

發明專利說明書

200303196

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： P11330 26 ※IPC 分類： A61K 31/351

※ 申請日期： P1.11.11 2010-3-9/28

壹、發明名稱

(中文) 新穎化學化合物及其用途

(英文) NOVEL CHEMICAL COMPOUNDS AND THEIR USE

貳、發明人 (共 5 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 安卓 麥可蒙 瑪森

(英文) ANDREW MCM MASON

住居所地址：(中文) 英國赫福德雪爾郡史蒂芬局市吉尼伍路二棟 2T177

(英文) 2T177, BUILDING 2, GUNNELS WOOD ROAD,

STEVENAGE, HERTFORDSHIRE SG1 2NY,

UNITED KINGDOM

國籍：(中文) 英國 (英文) UNITED KINGDOM

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 澳大利亞商拜歐塔科學管理公司

(英文) BIOTA SCIENTIFIC MANAGEMENT PTY LTD.

住居所或營業所地址：(中文) 澳洲維多利亞省墨爾本市聖凱達路 616 號

(英文) 616 ST KILDA ROAD, MELBOURNE VIC 3004,

AUSTRALIA

國籍：(中文) 澳大利亞 (英文) AUSTRALIA

代表人：(中文) 安德魯 麥克當勞

(英文) ANDREW MACDONALD

發明人 2

姓名：(中文) 史蒂芬 E 雪恩漢

(英文) STEPHEN E. SHANAHAN

住居所地址：(中文) 英國赫福特雪爾郡史蒂芬局市吉尼伍路葛蘭素史密斯

二棟 2S110

(英文) 2S110, BUILDING 2, GSK, GUNNELS WOOD ROAD,

STEVENAGE, HERTFORDSHIRE SG1 2NY,

UNITED KINGDOM

國籍：(中文) 英國

(英文) UNITED KINGDOM

發明人 3

姓名：(中文) 赫狄 T 強尼斯

(英文) HAYDN T JONES

住居所地址：(中文) 英國赫福特雪爾郡史蒂芬局市吉尼伍路葛蘭素史密斯

二棟 2S110

(英文) 2S110, BUILDING 2, GLAXOSMITHKLINE, GUNNELS

WOOD ROAD, STEVENAGE, HERTFORDSHIRE SG1 2NY,

UNITED KINGDOM

國籍：(中文) 英國

(英文) UNITED KINGDOM

發明人 4

姓名：(中文) 賽門 J F 麥可當那

(英文) SIMON J F MACDONALD

住居所地址：(中文) 英國赫福特雪爾郡史蒂芬局市吉尼伍路葛蘭素史密斯二棟

(英文) BUILDING 2, GSK, GUNNELS WOOD ROAD,

STEVENAGE, HERTFORDSHIRE SG1 2NY,

UNITED KINGDOM

國籍：(中文) 英國

(英文) UNITED KINGDOM

發明人 5

姓名：(中文) 狄克 A 狄曼尼

(英文) DEREK A DEMAINE

住居所地址：(中文) 英國赫福特雪爾郡史蒂芬局市吉尼伍路葛蘭素史密斯

二棟 2S110

(英文) 2S110, BUILDING 2, GLAXO SMITH KLINE, GUNNELS

WOOD ROAD, STEVENAGE, HERTFORDSHIRE SG1 2NY,

UNITED KINGDOM

國籍：(中文) 英國

(英文) UNITED KINGDOM

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為：_____

☒ 本案已向下列國家(地區)申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家(地區)；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 澳大利亞；2001 年 11 月 09 日；PR8797

2. _____

3. _____

☒ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；日期；案號 順序註記】

1. 澳大利亞；2001 年 11 月 09 日；PR8797

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 國外微生物 【格式請依：寄仔國名，機構，日期，號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

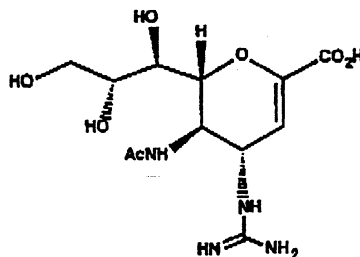
本發明係關於新穎化學化合物和其於藥物之用途。特別而言，本發明係關於新穎二聚體化合物、其製備方法、其醫藥調配物和其作為抗病毒劑之用途。

發明背景

在許多微生物中存在能夠從其它碳水化合物裂解N-乙醯基神經胺酸[NANA](亦已知為唾液酸)的酶。這些包括細菌(如霍亂弧菌、產氣莢膜梭菌、肺炎鏈球菌和關節菌屬Sialophilus)和病毒(如流行性感感冒病毒、副流行性感感冒病毒、流型性腮腺炎病毒、新城症病毒和仙台病毒。這些病毒中大多數是原黏液病毒或副黏液病毒群組，並帶動病毒粒子表面上的神經胺酸酶活性。許多這些具有神經胺酸酶的有機物是人類及/或動物的主要病原體，而且一些(如流行性感感冒病毒和新城症病毒)引起非常重要的疾病。

吾人頃長期認為神經胺酸酶抑制劑可能藉由載神經胺酸酶病毒而預防感染。大部份已知的神經胺酸酶抑制劑是神經胺酸類似物(如2-去氧-2,3-去氫-N-乙醯基神經胺酸(DANA))和一些其衍生物(Meindl等人，Virology, 1974 58 457)。吾等之國際專利公告第WO 91/16320號敘述許多對於抗病毒神經胺酸酶具活性之DANA類似物，且該專利特別展示4-胍基-2-去氧-2,3-去氫-N-乙醯基神經胺酸(化合物(A)，編號GG167)有用於治療流行性感感冒A和B(N. Engl. J. Med., 1997 337 874-880)。其它專利申請案敘述各種非常相關之唾液酸衍生物(例如PCT公告第WO 95/18800、WO 95/20583和WO 98/06712號)，亦頃敘述GG167之抗病毒大型分子共軛物(國際專利申請案第

PCT/AU97/00771)。



化合物 (A)

Ac表示乙醯基

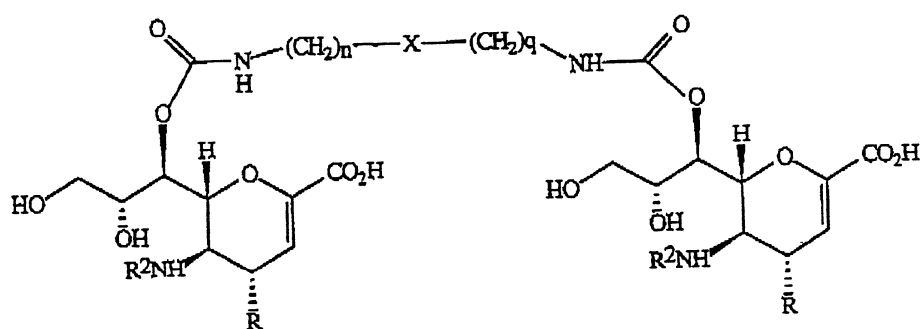
國際專利公告第 WO 00/55149 號敘述二聚合化合物，其包括二個接附於常見間隔基或長度多達 100 個原子之鍵聯基的神經胺酸酶黏合分子(如化合物(A))。

吾等現在已經發現一類新穎化合物，其包括於國際專利公告第 WO 00/55149 號的概括範圍內，但未於其中明確地揭示，並呈現意外有益的抗流行性感冒活性，包括長肺部滯留時間和高效力。

不希望受理論約束，吾人認為在肺中長滯留時間的根據是化合物的大小和分子量，其避免進入通過呼吸上皮細胞緊密接合處且化合物的極性使得非常無效率地通過細胞膜。一個替代原理在於化合物本身與細胞膜的磷脂和呼吸上皮細胞的其它組份交互作用並提高在肺部的滯留時間。

發明摘述

一種通式 (I) 之化合物：



(I)

(其中

R是胺基或胍基；

R²是乙醯基或三氟乙醯基；

n是q為相同或相異，並選自0、1或2；且

X係一種視需要經取代之苯基、視需要經取代之萘基或視需要經取代之苯基-Y-視需要經取代之苯基，其中Y是選自共價鍵、CH₂、CH₂CH₂、O或SO₂，

或是一種其醫藥上可接受之衍生物(限制條件在於，當X是苯基或萘基時，n和q皆是2，以及當X為苯基-Y-苯基，其中Y是共價鍵時，則n和q不均為0)，

R較佳是胍基。

R²較佳是乙醯基。

n和q較佳相同。

X較佳是苯基(其可以經鄰、間或對位取代)、萘基或苯基-Y-苯基，其中各苯環視需要可經烷氧基取代。

用詞「經選擇性取代」表示一種可以或不能被一個或多個被選自以下各項之基進一步取代之基：烷基、烯基、炔基、芳香基、鹵素基、鹵烷基、鹵烯基、鹵炔基、鹵芳基、

含氫氧基的、烷氧基、烯氧基、芳氧基、羧基、苄氧基、鹵烷氧基、鹵烯氧基、鹵芳氧基、硝基、硝烷基、硝烯基、硝炔基、硝芳基、硝雜環基、氮基、亞硝基、胺基、烷胺基、烯胺基、炔胺基、芳胺基、苄胺基、鹽胺基、鹽基、烯鹽基、炔鹽基、芳鹽基、鹽胺基、鹽氧基、醛基、烷磺鹽基、芳磺鹽基、磺鹽胺基、烷磺鹽胺基、芳磺鹽胺基、烷磺鹽氧基、芳磺鹽氧基、雜環基、雜環氧基、雜環胺基、鹵雜環基、烷亞磺鹽基、芳亞磺鹽基、羧烷氧基、碳芳氧基、巰基、磺酸、烷硫基、芳硫基和鹽硫基。

該烷基、烯基、炔基和烷氧基取代基較佳包含多達6個碳原子。

諳熟技藝者將瞭解式(I)之化合物可以在式(I)之化合物的一個或多個官能基中任何一個改質，以提供其醫藥接勝性衍生物。如此衍生物中特別令人感興趣的是在羧積官能、羥基官能或胺基改質之化合物。因此令人感興趣的化合物包括式(I)之化合物的烷基酯類(如甲基、乙基、丙基或異丙基酯)、芳基酯類(如苯基、苯甲鹽基酯類)和乙鹽基酯。

用詞「醫藥上可接受之衍生物」表示式(I)之化合物的醫藥上可接受之鹽類、醚、酯或此類酯之鹽類，或當施藥予接受者時能夠提供式(I)之化合物或醫藥活性代謝物或其殘留物之任何化合物。作為衍生物特別令人有興趣者是在唾液酸羧基或甘油醇羥基，或在胺基及胍基改質之化合物。

式(I)之化合物的醫藥上可接受之鹽類包括從醫藥上可接受之無機和有機酸及鹼衍生者。適當酸的實例包括氫氣

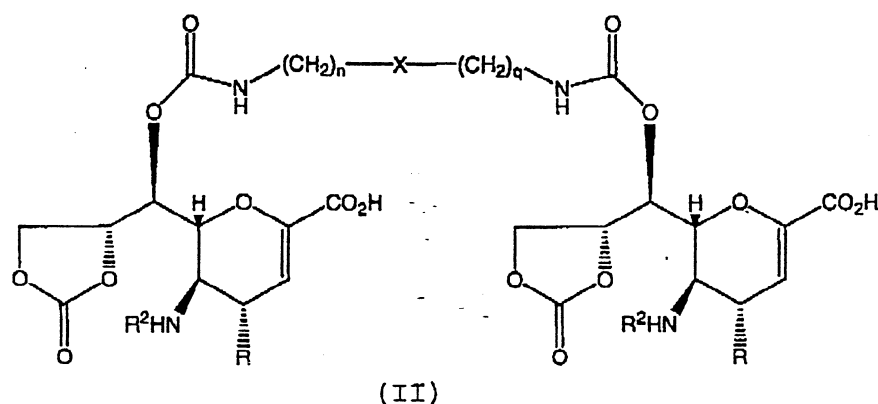
酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、過氯酸、甲酸、順丁烯二酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水楊酸、琥珀酸、甲苯-對-磺酸、酒石酸醋酸、檸檬酸、甲磺酸、甲酸、安息香酸、丙二酸、萘-2-磺酸和苯磺酸。然而其他酸類，如草酸，本身並非醫藥上可接受之，但可以在有用於製備在得到本發明之化合物時作為中間體的鹽類，和其醫藥上可接受之酸加成鹽類。

從適當鹼衍生之鹽類包括鹼金屬(例如鈉)、鹼土金屬(例如鎂)、銨和 NR_4^+ (其中 R 是 C_{1-4} 烷基) 鹽類。

本發明之化合物可以藉此處所述的方法製備。諳熟此藝者將顯而易見，在將單體接附於烷基間隔基的方法期間，需要使用保護基保護神經胺酸酶黏合分子的一個或多個官能基。例如見 T.W. Green 和 P.G.M. Nuts (John Wiley & Sons, 1991) 之「Protective Groups in Organic Synthesis」。式(I)之化合物的醫藥上可接受之鹽類可以根據已知步驟製備。

為了製備和操作簡易性，最好式(I)之化合物是晶體形式。

因此，本發明亦提供一種製備如上所定義般式(I)化合物的方法，其包括將式(II)之化合物去保護的步驟，



其中 R、 R^2 、n、q 和 x 係如上所定義般。

式(I)之化合物具有抗病毒活性。特別而言，這些化合物是原黏液病毒和副黏液病毒的病毒神經胺酸酶抑制劑，例如流行性感冒A和B、副流行性感冒，流行性腮腺炎和新城症(Newcastle disease)的病毒神經胺酸酶。

因此，在第二方面，本發明提供一種式(I)之化合物或其醫藥上可接受之衍生物，供治療病毒感染(例如原黏液病毒和副黏液病毒感染)時作為活性治療劑。

在第三方面，本發明提供一種預防或治療病毒感染的方法，包括將有效量式(I)之化合物或其醫藥上可接受之鹽或衍生物給藥予需要的主體的步驟。

病毒感染較佳是一種原黏液病毒或副黏液病毒感染。該病毒感染更佳是一種流行性感冒A或B感染。

最好該主體是一種動物(如哺乳動物，以人類較佳)或馬屬的一個成員(例如馬、驢或騾)。最佳該哺乳動物是人類。

在第四方面，本發明提供一種本發明之化合物供製造治療病毒感染用藥物之用途。

諳熟此藝者將瞭解，此處引用之治療延伸至預防感染以及治療已建立的感染或症狀。

本發明之化合物亦可以用於診斷方法，特別是用以偵測流行性感冒病毒感染的方法。關於在此類方法的用途，將本發明化合物連結於一種標籤較有利，如放射性、螢光或化學發光的標籤。

在早期申請案PCT/AU97/00109和PCT/AU97/00771中敘述適用本發明之化合物的診斷方法。

在第五方面，本發明提供一個偵測病毒感染的方法，包括使本發明之化合物接觸懷疑包含病毒的樣品。

吾人將更瞭解，本發明之化合物用於治療所需的量將不僅隨選擇的特殊化合物而變化，亦隨施藥路徑、治療狀態的本質、主題的年齡和狀態而變化，最後將由隨行的醫師或獸醫判斷。然而，一般而言，適當的劑量將每天每公斤體重約0.001至100毫克/公斤，較佳0.001至1毫克/公斤/天，最佳0.002至0.1毫克/公斤/天。

治療較佳從感染時或之前開始，並持續到病毒不再存在。然而，當得到感染後時(例如外觀已建立症狀之後)，化合物亦是有效。

適當的治療是給施藥一或二次，較佳一次僅為治療，預防則每星期一次。

該化合物係以單位劑型方便給藥，例如每單位劑型包含1至100毫克活性成份，0.1至10毫克更方便，0.1至5毫克最方便。

然而關於治療用途而言，本發明之化合物可以以粗制化學品給藥是可能的，但最好活性成分是以醫藥調配物狀存在。

因此，在第六的方面，本發明提供一種醫藥調配物，其包括式(I)之化合物或醫藥上可接受之鹽類或其衍生物，併以一種或多種醫藥上可接受之載體，因而其它視需要而選擇之治療及/或預防成份。該載劑必需是「接受性」，意義為可與該調配物中其它成份相容且不會對於接受者有害。

本發明之化合物亦可以與其它治療及/或預防用劑併用，例如其它抗感染劑。特定而言，本發明之化合物可以併用其它抗病毒劑。本發明因此在第七方面提供一種結合物，其包括式(I)之化合物或醫藥上可接受之鹽類或其衍生物，併用另一種治療性及/或預防性活性劑，特別是抗病毒劑。

以上引用之結合物可以方便地以醫藥調配物形式存在供使用，因而此類包括如上定義之結合物併以醫藥上可接受之載劑之調配物包括本發明之進一步方面。

供用於此類結合物包括其它抗感染劑，特別是用以治療呼吸感染者。例如，其它有效抗流行性感冒病毒之化合物或疫苗，如以上引用之唾液酸類似物，例如任娜密威(zanamivir)、奧斯他偉(oseltamivir)、金剛烷胺、金剛乙胺和瑞比達(ribavirin)和芙路發斯(FluVax)，可以包含在此類結合物中。

此類結合物的個別成分可以於獨立或結合醫藥調配物中以獨立、依序或同時給藥。

當本發明之化合物係與抗同一病毒之第二治療及/或預防劑活性併用時，各化合物之劑量可以與當各化合物單獨使用時的用量相同或不同。諳熟此藝者將易於瞭解適當的劑量。

醫藥調配物包括適於口服、經直腸、經鼻、局部(包括經口腔和舌下)、經陰道或非經腸道(包括肌肉內、皮下和經靜脈)給藥，或適以呼吸道給藥之形式者(包括鼻通道)，例

如藉吸入或吹氣法。在適當之處，該調配物可以方便地以分離劑型存在，且可以藉醫藥技藝中為人熟知之任何方法製備。這些方法包括使活性化合物與液體載劑或細粉固體載劑或二者締合，其後，必要時將產物成形為希望的調配物。

適於口服給藥的醫藥調配物可以方便地以分離單位(如各含預定活性成份量之膠囊、扁囊劑或錠劑)；粉末或顆粒；溶液、懸浮液或乳液狀存在。活性成分亦可以以大丸藥、舔劑或膏劑狀存在。口服給藥之錠劑和膠囊為可以包含傳統的賦形劑(如黏合劑、填充劑、潤滑劑、粉碎劑或潤濕劑)。錠劑可以根據技藝中廣為人知的方法塗佈。口服液態製劑可以例如以水性或油性懸浮液、溶液、乳液、糖漿或酏劑形式，或者可以以乾燥產物狀存在，以便在使用前與水或其他適當媒液組成。此類液態製劑可以包含傳統的添加劑，如懸浮劑、乳化劑、非水性媒液，其可以包括食用油或防腐劑。

根據本發明之化合物亦可以調配為藉注射之非經腸道給藥，例如大丸藥注射或連續浸漬，且可以以安瓶、預填充注射器、小體積浸劑或具添加防腐劑之多劑量容器的單位劑型存在。組合物可以採用此類如懸浮液、溶液或乳液之型式存在，且可以包含如懸浮劑、安定劑及/或分散劑之調配劑。或者，活性成分可以是藉無菌隔離無菌固體或從溶液冷凍乾燥而得到之粉末形式，以便在使用前與適當媒液(如無菌、無熱原水)構成。

關於在表皮層局部給藥，根據本發明之化合物可以調配為膏劑、霜劑或洗劑狀，或如經皮膚吸收的貼藥。膏劑和霜劑例如可以以添加適當稠化劑及/或膠凝劑與水性或油性基底一起調配。洗劑可以與水性或油性基底一起調配，且通常將包含一種或多種乳化劑、安定劑、分散劑或懸浮劑、稠化劑或染色劑。

適於在口內局部給藥的調配物包括含調味基底(經常是蔗糖和阿拉伯膠或黃耆膠)內活性成份之片劑；含惰性基底(如明膠或蔗糖及阿拉伯膠)內活性成份之口服藥；及含適當液態載劑內活性成份之漱口水。

適於經直腸給藥的醫藥調配物(其中載劑是固體)最佳以單位劑量栓劑存在。適當的載劑包括可可油和技藝中普遍使用之其他材料，且栓劑可以藉由摻合活性化合物與軟化或熔融載劑，繼之冷卻並成模而方便地形成。

適於陰道給藥的調配物可以如子宮托、填塞物、霜劑、凝膠、糊劑、泡沫或噴霧狀存在，除了活性成份外，其包含技藝中已知適當之載劑。

關於呼吸道給藥，包括鼻內給藥，神經胺基酸酶抑制劑可以藉技藝中使用之任何方法和調配物給藥予呼吸道。

因此，大體上化合物可以以溶液或懸浮液狀或乾燥粉末形式給藥。

溶液和懸浮液通常將是水性例如單從水(例如無菌水或無熱原水)或水及生理接受性共溶劑(例如乙醇，丙二醇或如PEG 400之聚乙二醇)製備。

此類溶液或懸浮液可以額外包含其它賦形劑，例如防腐劑(如殺藻胺)、安定劑/表面活性劑(如多乙氧基醚，例如 Tween 80、Span 80、殺藻胺)、緩衝劑、等滲壓調整劑(例如氯化鈉)、吸收增強劑和黏性增強劑。懸浮液可以額外包含懸浮(例如微晶纖維素，羧甲基纖維鈉)。

溶液或懸浮液係以傳統方法直接應用於鼻腔，例如以點滴器，吸量管或噴霧。調配物可以以單一或多劑型提供。在後者的情況下希望提供一種配藥計量方法。在點滴器或吸量管的情況下可以藉由患者施藥適當且預定體積的溶液或懸浮液而達到。在噴霧的情況則可以利用計量霧化幫浦而達成。

對呼吸道給藥亦可以利用氣溶膠調配物達成，其中該化合物係以一種具適當推進劑(如氟氯碳化物(CFC)，例如二氯四氯乙烷、二氧化碳或其它適當氣體)的加壓包裝提供。該氣溶膠亦可以方便地包含界面活性劑，如卵磷脂。藥物的劑量可以藉由提供計量閥而控制。

或者，化合物可以以乾燥粉末的形式提供，例如化合物於適當粉末(如乳糖、澱粉和如羥丙甲基纖維素和寺乙烯基吡咯啉(PVP)之澱粉衍生物)基底中之粉末混合物。粉末載劑將方便地在鼻腔內形成凝膠。粉末成分可以以單位劑型(例如於膠囊或明膠之藥匣)或粉末可以利用吸入劑給藥之泡殼包裝存在。

在希望施藥與呼吸道的調配物中(包括鼻內調配物)，化合物通常將具有小顆粒尺寸，例如約莫5微米或更小。此一

顆粒尺寸可以藉技藝中已知的方法得到，例如微粉化法。

當需要時，可以使用適於得到持續釋放活性成份的調配物。

本發明之化合物較佳係藉吸入、吹氣或鼻內給藥或其結合方法施藥與呼吸道。

「Relenza」係經由「Diskhaler」(GlaxoSmithKline集團之商標)如自由流動粉末狀藉由口服吸入而給藥。類似的調配物將適於本發明。

因此，根據本發明的第八方面提供一種包含以上所定義之調配物之吸入劑。

吾人將瞭解吸入劑亦可以是計量配藥氣溶膠吸入劑形式。

為了本申請書，吾人將清楚瞭解「包括」表「包括但不限於」，「包括」具有對應意義。

此處引用之所有公告，包括但不限於專利和專利申請案係以引用方式併入，彷彿各個公告案係明確且獨立指示以引用方式完全併入本文。

發明詳細描述

現在將藉由僅參考以下非限制性實例詳細敘述本發明。

機械方法

方法 A (LC/MS)

以正離子電子噴霧模式操作之Micromass Platform II質譜儀，質量範圍100-1000 amu。

管柱：ID 3.3公分×4.6毫米，3微米ABZ+PLUS

流速：3毫升/分鐘

注入體積：5微升

溶劑 A：95%乙腈 + 0.05%甲酸

溶劑 B：0.1%甲酸 + 10毫莫耳濃度乙酸銨

梯度：0% A/0.7分鐘，0-100% A/3.5分鐘，100% A/1.1分鐘，
100-0% A/0.2分鐘。

方法 B (LC/MS)

以正離子電子噴霧模式操作之 Waters ZQ質譜儀，質量範圍
100-1000 amu。

管柱：ID 3.3公分×4.6毫米，3微米 ABZ+PLUS

流速：3毫升/分鐘

注入體積：5微升

溶劑 A：95%乙腈 + 0.05%甲酸

溶劑 B：0.1%甲酸 + 10毫莫耳濃度乙酸銨

梯度：0% A/0.7分鐘，0-100% A/3.5分鐘，100% A/1.1分鐘，
100-0% A/0.2分鐘。

方法 C (自動製備 HPLC)

使用之製備管柱是 Supelcosil ABZplus (10公分×2.12公分)。

UV波長：230毫微米

注入體積：2毫升

流速：4毫升/分鐘

溶劑 A：乙腈 + 0.05%甲酸

溶劑 B：水 + 0.1% TFA

梯度：5-40% A/20分鐘，40% A/20分鐘，40-100% A/0.3分鐘，

100% A/15分鐘，100-5% A/3分鐘。

方法 D (質量導向之自動製備 HPLC)

使用之製備管柱是 Supelcosil ABZplus (10公分×2.12公分)。

UV波長：200-320毫微米

流速：20毫升/分鐘

注入體積：1毫升

溶劑 A：0.1% 甲酸

溶劑 B：95% 乙腈 + 5% 甲酸

梯度：100% A/1分鐘，100-80% A/9分鐘，80-1% A/3.5分鐘，
1% A/1.4分鐘，1-100% A/0.1分鐘。

方法 E (製備 HPLC)

使用之製備管柱是 Dynamax 60A C18 (25公分×4.14公分)。

UV波長：230毫微米

流速：40毫升/分鐘

溶劑 A：乙腈 + 0.05% 甲酸

溶劑 B：水 + 0.1% TFA

梯度：0-50% A/25分鐘，50-100% A/0.3分鐘，100% A/15分鐘，
100-0% A/3分鐘。

方法 F (製備 HPLC)

使用之製備管柱是 Kromasil C18 (20公分×5公分)。

UV波長：230毫微米

流速：80毫升/分鐘

溶劑 A：1% TFA

溶劑 B：80% 乙腈 + 1% TFA

梯度：0-100% B/70分鐘。

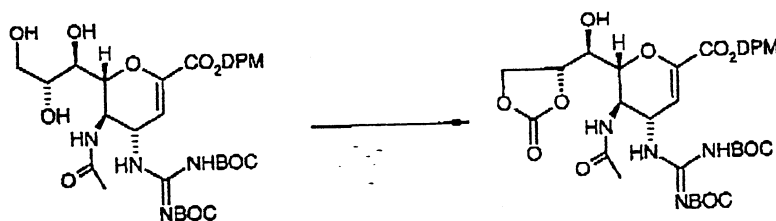
HPLC後，在減壓下藉蒸發而結合適當餾份和揮發性組份。

將水性部份應用於以水(500毫升)溶析，繼之以乙腈：MeOH：水之2:2:1混合物(500毫升)溶析之Amberchrom CG-161樹脂(10×2.5公分)管柱。

縮寫

TFA	三氟乙酸
DMAP	4-二甲基胺基吡啶
DCM	二氯甲烷
EtOAc	乙酸乙酯
ET ₂ O	二乙醚
MeOH	甲醇
HPLC	高壓液態層析法
DPM	二苯基甲基
SPE	固相萃取法
NMR	核磁共振法
LC/MS	液態層析法/質譜法

中間體 1

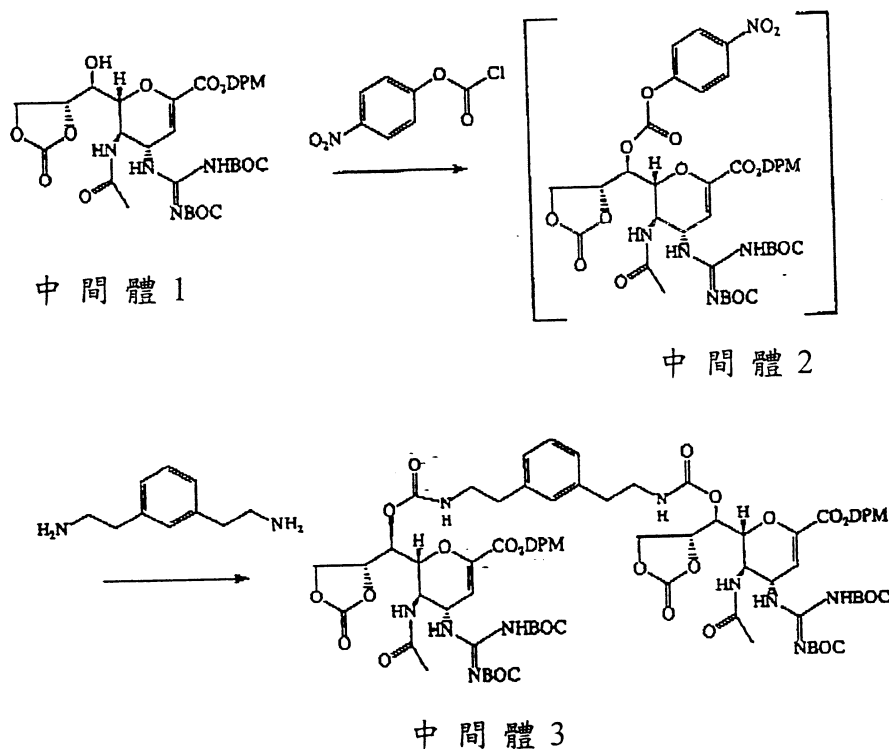


中間體 1

在室溫於氮氣下將二苯甲基(2R,3R,4S)-3-乙醯胺基-4-((E)-[(三級丁氧羰基)胺基][(三級丁氧羰基)亞胺基]甲

基}胺基)-2-[(1R,2R)-1,2,3-三羥丙基]-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸鹽(見J. Med. Chem. 1998, 41, 787-797)(12.38克; 17.7毫莫耳)溶於無水乙腈(130毫升)。將溶液攪拌並添加1,1'-羰二咪唑(2.87克; 17.7毫莫耳)。16小時後, LC/MS顯示存在起始三元醇, 進一步添加1,1'-羰二咪唑(總計0.493克; 3毫莫耳)。數小時後, LC/MS顯示無三元醇存在。溶劑被蒸發並將殘餘物於矽上閃光層析, 以1:1乙酸乙酯/40-60石油醚溶析。將含希望產物之餾份蒸發, 其後於二氯甲烷中逐漸整理, 以硫酸鈉乾燥, 過濾並蒸發以得到灰白色固體狀中間體1二苯甲基(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-({-[(三級丁氧羰基)胺基][(三級丁氧羰基)亞胺基]甲基}胺基)-2-{(S)-羥基[(4R)-2-酮基-1,3-二氧戊環-4-基]甲基}-3,4-二氫-(2H-吡喃-6-羧酸鹽(11.05克; 86%))。

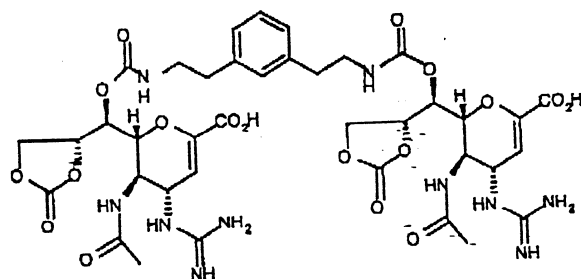
中間體 3

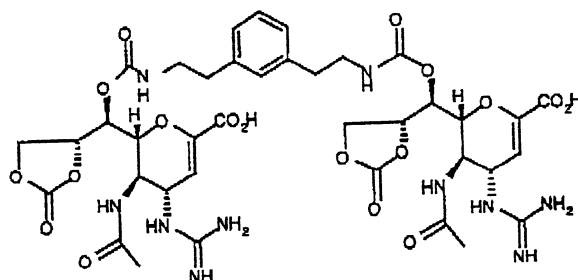


將中間體 1 (2.0 克, 2.76 毫莫耳) 與無水甲苯 ($3 \times 20\text{ml}$) 共沸而乾燥, 然後溶於無水吡啶 (8 毫升)。於此添加 DMAP (1.01 克, 8.29 毫莫耳) 和對硝苯基氯甲酸酯 (0.67 克, 3.3 毫莫耳), 並將混合物於室溫攪拌過夜。再添加將對硝苯基氯甲酸酯 (0.28 克, 1.38 毫莫耳) 並持續攪拌 2 小時。LCMS (方法 B) 顯示了 $\text{MH}^+ = 890$; 對應中間體 2 之 $T_{\text{RET}} = 4.19$ 分鐘。

將一部份混合物 (1.6 毫升) 移至另一反應容器並以 DMAP (0.20 克, 1.66 毫莫耳)、三乙胺 (0.08 毫升, 0.55 毫莫耳) 處理, 繼之 1,3-苯乙二胺二鹽酸鹽 (65 毫克, 0.27 毫莫耳) [關於製備, 見 Chem. Ber., 1984, 117 (4), 1487-1496] 並混合物攪拌 70 小時, 繼之真濃縮並在 DCM (10 毫升) 和水 (5 毫升) 之間分溶。使用疏水性玻璃匣進行離析有機層。藉氮下向下吹氣而集中 DCM 層, 繼之應用於 5 克矽石 SPE 匣, 首先以環己烷: Et_2O (1:1) 溶析, 繼之 Et_2O , 繼之 $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc}$ (9:1), 繼之 $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc}$ (5:1), 繼之 $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc}$ (3:1), 萃之 $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc}$ (1:1), 最後 EtOAc 而得到白色固體狀中間體 3 (0.29 克; 63% 產率)。LC/MS (方法 A) 顯示 $(\text{M}+2\text{H}^+)/2 = 834$; $T_{\text{RET}} = 4.56$ 分鐘。

中間體 4

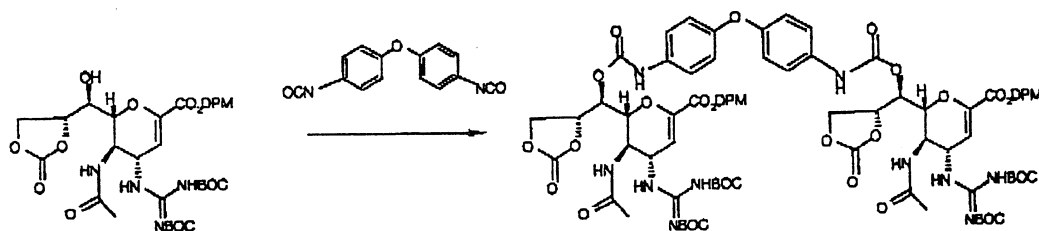




中間體 4

將中間體 3 (0.29克, 0.2毫莫耳)溶於 DCM: 茴香醚之 10:1 混合物 (0.80毫升)並以 TFA (0.73毫升)處理。將產生之溶液在室溫攪拌 2 小時, 繼之以氮下向下吹氣而蒸發至乾燥。將殘餘物與二乙醚一起濕磨而得到白色固體狀中間體 4 之雙-TFA 鹽 (0.142克, 76%產率)。LC/MS (方法 B)顯示 $(M+2H^+)/2=467$; $T_{RET}=2.05$ 分鐘。

中間體 5

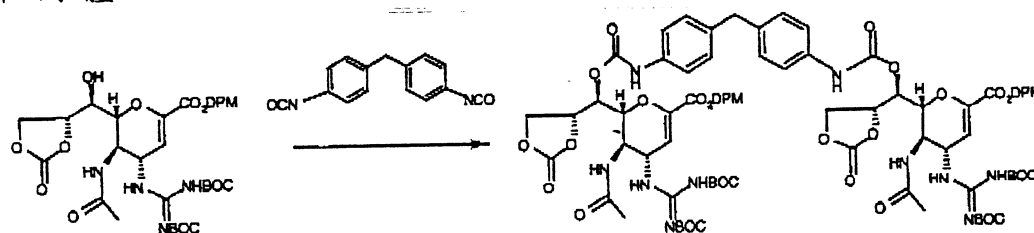


中間體 1

中間體 5

將中間體 1 (0.10克, 0.14毫莫耳)與無水甲苯共沸三次而乾燥, 然後在溶於無水 DCM (0.5毫升)。於所產生的溶液是添加 DMAP (約 0.005克), 繼之 1,1'-氧雙[4-異氰醯苯] (0.012克, 0.046毫莫耳)和一些 3Å 分子篩粒。將混合物迴流過夜並任由冷卻, 直接應用於 5 克矽石 SPE 匣。將此首先以 Et₂O (10×20 毫莫耳)溶析, 繼之 EtOAc (5×20 毫莫耳), 得到無色玻璃狀中間體 5 (0.025克, 33%產率)。LC/MS (方法 A)顯示 $(M+2H^+)/2=852$; $T_{RET}=4.55$ 分鐘。

中間體 6

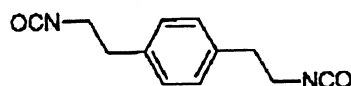


中間體 1

中間體 6

將中間體 1 (4.0 克, 5.6 毫莫耳) 與無水甲苯共沸三次而乾燥, 然後在溶於無水 DCM (5 毫升)。於所產生的溶液是添加 4,4'-亞甲基雙[苯基異氰酸酯] (0.48 克, 1.9 毫莫耳), 一些 3Å 分子篩粒和 DMAP (約 0.2 克), 其後將混合物迴流 20 小時。將混合物冷卻後於真空濃縮並以閃光管柱層析法於矽石上純化。首先以 DCM 進行溶析, 繼之 Et₂O, 接著 Et₂O:EtOAc (95:5), Et₂O:EtOAc (90:10) 和 Et₂O:EtOAc (80:20), 得到白色固體狀中間體 6 (2.60 克, 80% 產率)。LC/MS (方法 B) 顯示 (M+2H⁺)/2=850; T_{RET}=4.57 分鐘。

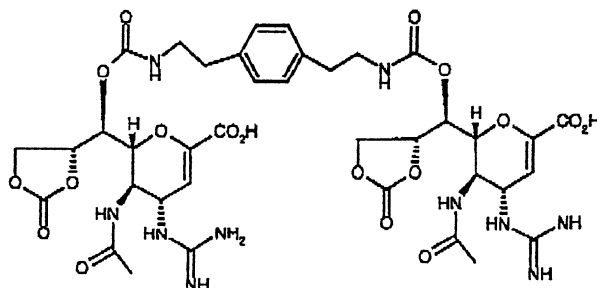
中間體 7



將 1,4-亞苯基二丙酸酸 (0.50 克, 2.25 毫莫耳) 與甲苯共沸, 其後懸浮於一些 3Å 分子篩粒上之二噁烷 (5 毫升) 中, 並於氮下攪拌 10 分鐘。添加三乙胺 (0.68 毫升, 4.90 毫莫耳), 繼之二苯基磷疊氮化物 (0.96 毫升, 4.50 毫莫耳) 並將混合物於室溫攪拌 2 小時。其後將溫度提高至 80°C 並在混合物冷卻前攪拌 45 分鐘並過濾以移除不溶物質。以石油醚 (40-60°C) 清洗固體並將結合之濾液真空濃縮。將所產生之油以石油醚 (40-60

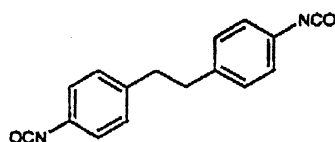
℃)萃取而得到無色油狀中間體7(0.12克, 25%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.12 (s, 4H), 3.45 (t, 4H), 2.83 (t, 4H)。

中間體8



根據中間體5和6之相同步驟從中間體7及1製備完全保護之中間體8, 其後如下去保護:(0.09克, 0.05毫莫耳)溶於DCM (0.37毫升)和茴香醚(0.037毫升)之混合物並在冰浴中冷卻。將混合物以TFA (0.37毫升)處理並任由所產生之溶液回溫至室溫, 其後在真空濃縮前攪拌2.5小時。將混合物與Et₂O濕磨, 得到白色固體狀中間體8之雙-TFA鹽(0.05克; 93%產率)。LC/MS (方法B)顯示(M+2H⁺)/2=467; T_{RET}= 2.01分鐘。

中間體9



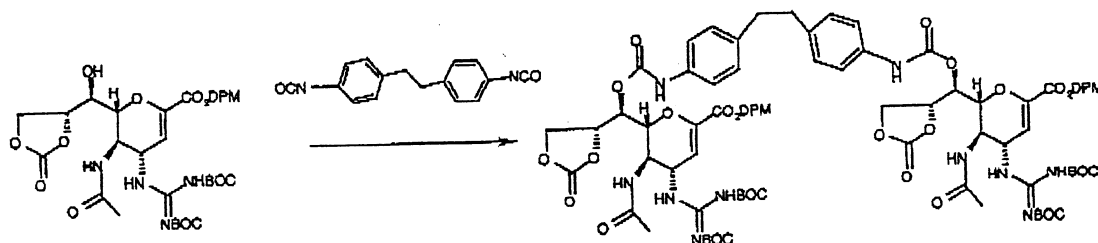
中間體9

將4,4'-亞乙基二苯胺(0.50克, 2.36毫莫耳)於無水甲苯(100毫升)之溶液以三光氣(1.40克, 4.70毫莫耳)處理並將混合物迴流(120℃)4小時。任由混合物冷卻並在重力下過濾以移除不溶的殘留物。將濾液真空濃縮而得到黃色固體中間體9(0.54克, 86%產率)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.98-7.05 (8H, ABq)和 2.86 (4H,

s)。

中間體 10

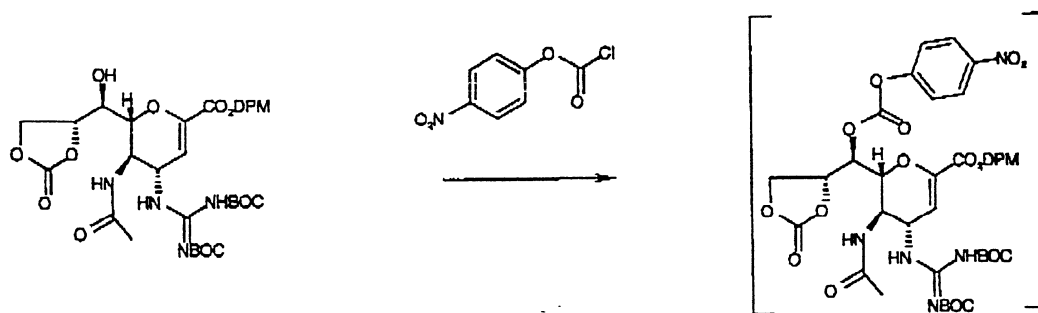


中間體 1

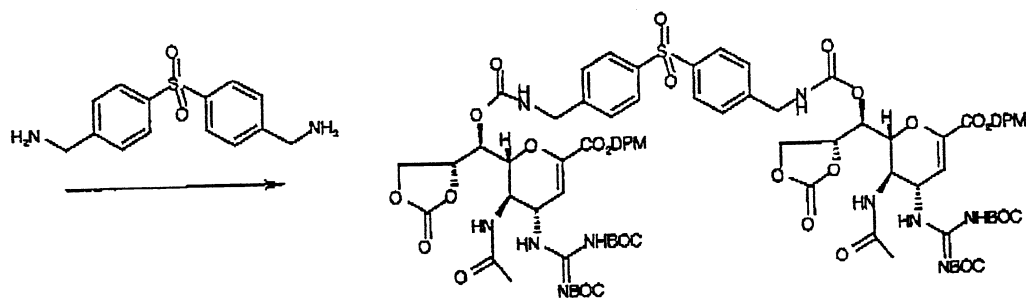
中間體 10

將中間體 1 (0.40 克, 0.56 毫莫耳) 從無水甲苯共沸二次其後溶於無水 DCM (0.4 毫升)。於所產生之溶液添加 DMAP (約 0.02 克) 繼之中間體 9 (0.05 克, 0.19 毫莫耳) 和一些 3Å 分子篩粒。將混合物迴流 18 小時其後直接應用於 40 克矽石 Biotage 匣。將此以 Et₂O:EtOAc (6:1) 溶析而得到白色固體狀中間體 10 (0.10 克, 31% 產率)。LC/MS (方法 B) 顯示 (M+2H⁺)/2=858; T_{RET}=4.57 分鐘。

中間體 11



中間體 1



中間體 11

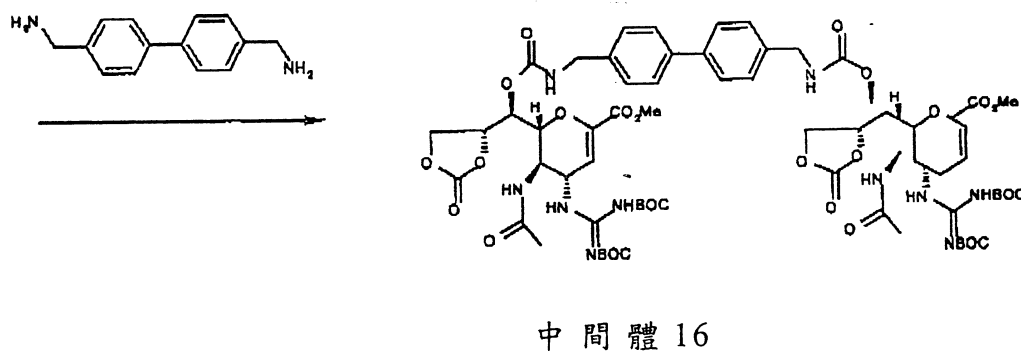
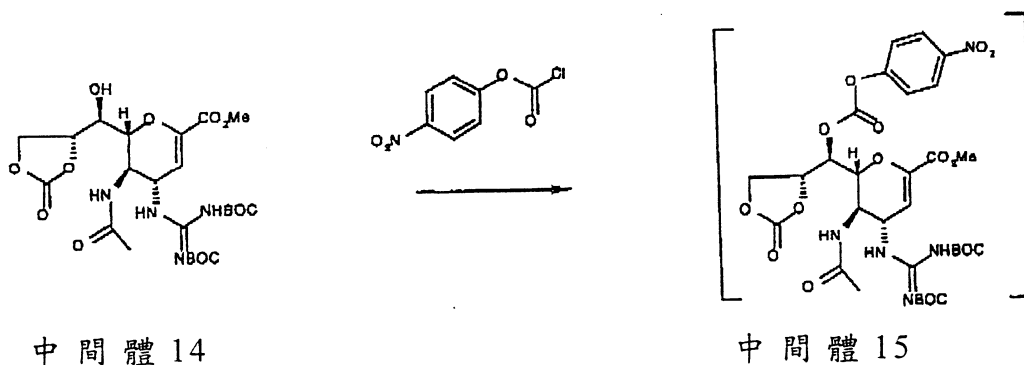
從無水甲苯共沸三次而將中間體 1 (2.0 克, 2.76 毫莫耳) 乾燥, 其後溶於無水吡啶 (8 毫升)。於此添加 DMAP (1.01 克, 8.29 毫莫耳) 和對硝苯基氯甲酸酯 (0.67 克, 3.30 毫莫耳) 並將混合物在室溫攪拌 18 小時。再添加對硝苯基氯甲酸酯 (0.28 克, 1.38 毫莫耳) 並持續攪拌 2 小時。LC/MS (方法 B) 顯示相當於中間 2 之 $MH^+ = 890$; $T_{RET} = 4.19$ 分鐘。

將一部份混合物 (1.6 毫升) 移至另一反應容器並以 DMAP (0.20 克, 1.66 毫莫耳)、三乙胺 (0.08 毫升, 0.55 毫莫耳) 處理, 繼之 4,4'-磺醯基雙苄基胺二鹽酸鹽 (0.10 克, 0.28 毫莫耳) (關於製備, 見 J. Chem. Soc., 1946, 466) 並將混合物攪拌 70 小時。將混合物真空濃縮並在 DCM (10 ml) 和水 (5 毫升) 之間分溶。使用 50 毫升疏水性玻璃匣進行相分離。藉由氮下向下吹風將 DCM 層集中, 其後應用於 5 克矽石 SPE 匣並以環己烷: Et_2O (1:1) 溶析, 繼之 Et_2O , 然後 $Et_2O:EtOAc$ (9:1), 其後 $Et_2O:EtOAc$ (5:1), 然後 $Et_2O:EtOAc$ (3:1), 繼之 $Et_2O:EtOAc$ (1:1), 最後以 $EtOAc$ 而得到灰白色固體狀中間體 11 (0.15 克; 30% 產率)。LC/MS (方法 A) 顯示 $(M+2H^+)/2 = 890$; $T_{RET} = 4.47$ 分鐘。

以類似方法製備以下：

X	起始胺	產物	LC/MS法	(M+2H ⁺)/2	T _{RET} (分鐘)
O	4,4'-氧雙苄基胺二鹽酸鹽 (Chem. Comm., 1998, 2297-2298)	中間體12	A	886	4.48
CH ₂	4,4'-亞甲基雙苄基 胺二鹽酸鹽 (J. Med. Chem., 1998, 41, 2-5)	中間體13	A	865	4.51

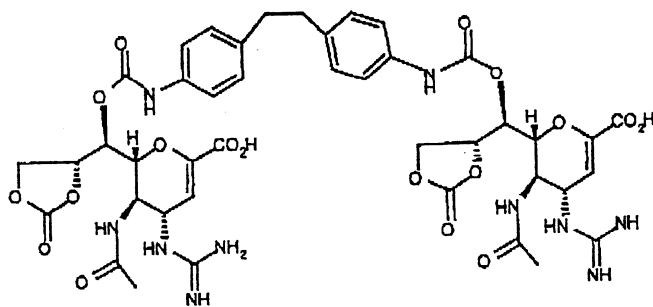
中間體 16



從無水甲苯共沸三次而將中間體 14 (2.74克, 4.79毫莫耳) 乾燥, 其後溶於無水吡啶 (13.75毫升)。於此添加 DMAP (1.46克, 11.98毫莫耳) 和對硝苯基氯甲酸酯 (1.06克, 5.27毫莫耳) 並將混合物在室溫攪拌 3 小時。LC/MS (方法 B) 顯示相當於中間 15 之 $MH^+ = 738$; $T_{RET} = 3.87$ 分鐘。

於混合物添加更多吡啶(8.25毫升)，繼之[1,1'-聯苯基]-4,4'-二甲胺(0.51克，2.4毫莫耳)(根據J. Med. Chem., 2000, 43, 420-431)並持續攪拌16小時。將混合物真空濃縮並以在DCM之溶液狀應用於90克，矽石Biotage匣。將此以二乙醚溶析，繼之Et₂O:EtOAc(1:1)，繼之Et₂O:EtOAc(1:2)，最後EtOAc而得到白色固體狀間體16(1.92克，57%產率)。LC/MS(方法A)顯示(M+2H⁺)/2=705；T_{RET}=3.96分鐘。

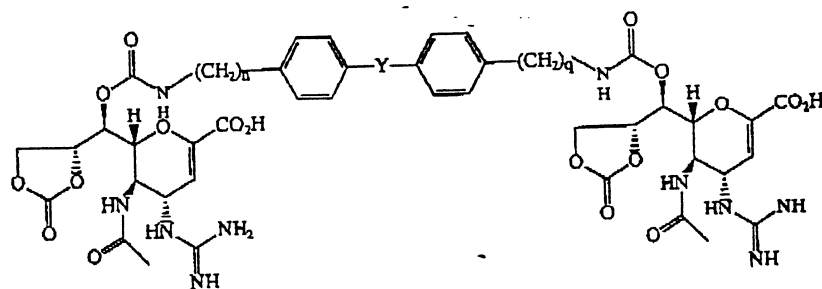
中間體17



中間體17

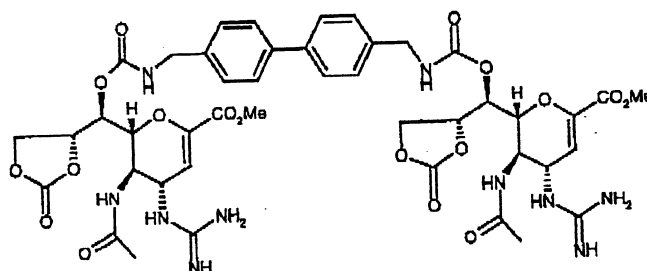
將中間體10(0.1克，0.06毫莫耳)溶於小玻璃瓶內DCM:茴香醚之10:1混合物(0.44毫升)並以TFA(0.04毫升)處理。將所產生之溶液在室溫攪拌2小時，繼之真空濃縮。將殘餘物與二乙醚濕磨而得到白色固體裝中間體17之雙-TFA鹽(0.06克，87%產率)。LC/MS(方法A)顯示(M+2H⁺)/2=491；T_{RET}=2.38分鐘。

以類似方式製備以下：



Y	n	q	原料	產物	LC/MS法	(M+2H ⁺)/2	T _{RET} (分鐘)
O	0	0	中間體5	中間體18	A	485	2.25
CH ₂	0	0	中間體6	中間體19	B	484	2.26
SO ₂	1	1	中間體11	中間體20	A	523	2.08
O	1	1	中間體12	中間體21	A	499	2.21
CH ₂	1	1	中間體13	中間體22	A	498	2.25

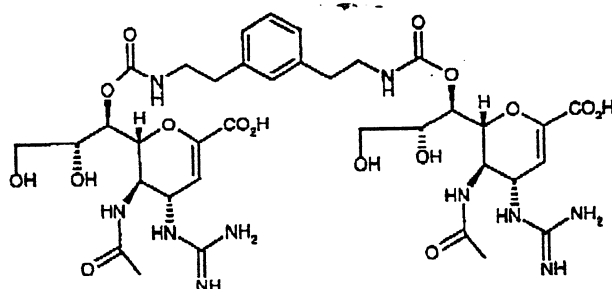
中 間 體 23



將中間體16 (1.92克，1.36毫莫耳)溶於DCM：茴香醚之10:1混合物 (27.5毫升)並以TFA (25毫升)處理。將所產生的溶液在室溫攪拌2小時繼之真空濃縮。將殘餘物與二乙醚一起濕磨而得到白色固體狀中間體23之雙TFA (1.59克，94%產率)。LC/MS (方法A)顯示 $(M+2H^+)/2=505$ ； $T_{RET}=2.27$ 分鐘。

實 例 1

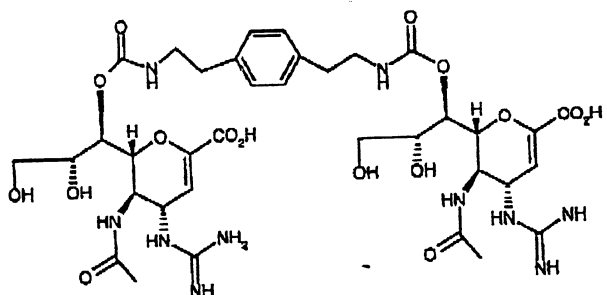
(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-((1R,2R)-1-(((2-(3-{2-(((1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]乙基}苯基)乙基]胺基}羰基)氧]-2,3-二羥丙基)-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸



將中間體 4 (0.14 克, 0.15 毫莫耳) 溶於水 (1.20 毫升) 和 甲醇 (1.20 毫升) 之混合物中。於此添加三乙胺 (0.30 毫升) 和並將溶液搖動 2 小時, 繼之真空濃縮。逆相製備 HPLC (方法 D) 得到實例 1 (0.048 克; 44% 產率)。LC/MS (方法 A) 顯示 $(M+2H^+)/2=441$; $T_{RET}=1.83$ 分鐘。

實例 2

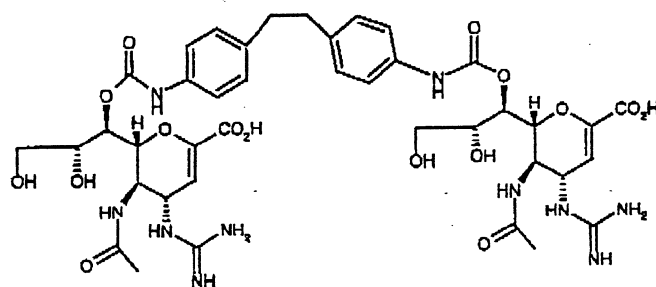
(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-((1R,2R)-1-([2-(4-{2-([[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]乙基}苯基)乙基]胺基}羰基)氧]-2,3-二羥丙基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸



將中間體 8 (0.03 克; 0.06 毫莫耳) 溶於水 (1 毫升) 和 甲醇 (1 毫升) 之混合物中。於此添加三乙胺 (0.25 毫升) 並將溶液攪拌 1 小時繼之真空濃縮。將殘餘物如水溶液般應用於 C18 SPE 匣 (以甲醇預濃縮)。將管柱以乙腈: 水 (5:95) (3×5 毫升) 溶析, 繼之乙腈: 水 (7.5:93.5) (3×5 毫升), 最後乙腈: 水 (15:85) (3×5 毫升) 以得到白色固體狀實例 2 (0.005 克; 9% 產率生)。LC/MS (方法 B) 顯示 $(M+2H^+)/2=441$; $T_{RET}=1.79$ 分鐘。

實例 3

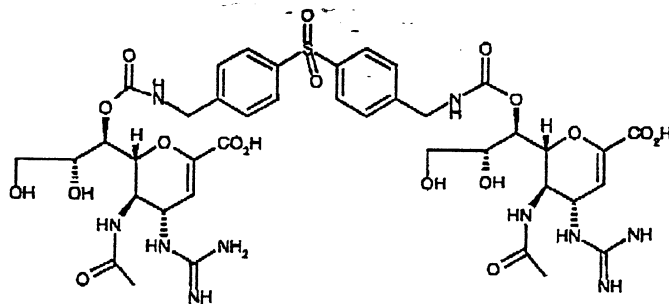
(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-[(4-(2-{4-[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基]-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]乙基}苯基)乙基]胺基}羰基)氧]-2,3-二羥丙基}-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基]-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸雙 TFA 鹽



將中間體 17 (0.06 克，0.06 毫莫耳)於二噁烷：水之 2:1 混合物 (3 毫升)之溶液以三乙胺 (1 毫升)處理，並將混合物在室溫攪拌 18 小時。以逆相 HPLC (方法 C)純化得到白色固體狀實例 3 (0.01 克，22% 產率)。LC/MS (方法 A)顯示 $(M+2H^+)/2=465$ ； $T_{RET}=2.16$ 分鐘。

實例 4

(2R,3R,4S)-2-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-[(4-(2-{4-[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基]-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]甲基}苯基)磺醯基]苯基}甲基]胺基}羰基)氧]-2,3-二羥丙基}-4-[[胺基(亞胺基)甲基]胺基]-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸



將中間體 20 (0.09 克, 0.07 毫莫耳) 溶於水 (0.70 毫升) 和 甲醇 (0.70 毫升) 之混合物。於此添加三乙胺 (0.18 毫升) 並將溶液搖動 2 小時繼之真空濃縮。逆相製備 HPLC (方法 D) 得到雙-TFA 鹽狀實例 4 (0.014 克, 20% 產率)。LC/MS (方法 B) 顯示 $(M+2H^+)/2 = 497$; $T_{RET} = 1.93$ 分鐘。

以類似方式製備以下：

Y	原料	產物	LC/MS 法	$(M+2H^+)/2$	T_{RET} (分鐘)
O	中間體 21	實例 5	A	473	2.07
CH ₂	中間體 22	實例 6	A	472	2.11

實例 5

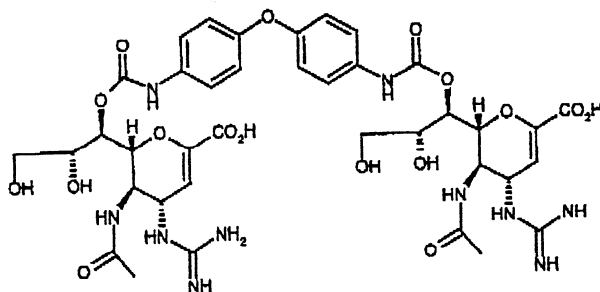
(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-({[(4-[(4-{{[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]甲基}苯基)氧]苯基}甲基)胺基]羰基}氧)-2,3-二羥丙基]-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸

實例 6

(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-({[(4-[(4-{{[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]甲基}苯基)甲基]苯基}甲基)胺基]羰基}氧)-2,3-二羥丙基]-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸

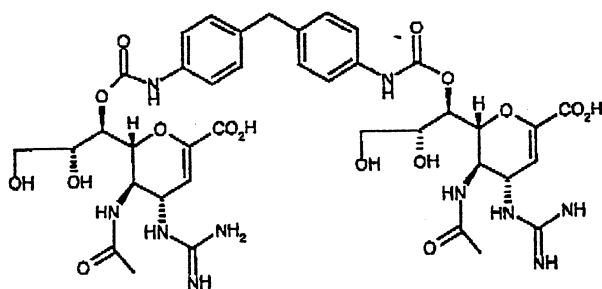
實例 7

(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-({[4-({4-[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]苯基



將中間體 18 (0.005克，0.004毫莫耳)溶於水(1毫升)中並在 40°C 加熱 8 小時。任由混合物冷卻並直接應用於 500 毫克 C18 SPE 匣(以甲醇預濃縮)。將管柱以水(5毫升)溶析，然後乙腈：水(15:85)(2×5毫升)。含乙腈餾份包含雜質，將其結合並真濃縮。將殘餘物再溶於含 1 滴 TFA 以幫助溶解度之水(1 毫升)中並再次應用於 500 毫克 C18 SPE 匣(以甲醇預濃縮)。將管柱以乙腈：水(2:98)(2×5毫升)溶析，繼之乙腈：水(4:96)(2×5 毫升)，繼之乙腈：水(6:94)(2×5毫升)，繼之乙腈：水(8:92)(2×5 毫升)，最後乙腈：水(10:90)(2×5毫升)，得到白色固體狀實例 7 (0.002克，47%產率)。LC/MS (方法 A)顯示 $(M+2H^+)/2=459$ ； $T_{RET}=2.01$ 分鐘。

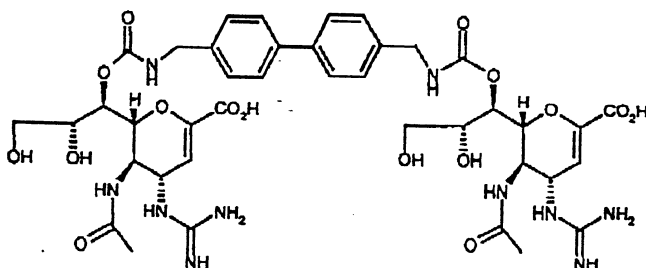
(2R,3R,4S)-3-(乙 醯 胺 基)-2-{(1R,2R)-1-[(4-({4-([[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙 醯 胺 基)-4-{[胺 基 (亞 胺 基)甲 基]胺 基 }-6-羧 基 -3,4-二 氫 -2H-吡 喃 -2-基)-2,3-二 羥 丙 基]氧 }羧 基)胺 基]苯 基 }甲 基)苯 基]胺 基 }羧 基)氧]-2,3-二 羥 丙 基 }-4-{[胺 基 (亞 胺 基)甲 基]胺 基 }-3,4-二 氫 -2H-吡 喃 -6-羧 酸 雙 TFA 鹽



將中間體 19 (1.0 克，1.0 毫莫耳) 溶於水 (4 毫升) 和 甲醇 (4 毫升) 之混合物。於此添加三乙胺 (1 毫升) 並將溶液攪拌 3.5 小時。藉減壓下蒸發移除揮發性成分並藉添加 TFA 將剩餘水溶液之 pH 調整至 pH 3。逆製備 HPLC (方法 E) 得到白色固體狀實例 8 之雙 TFA 鹽 (0.29 克；24% 產率)。LC/MS (方法 B) 顯示 $(M+2H^+)/2=458$ ； $T_{RET}=2.08$ 分鐘。

實例 9

(2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-2-[(1R,2R)-1-[[[(4'-{[(1R,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-(乙醯胺基)-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-6-羧基-3,4-二氫-2H-吡喃-2-基)-2,3-二羥丙基]氧}羰基)胺基]甲基]-1,1'-聯苯-4-基)甲基]胺基}羰基)氧]-2,3-二羥丙基]-4-{[胺基(亞胺基)甲基]胺基}-3,4-二氫-2H-吡喃-6-羧酸雙 TFA 鹽



將中間體 23 (1.59 克，1.3 毫莫耳) 溶於水 (28.5 毫升) 和 甲醇

(28.5毫升)之混合物。於此添加三乙胺(2.85毫升)並將溶液攪拌4小時。真空移除揮發性成分並藉添加TFA將剩餘水溶液之pH調整至pH 2。逆製備HPLC(方法F)得到兩性離子實例9(0.70克; 57%產率)。LC/MS(方法A)顯示 $(M+2H^+)/2=465$; $T_{RET}=2.00$ 分鐘。

實例10：評比式(I)之化合物-抑制流行性感冒病毒複製

細胞病變效應(CPE)化驗基本上係如Watanabe等人(J. Virological Methods, 1994 48 257)所述般進行。在一系列本發明之化合物稀釋液存在下，使MDCK細胞受已定義病毒接種物(實驗決定是在72小時內引起充分CPE的最小量，且對於濃度經認定與公告常模一致的控制化合物敏感)感染。於5% CO₂大氣下於37°C培養多達72小時。根據公告方法(例如見Watanabe等人，1994)，濾過性病毒染料3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎢溴化物(MTT)的代謝測定CPE和病毒複製的程度。使用曲線配合的電腦程式計算抑制50% CPE之化合物濃度(ID₅₀)。化驗Influenza A/Sydney/5/97和B/Harbin/7/95病毒並將結果示於表1。在WO 00/55149中明確揭示之化合物和化合物A之對照數據亦示於表1。

表 1

	ID ₅₀ 微克/毫升	ID ₅₀ 微克/毫升
敘述	A/Sydney/5/97+	B/Harbin/7/95
化合物A	0.023+/-0.024	0.013+/-0.011
實例1	0.084	0.0002
實例4	>0.100	<0.00005
實例8	0.013	<0.00005
實例9	>0.100	0.00008
編號8*化合物	0.0007, 0.0005	0.007+/-0.01
編號10*化合物	0.057	>0.1

*如 WO 00/55149所引用般

+ 在 WO 00/55149 中提供之數據係關於病毒 H₃N₂ 隔離 A/Victoria/3/75 而非 H₃N₂ 隔離 A/Sydney/5/97。當比較此類數據時，諳熟此藝者將瞭解當活體外分析數種不同病毒時，抗病毒效力對於既定化合物並不常見。例如，Woods 等人 (Antimicrob Agents Chemother 1993 37:1473-9) 已經提出化合物 A 在包括最近臨床隔離的活體外化驗中呈現廣泛 EC₅₀ 值 (從 0.02 至 0.16 微莫耳)。因此，吾人發現化合物 8 對於包括最近流行性感胃 A H₃N₂ 隔離 A/Sydney/5/97 之 CPE 化驗較對於早期 H₃N₂ 隔離 A/Victoria/3/75 更具效力。

表 1 中提供之數據說明，化合物 E1-E5 除了實質上較高活性化合物 A 更具效力之外，對於抗 A/Sydney/5/97 甚至更具效力，且實質上對於抗最近的流行性感胃 B 隔離 B/Harbin/7/95 的效力更勝於抗 WO 00/55149 之化合物 8 和 10。

實例 11：斑還原反應化驗

將 Madin Darby 腎細胞 (MDCK) 植入六孔組織培養皿並經由標準方法成長至融合。將流行性感胃病毒以最低量經補充 0.2% 牛血清蛋白之磷酸鹽緩衝鹽水稀釋，產生每孔 50-100 形斑單元 (pfu) 之估計力價。於 5% CO₂ 大氣中在 37°C 吸收至 MDCK 細胞後，抽取病毒接種物並以含足量瓊脂或瓊脂糖 (通常 1-2%) 之病毒成長介質 (經補充適當動之 BSA、胰蛋白和胰島素/輪鐵蛋白/硒之 Eagle's 介質) 取代，造成介質在 5% CO₂ 大氣中於 37°C 在室溫時膠凝直到發展斑 (通常 2-4 天)。斑能夠在計算前以適當染劑 (例如 0.4% 鹽水形式晶體紫羅蘭) 視

覺化。抗病毒效力係以使未經處理控制值的斑數降低50%之測試物件濃度(EC_{50})表示。)

實例	EC_{50} ng/ml					
	PRA					
	A/WSN*	A/Vic*	A/Syd*	A/New*	A/Pan*	A/Bay*
化合物A	56, >100	5.5+/-8.2	2.4	0.27, 0.23	27, 3	35
化合物8		0.003	0.19, >1	0.0001		
化合物9	<0.0001, 0.001	0.000141, 0.038	3.7	0.003	1.8, >10	>1
金剛烷胺		220		11	157	
奧斯他偉		0.11		0.23	0.3	

* A/WSN/33 BVLV09 (H1N1)

A/Victoria/3/75 BVLV017 (H3N2)

A/Sydney/5/97 BVLV015 (H3N2)

A/New Caledonia/20/99 BVLV008 (H1N1)

A/Panama/2007/99 BVLV008 (H3N2)

A/Bayem/7/95 BVL006 (H1N1)

實例	EC_{50} ng/ml			
	PRA			
	B/Vic*	B/Harb*	B/HongK*	B/Yam*
化合物1	3, 20	0.19	21 +/- 6	0.2, 3.1
化合物8	0.01, 0.2	<0.0001		0.02
化合物9			0.23	0.006
金剛烷胺			>10000	2061
奧斯他偉			32	0.7

* B/Victoria/1/67

B/Hong Kong/5/72 BVLV012

B/Harbin/7/95 BVLV008

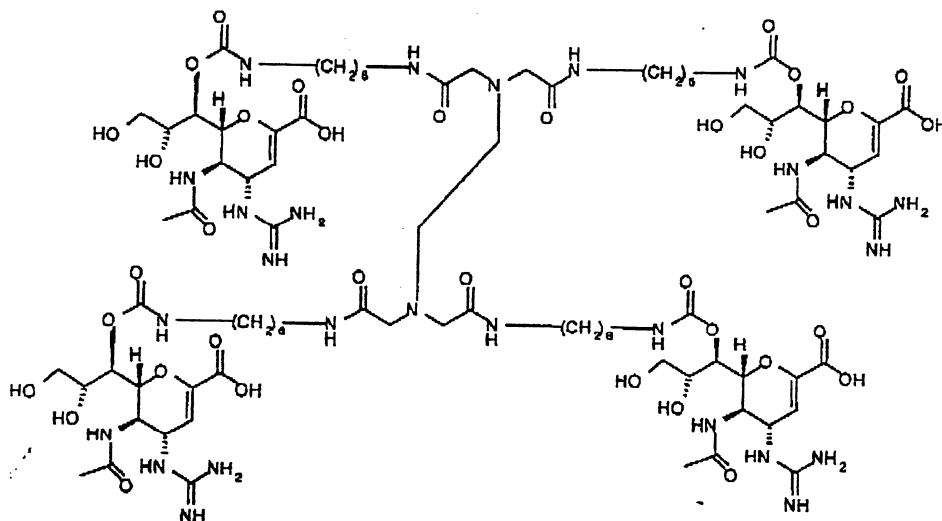
B/Yamansshi/166/98 BVLV007

實例 12：長作用時間之評比

將老鼠麻醉並以0.8毫升/公斤之劑量體積藉氣管內路徑

配藥有興趣的化合物。其後將老鼠保持垂直姿勢直到達到完全恢復。在不同時間點時，例如配藥後2、8、24和48小時，以分析法評比肺組織內之化合物量。可以使用任何適於偵測此型化合物之分析法。化合物量低於經確認分析技術敏感度的時間將決定化合物在肺中的滯留時間。

以下展示所選擇化合物之大鼠肺部滯留數據。請注意所有實驗包括共同配藥之內標準(即國際專利公告第WO 02/20514號之化合物3)以容許比較。該數據係以相對於此化合物之比例表示，其結構如下。



化合物 3

包括化合物 A 之數據以供比較目的。當以化合物濃度對標準濃度之比例比較時，本發明之化合物之 7 天滯留重要地大於化合物 A。

大 鼠 肺 部 滯 留 時 間 化 驗 結 果

時間點	化合物	劑量	(cmpd)	平均 (cmpd)	(PCT AU01/01128 化合物3)	平均(PCT AU01/01128 化合物3)	比例平均 [肺]
小時		mg/kg	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	[cmpd]/PCT AU01/01128 化合物3)
48	實例2	0.1	740		1944		
48	實例2	0.1	667	603	1258	1366	0.44
48	實例2	0.1	403		894		
168	實例2	0.1	350		807		
168	實例2	0.1	172	259	653	755	0.34
168	實例2	0.1	254		804		
48	實例9	0.1	570		1346		
48	實例9	0.1	2389	1405	4101	2710	0.52
48	實例9	0.1	1255		2684		
168	實例9	0.1	724		1486		
168	實例9	0.1	465	835	1253	1849	0.45
168	實例9	0.1	1317		2806		
48	化合物A (zanamivir)	0.1	421		698		
48	化合物A (zanamivir)	0.1	369	352	1901	1368	0.26
48	化合物A (zanamivir)	0.1	267		1507		
168	化合物A (zanamivir)	0.1	91		815		
168	化合物A (zanamivir)	0.1	47	61	925	750	0.08
168	化合物A (zanamivir)	0.1	45		512		

時間點	化合物	劑量	(肺)	平均(肺)	比例平均[肺]
小時		mg/kg	ng/g	ng/g	[cmpd]/PCT AU01/01128 化合物3
48	PCT AU01/01128化合物3	0.4	-		
48	PCT AU01/01128化合物3	0.4	3689	311	-
48	PCT AU01/01128化合物3	0.4	2534		
168	PCT AU01/01128化合物3	0.4	1205		
168	PCT AU01/01128化合物3	0.4	-	1491	-
168	PCT AU01/01128化合物3	0.4	1777		
48	實例8	0.4	3795		
48	實例8	0.4	2704	3253	1.05
48	實例8	0.4	3259		
168	實例8	0.4	-		
168	實例8	0.4	3234	3403	2.28
168	實例8	0.4	3571		

實例 13：長作用時間和效力之替代評比

使老鼠感染的程序已經在先前敘述(1-4)。將溫和麻醉的老鼠接種流行性感冒病毒。

治療步驟和攝生。

在感染前定時施藥單一劑量之化合物達10天(較佳在感染前4-7天)，或感染後(較佳在感染後立即)並多達感染後48小時。在大部份實驗中，係使用一種非致死性流行性感冒株，並藉由肺病毒力價降低而評比效力。對於在感染前給予化合物之老鼠而言，係將肺部在第一天移除或在感染後數天時移除，較佳在感染後1-4天。使用已建立之方法和估計之病毒負載力價化驗均質化之肺樣品，並相較於未經治療之老鼠肺內的病毒力價。

在使用適於老鼠之致死性流行性感冒株的實驗中，效力

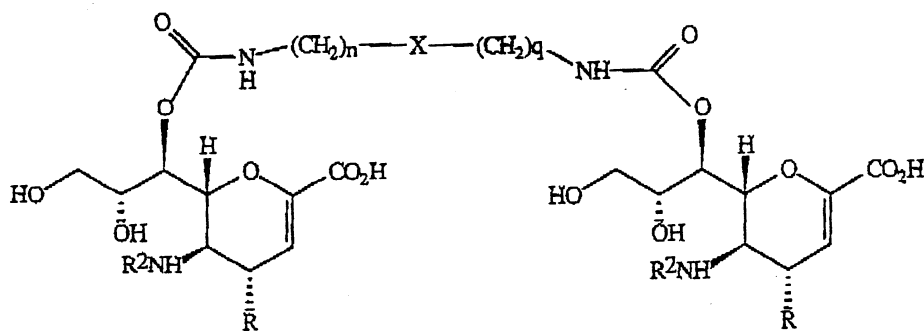
係藉由相較於未治療的老鼠存活率及/或生還者的數字增加而評比。

參考資料

1. Ryan, D.M., J. Ticehurst, M.H. Dempsey, and C.R. Penn, 1994. Inhibition of influenza virus replication in mice by GG167 (4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) is consistent with extracellular activity of viral neuraminidase (sialidase). *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38 (10):2270-2275.
2. von Itzstein M., W. -Y. Wu, G.B. Kok, M. S. Pegg, J.C. Dyason, B. Jin, T.V. Phan, M.L. Smythe, H.F. White, S.W. Oliver, P.M. Colman, J.N. Varghese, D.M. Ryan, J.M. Woods, R.C. Bethell, V.J. Hogham, J.M. Cameron, and C.R. Penn. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature (London)* 363:418-423.
3. Woods, J.M., R.C. Bethell, J.A.V. Coates, N. Healey, S.A. Hiscox, B.A. Pearson, D.M. Ryan, J. Ticehurst, J. Tilling, S.A. Walcott, and C.R. Penn. 1993. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1473-1479.
4. Robert J Fenton, Peter J Morley, Ian J Owens, David Gower, Simon Parry, Lee Crossman and Tony Wong (1999). Chemoprophylaxis of influenza A virus infections, with single doses of zanamivir, demonstrates that zanamivir is cleared slowly from the respiratory tract. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43, 11, 2642-2647.

肆、中文發明摘要

本發明係關於通式(I)之化合物：



(I)

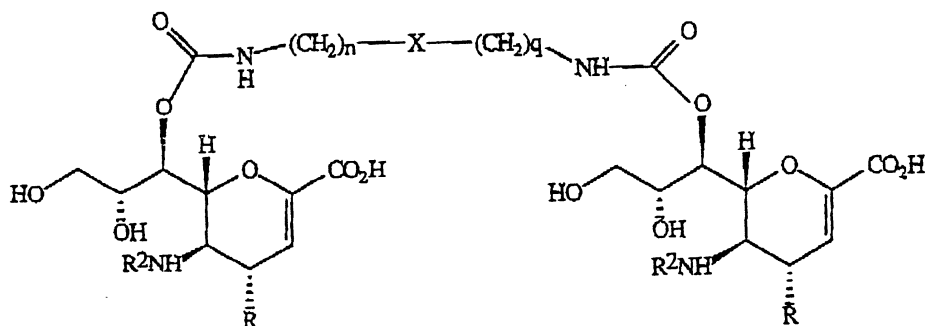
(其中

R是胺基或胍基；

R²是乙酰基或三氟乙酰基；

伍、英文發明摘要

The invention relates to compounds of general formula (I):



(I)

in which

R is an amino or guanidino group;

R² is acetyl or trifluoroacetyl;

n and q are either the same or different and selected from 0, 1 or 2; and

n是q為相同或相異，並選自0、1或2；且

X係視需要經取代之苯基、視需要經取代之萘基或視需要經取代之苯基-Y-視需要經取代之苯基，其中Y是選自共價鍵、CH₂、CH₂CH₂、O或SO₂，

或其醫藥上可接受之衍生物(限制條件為，當X是苯基或萘基時，n和q皆是2，以及當X為苯基-Y-苯基，其中Y是共價鍵時，則n和q不均為0)，

其製備方法、含該化合物之醫藥調配物或其於預防或治療病毒感染之用途。

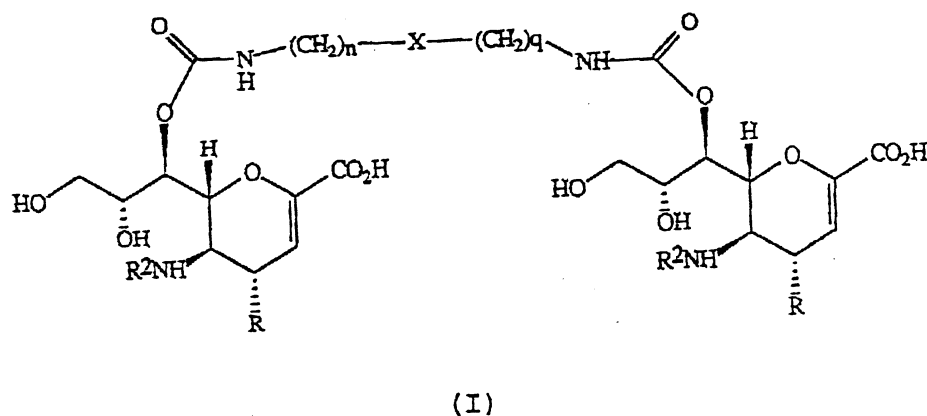
X is an optionally substituted phenyl, optionally substituted naphthyl or optionally substituted phenyl-Y- optionally substituted phenyl in which Y is selected from a covalent bond, CH₂, CH₂CH₂, O or SO₂,

or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, with the proviso that when X is phenyl or naphthyl, n and q are both 2 and when X is phenyl-Y-phenyl in which Y is a covalent bond, then n and q are not both 0,,

methods for their preparation, pharmaceutical formulations containing them or their use in the prevention or treatment of a viral infection.

拾、申請專利範圍

1. 一種通式 (I) 之化合物：



其中

R 是胺基或胍基；

R² 是乙醯基或三氟乙醯基；

n 是 q 為相同或相異，並選自 0、1 或 2；且

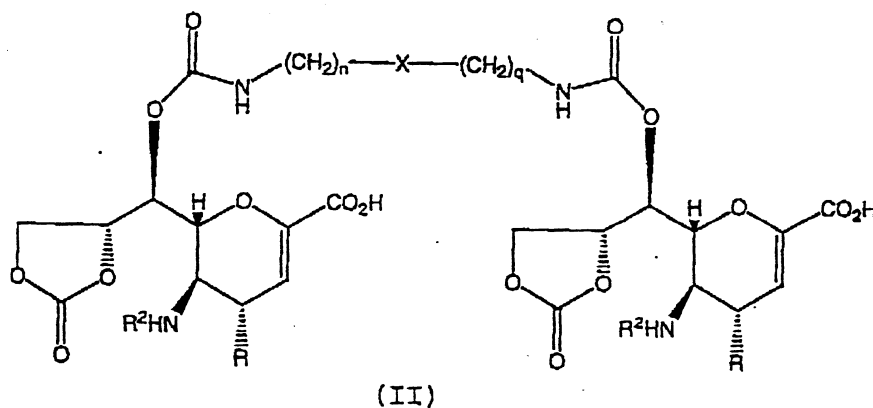
X 係視需要經取代之苯基、視需要經取代之萘基或視需要經取代之苯基-Y-視需要經取代之苯基，其中 Y 是選自共價鍵、CH₂、CH₂CH₂、O 或 SO₂，

或是其醫藥可接受之衍生物（限制條件為，當 X 是苯基或萘基時，n 和 q 皆是 2，以及當 X 為苯基-Y-苯基，其中 Y 是共價鍵時，則 n 和 q 均為 0）。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R 是胍基。
3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物，其中 R² 是乙醯基。
4. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物，其中 n 和 q 相同。
5. 根據申請專利範圍第 4 項之化合物，其中在 X 上之選擇性取代基是烷氧基。
6. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物，其係一種在羧基官能、羥基官能、胺基或胍基中一處或多處改質之衍生

物。

7. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中該衍生物係一種烷基酯、芳基酯或乙醯酯。
8. 一種製備根據申請專利範圍第1或2項之式(I)之化合物的方法，其包括將化學式(II)之化合物去保護的步驟。



其中R、R²、n、q和x係如申請專利範圍第1項所定義者。

9. 一種醫藥調配物，其包括根據申請專利範圍第1或2項之式(I)之化合物，或醫藥上可接受之鹽類或其衍生物，連同一種或多種醫藥上可接受之載劑。
10. 根據申請專利範圍第9項之醫藥調配物，其尚包括一種或多種其它治療及/或預防成份。
11. 根據申請專利範圍第10項之醫藥調配物，其中該其它治療及/或預防成份是一種抗感染劑。
12. 根據申請專利範圍第11項之醫藥調配物，其中該抗感染劑係一種抗病毒或抗菌劑。
13. 根據申請專利範圍第12項之醫藥調配物，其中該抗菌或抗病毒劑係用以治療呼吸系感染者。
14. 根據申請專利範圍第13項之醫藥調配物，其中該劑係任

娜密威(zanamivir)、奧斯他偉(oseltamivir)、金剛烷胺、金剛乙胺、瑞比達(ribavirin)及/或芙路發斯(FluVax)。

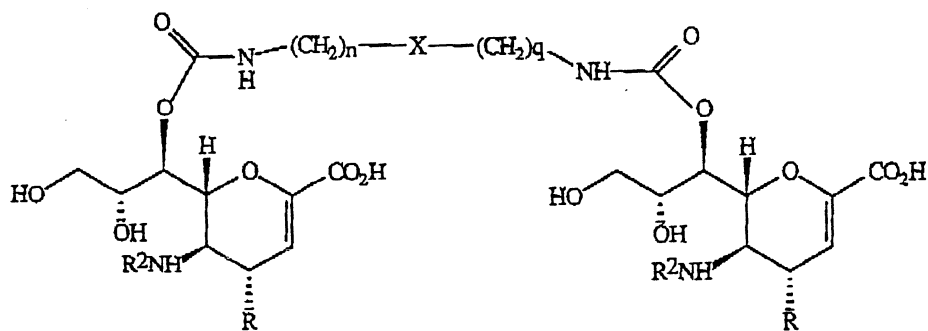
15. 一種吸入劑，其包括根據一申請專利範圍第1或2項之化合物或一根據申請專利範圍第9項之調配物。
16. 根據申請專利範圍第15項之吸入劑，其係適於如自由流動粉末狀之口服施藥。
17. 根據申請專利範圍第15項之吸入劑，其係一種計量配藥之氣溶膠吸入劑。
18. 一種預防或治療病毒感染之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第1或2項所定義之式(I)之化合物。
19. 根據申請專利範圍第18項之醫藥組合物，其中該病毒感染是一種原黏液病毒或副黏液病毒感染。
20. 根據申請專利範圍第18或19項之醫藥組合物，其中該病毒感染是一種流行性感冒A或B感染、副流行性感冒、流型性腮腺炎或新城症。
21. 根據申請專利範圍第18或19項之醫藥成份，其係藉吸入法、吹氣法或鼻內或其結合方法施藥至呼吸道。
22. 一種根據申請專利範圍第1或2項所定義之式(I)之化合物之用途，其係用於製造預防或治療病毒感染之藥物。
23. 一種根據申請專利範圍第1或2項所定義之式(I)之化合物之用途，其係用於預防或治療病毒感染。
24. 一種根據申請專利範圍第1或2項所定義之式(I)之化合物之用途，其係作為抗病毒劑。
25. 一種偵測病毒感染之活體外方法，其包括將根據申請專

利範圍第1或2項所定義之式(I)之化合物接觸被懷疑包含病毒之樣品的步驟。

陸、(一)、本案指定代表圖為：第_____圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(I)