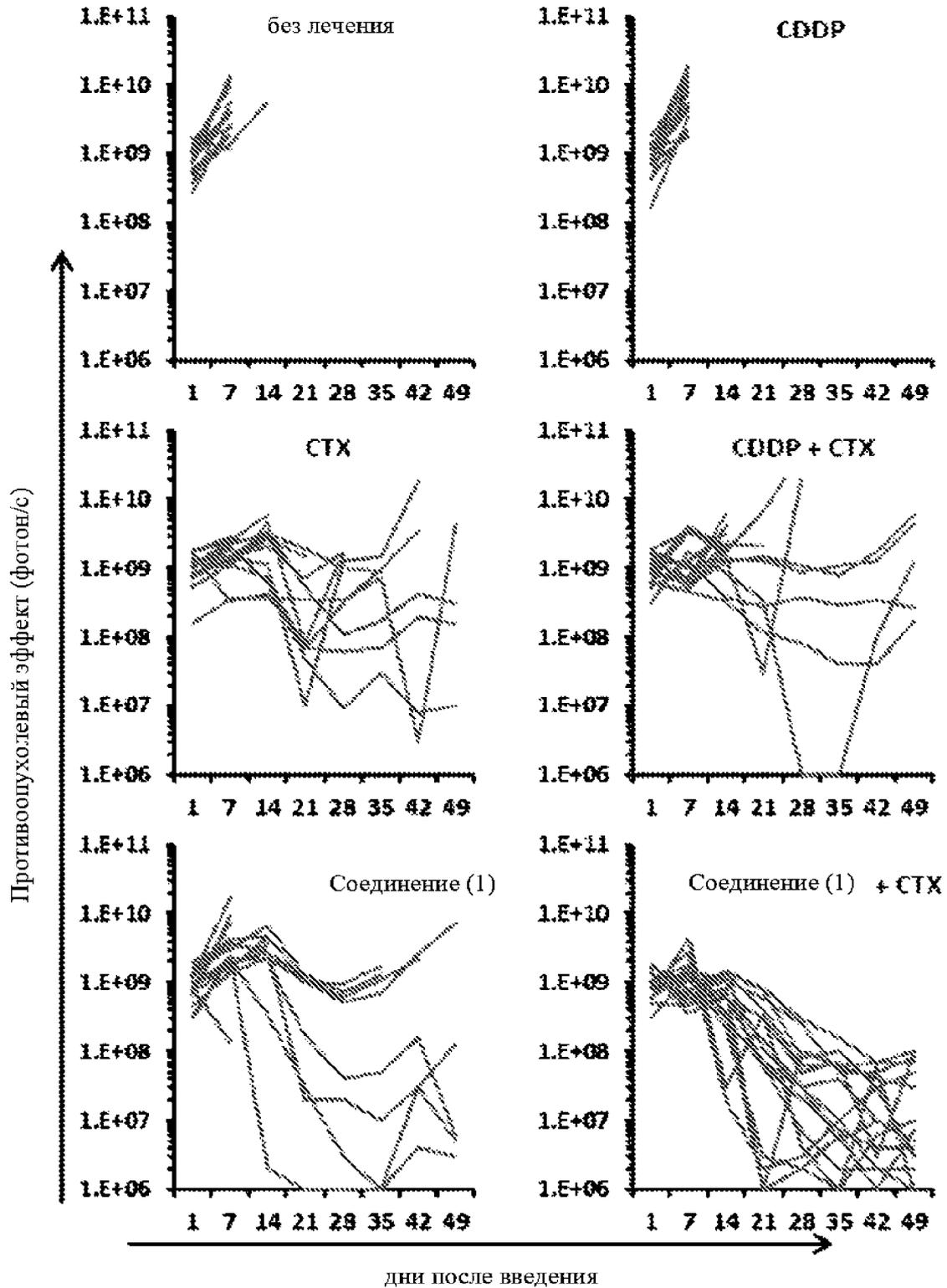
ФИГУРА 3



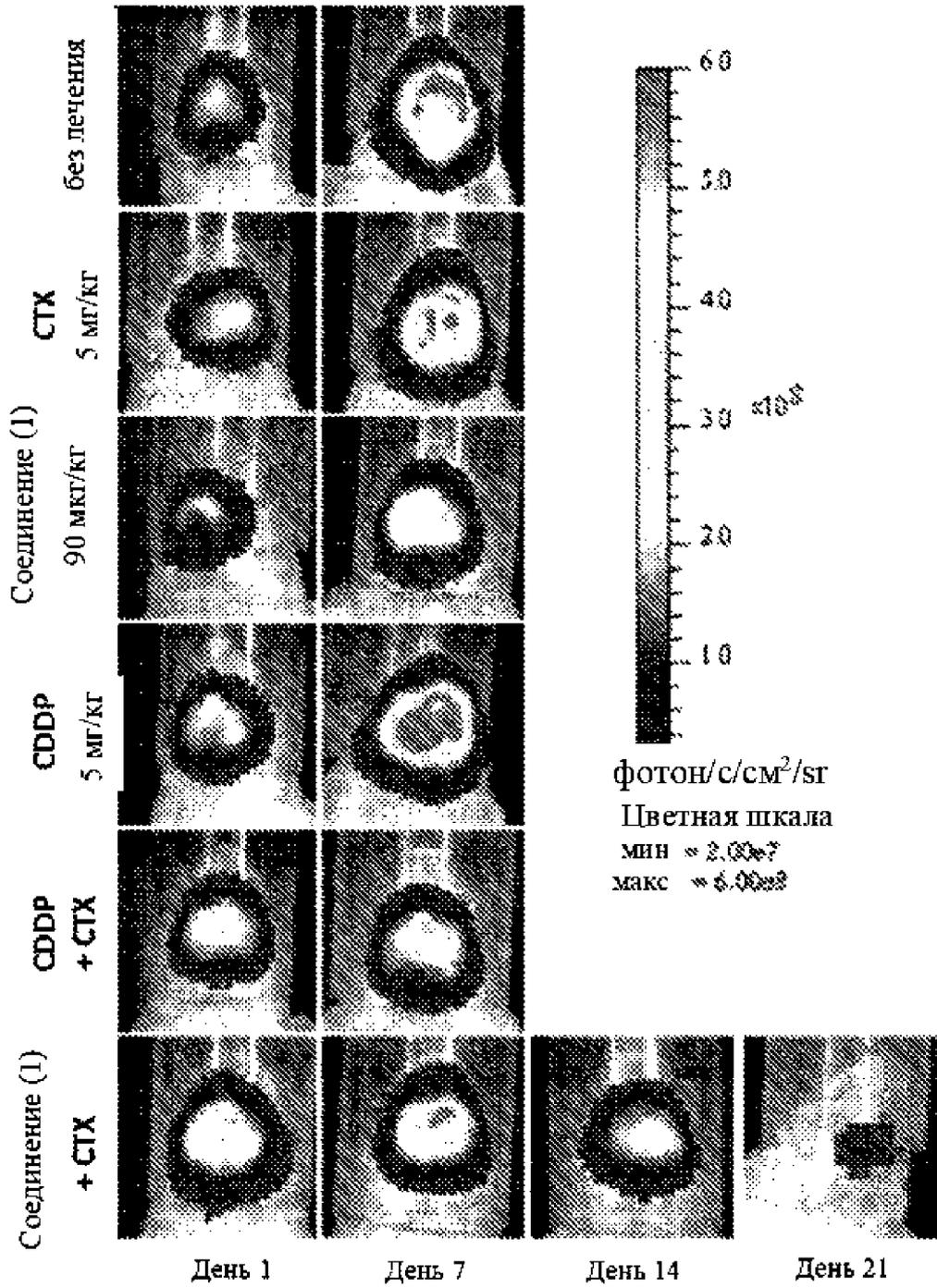
ФИГУРА 4



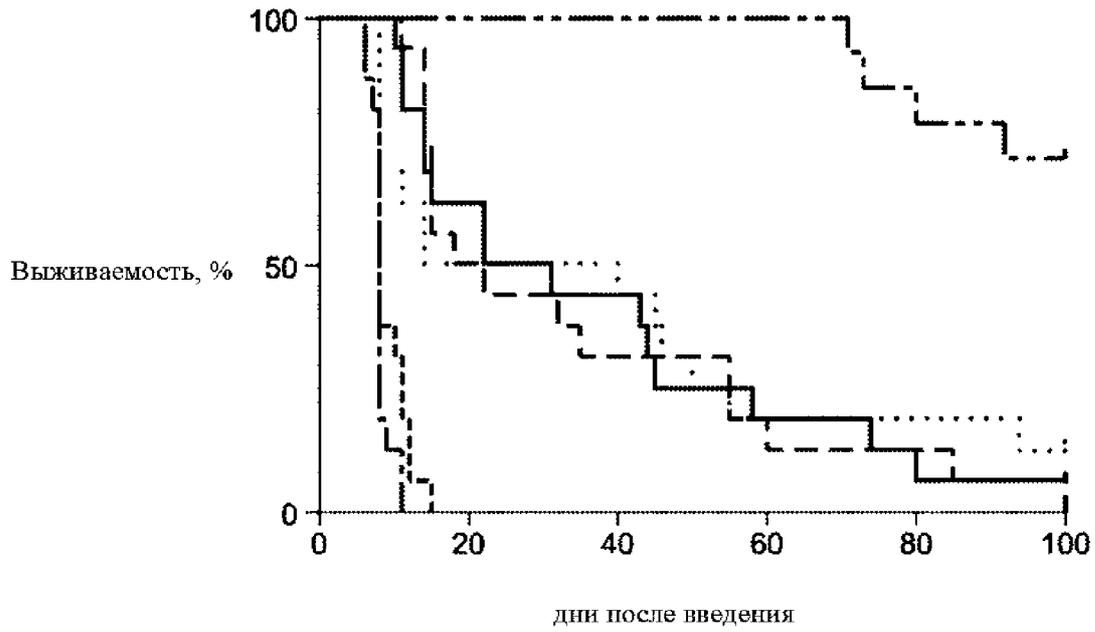
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6А

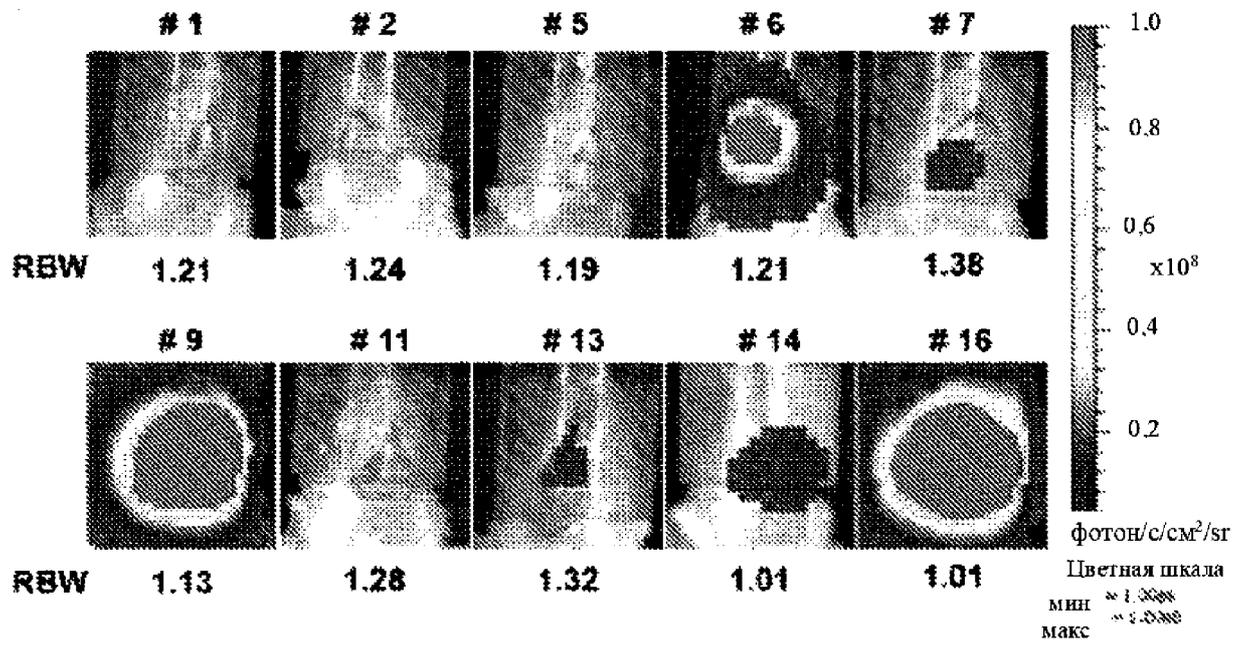


ФИГУРА 6В

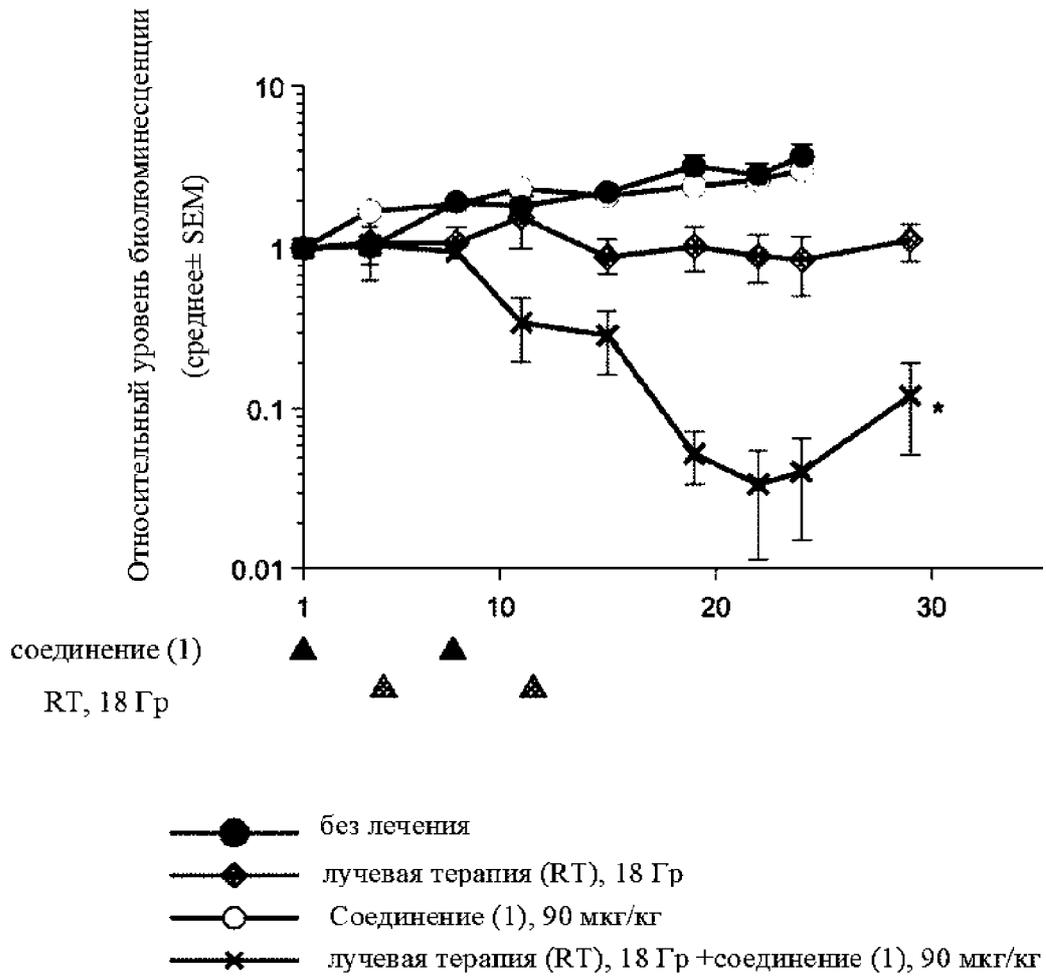


- без лечения
- CTX 5 мг/кг
- ..... Соединение (1), 90 мкг/кг
- CDDP 5 мг/кг
- Соединение (1), 90 мкг/кг + CTX 5 мг/кг
- CDDP 5 мг/кг + CTX 5 мг/кг

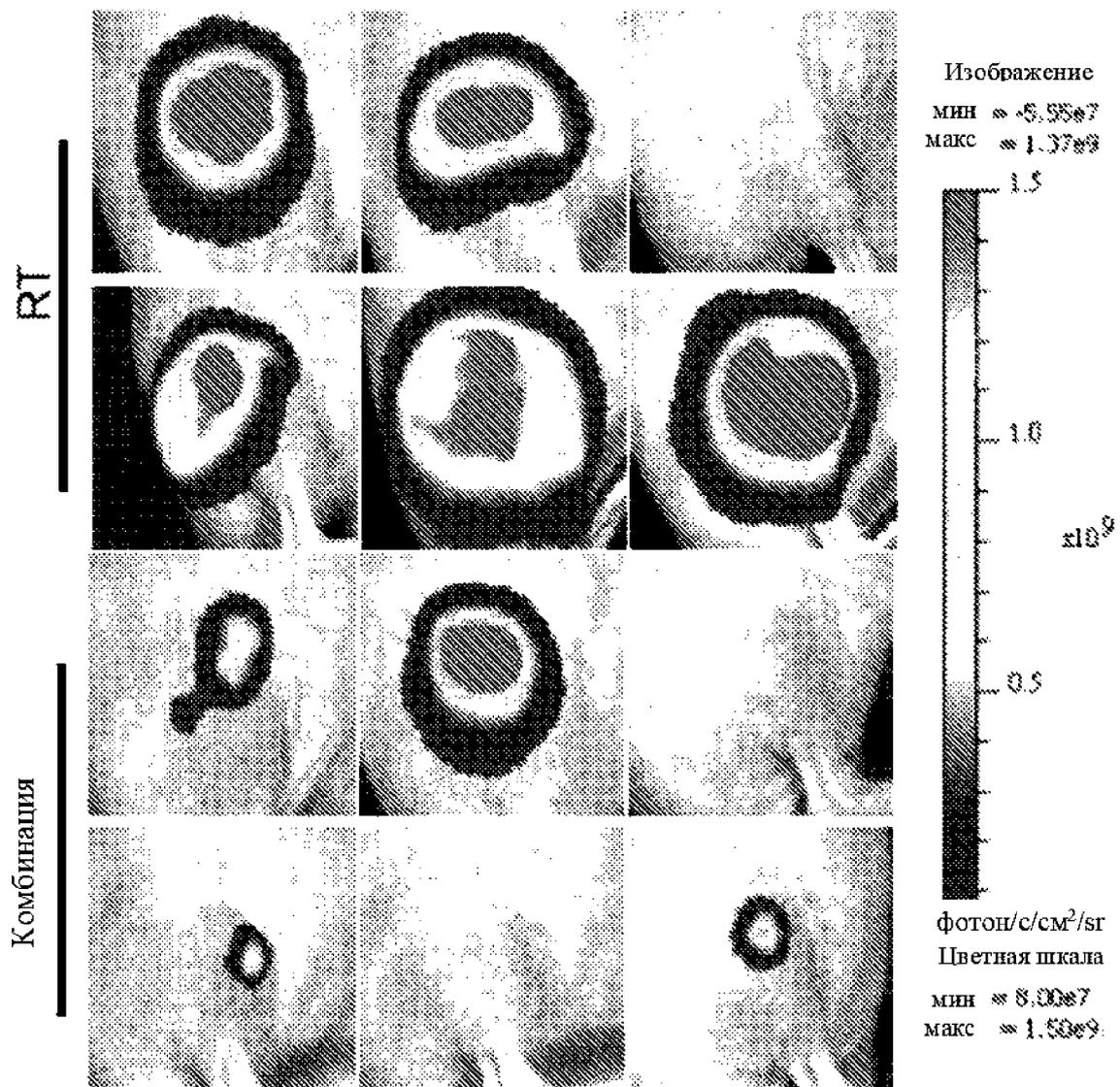
ФИГУРА 7А



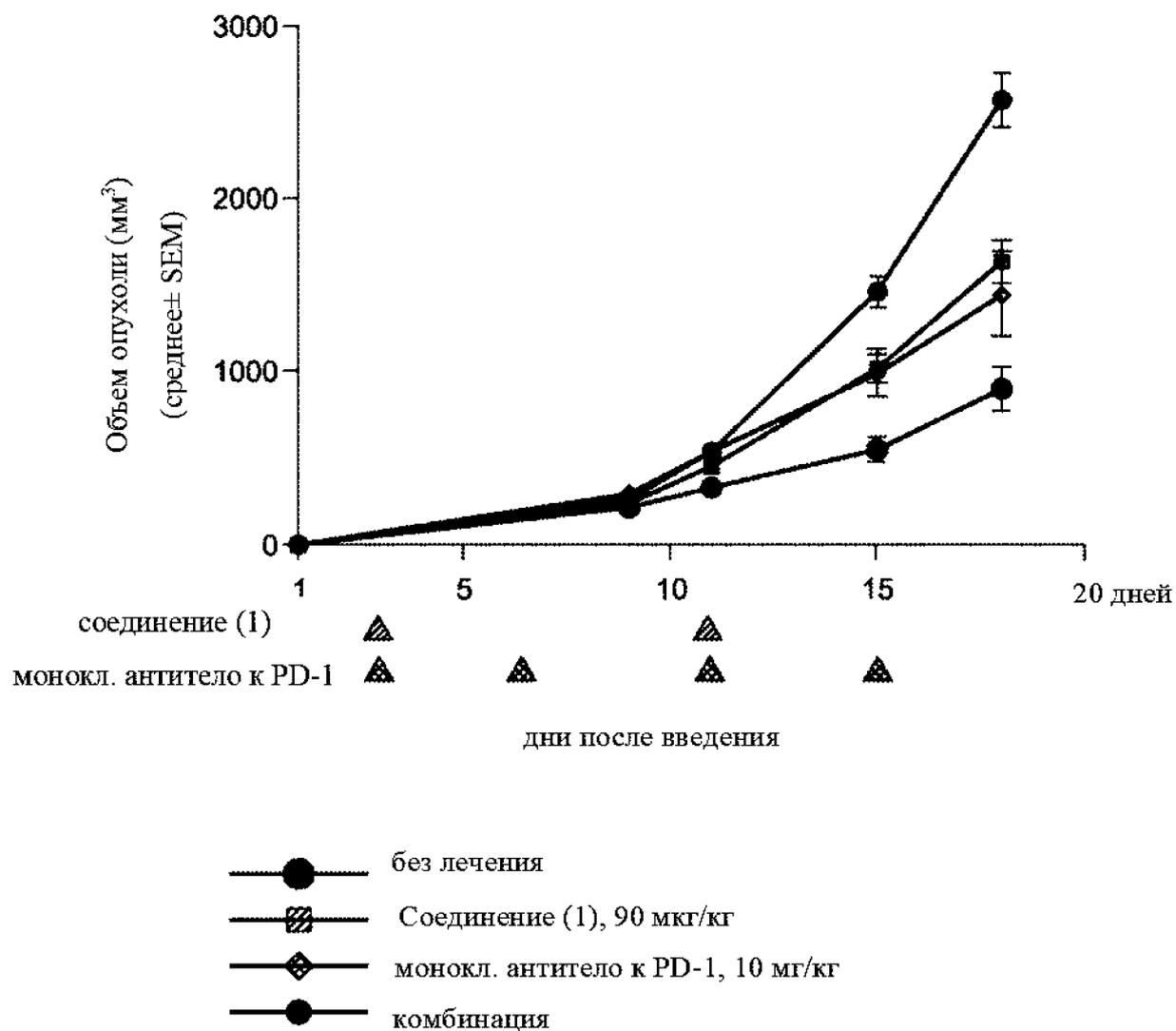
ФИГУРА 7В



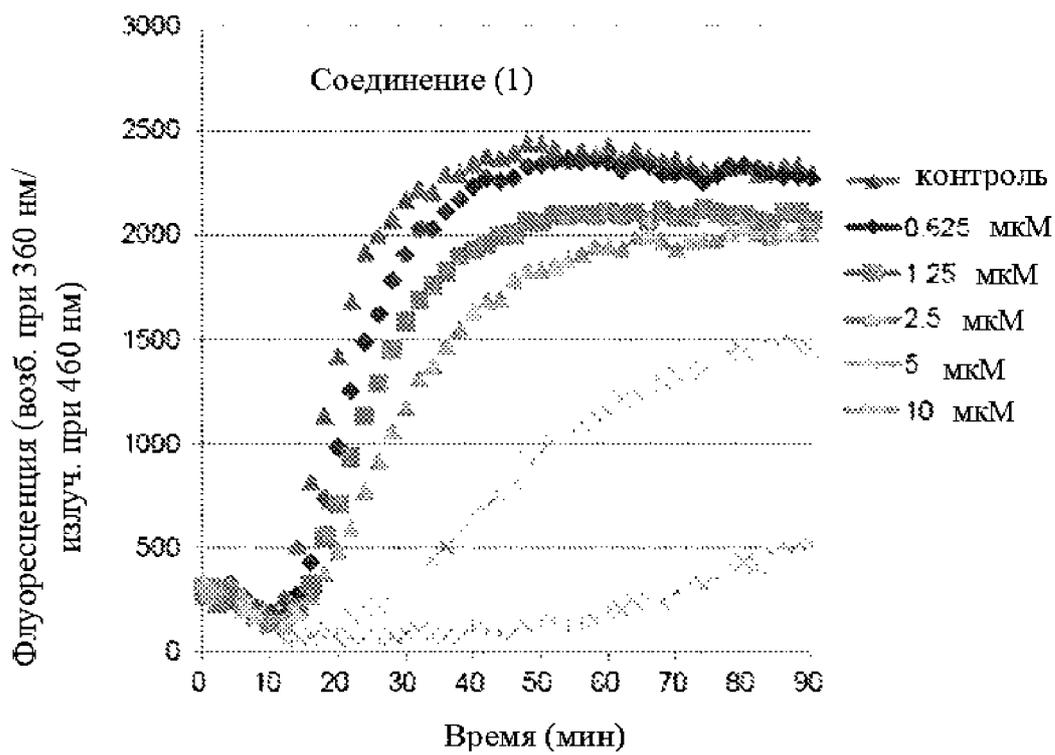
ФИГУРА 8А



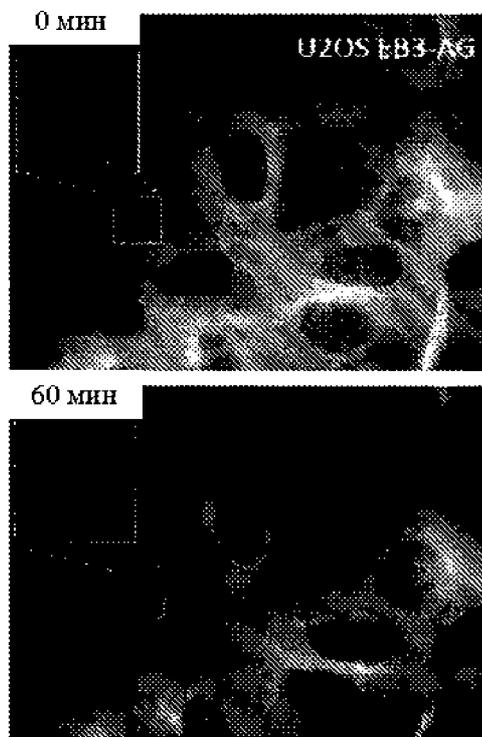
ФИГУРА 8В



ФИГУРА 9



ФИГУРА 10А

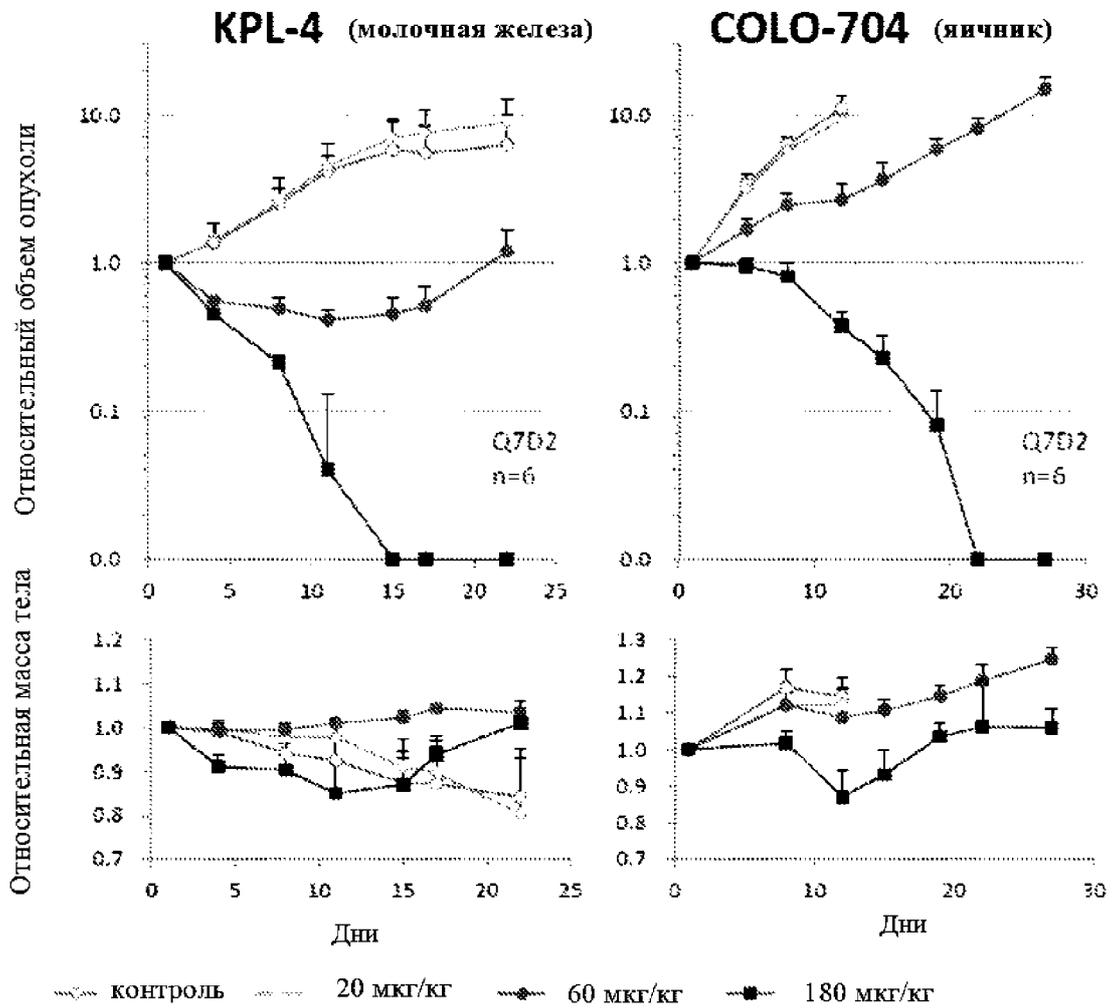
Соединение (1) 0,5 нМ ( $IC_{50}$ )

ФИГУРА 10В

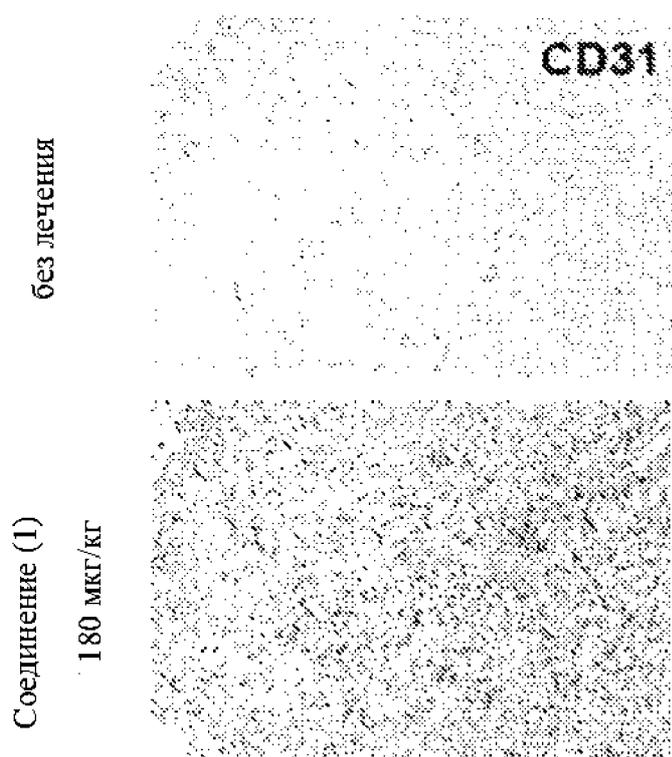
**In vitro** ингибирование роста клеток IC<sub>50</sub> (нМ)

Соединение	рак пищевода			саркома матки		Восприимчивость к Р-гр
	OE21	OE33	TE-8	MES-SA	MES-SA/Dx5-Rx1	
Соединение (1)	0.061	0.28	0.095	0.070	0.7	123

ФИГУРА 11

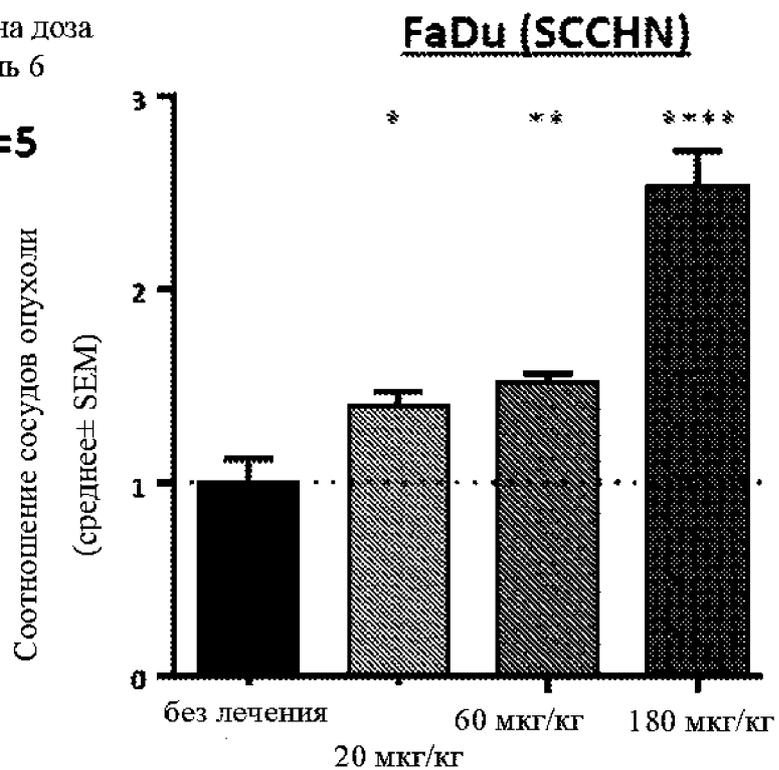


ФИГУРА 12

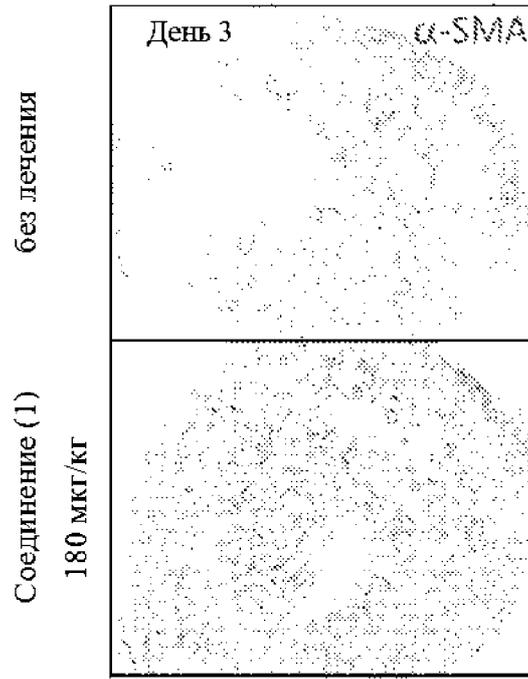
**FaDu (SCCHN)**

Одна доза  
День 6

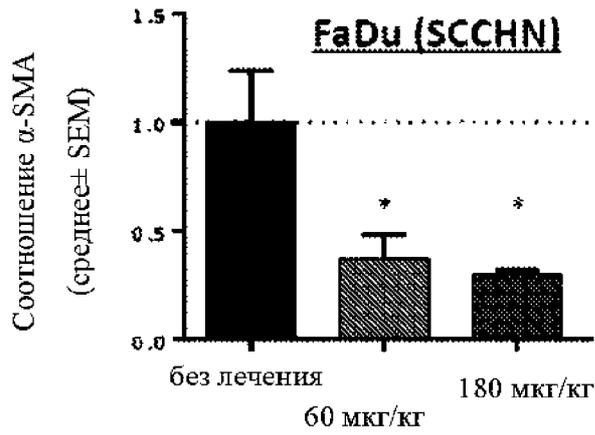
**n=5**



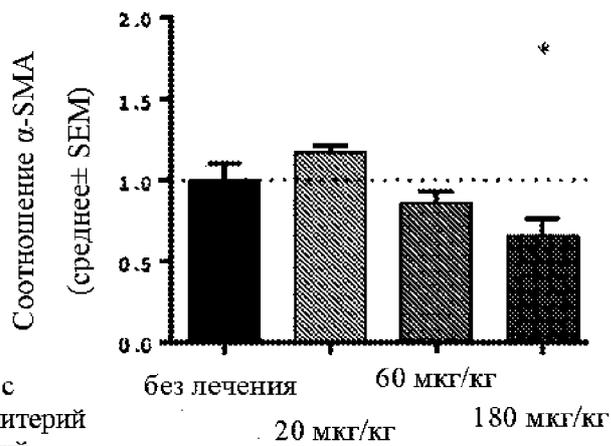
**ФИГУРА 13**



Одна доза  
День 3  
n=5



День 6



\*  $P < 0,05$  по сравнению с отсутствием лечения (критерий множественных сравнений Даннетта)

\*\*  $P < 0,01$  по сравнению с отсутствием лечения (t-критерий для независимых выборок)

ФИГУРА 14

**FaDu  
(SCCHN)**

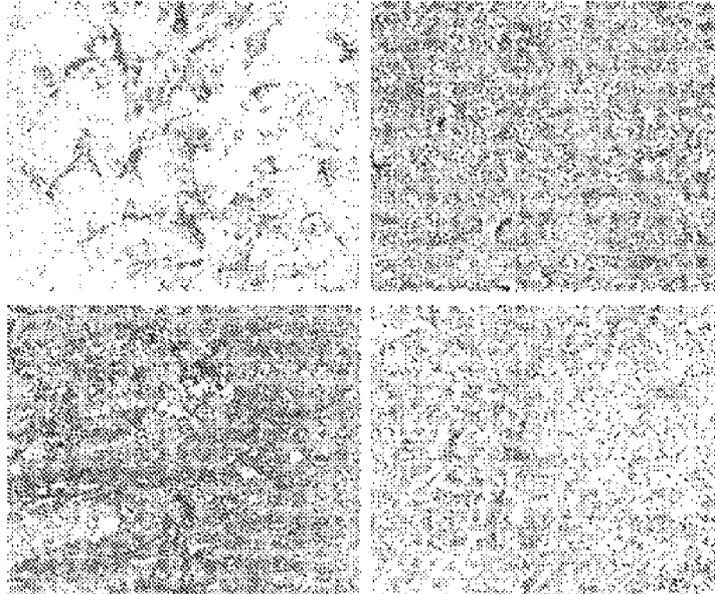
Одна доза  
День 6

Тенацин-С

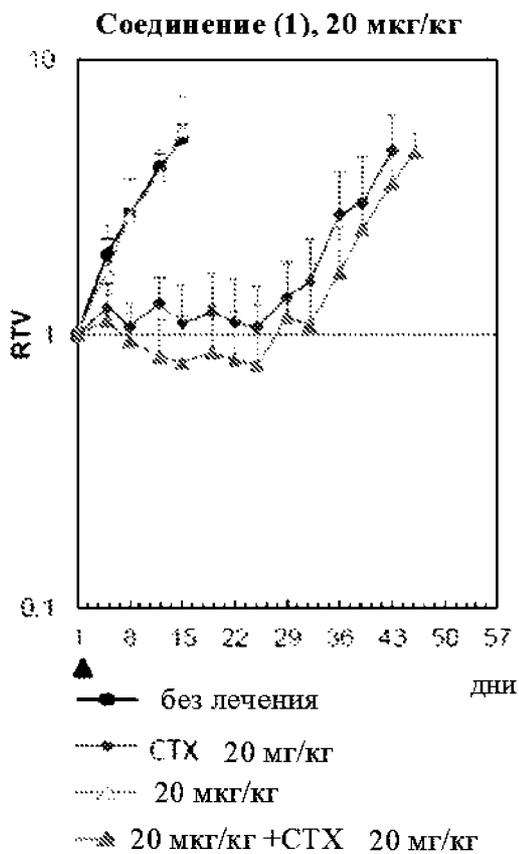
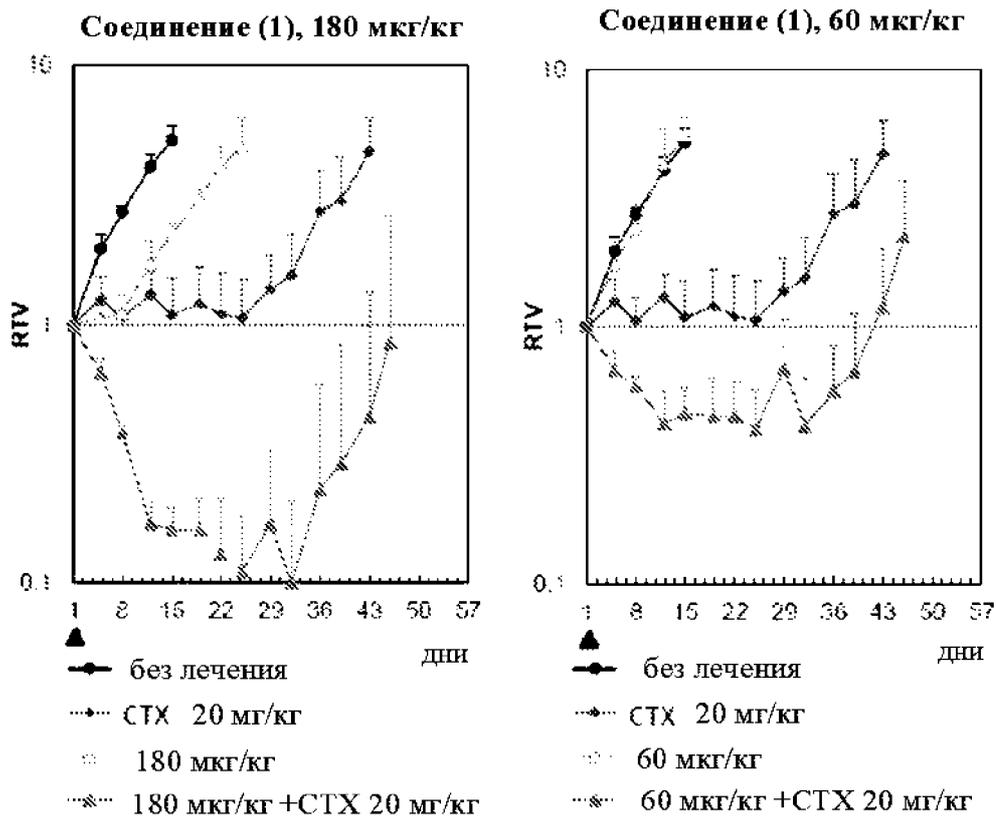
EDA-фибронектин

контроль

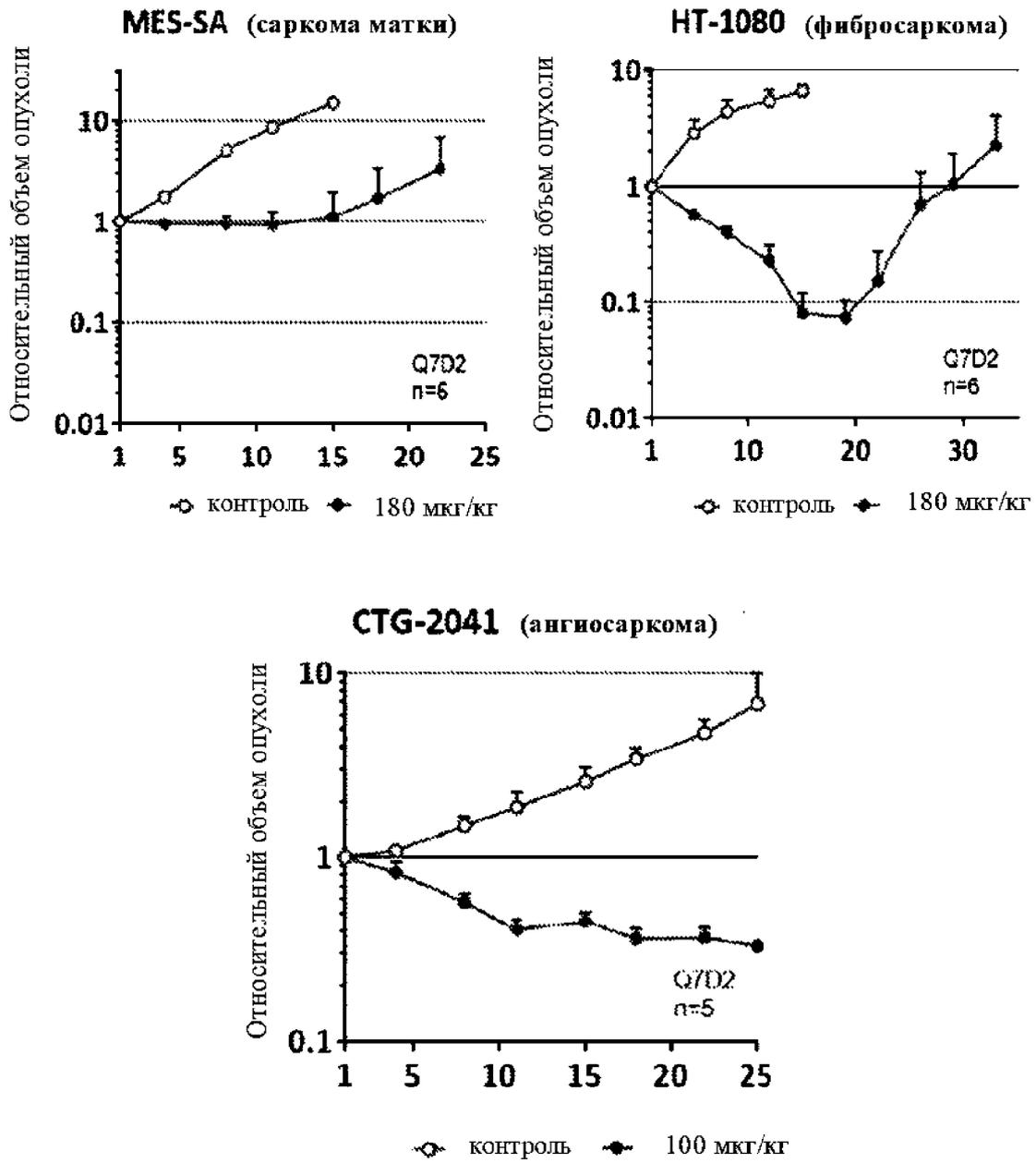
Соединение (1), 180 мкг/кг  
+цетуксимаб



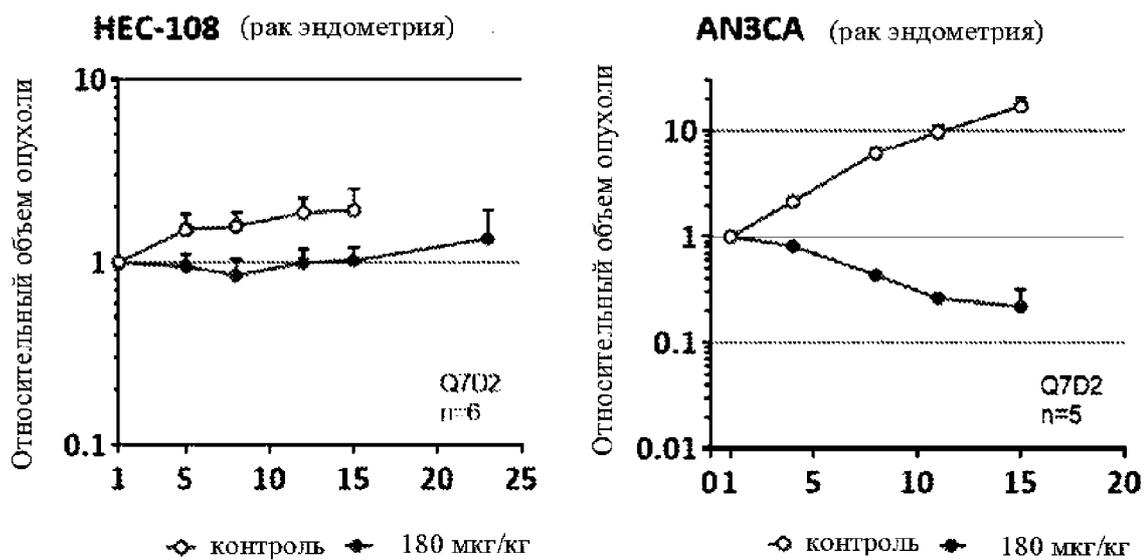
**ФИГУРА 15**



ФИГУРА 16



ФИГУРА 17



ФИГУРА 18