

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96127306

C07P 403/12 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

※申請日期：96.7.26

※IPC 分類：~~C07D, A61K~~ A61K 31/506 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

趨化因子受體活性調節劑、結晶型及方法

A61P 9/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

MODULATORS OF CHEMOKINE RECEPTOR ACTIVITY,

CRYSTALLINE FORMS AND PROCESS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商必治妥美雅史谷比公司

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

代表人：(中文/英文)

蘇珊 E. 芭芭可

BABAJKO, SUZANNE E.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國紐澤西州普林斯頓市第 206 號州線路第 4000 號郵政信箱

P.O. BOX 4000, ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD,

PRINCETON, NEW JERSEY 08543-4000, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 麥可 G. 楊

YANG, MICHAEL G.

2. 羅伯 J. 謝尼

CHERNEY, ROBERT J.

3. 馬丁 D. 伊思特蓋特

EASTGATE, MARTIN D.

4. 斯娃 約斯尤拉 普拉沙德

PRASAD, SIVA JOSYULA

5. 肖自力

XIAO, ZILI

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.

2. 美國 U.S.A.

3. 英國 U.K.

4. 美國 U.S.A.

5. 中華人民共和國 P.R.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年07月28日；60/834,235
2. 美國；2007年03月21日；60/896,026
3. 美國；2007年07月25日；11/782,704

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

() 國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

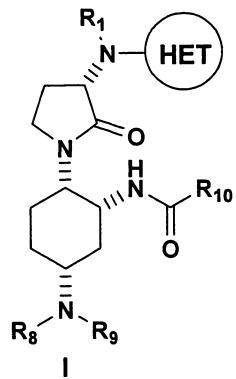
所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案係主張個別得自 2006 年 7 月 28 日與 2007 年 3 月 21 日提出申請之美國臨時申請案號 60/834,235 與 60/896,026 之優先權，此兩案之揭示內容均併於本文供參考。

【發明所屬之技術領域】

本發明係提供 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺或其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前體藥物，其具有所要藥理學特性之令人意外組合。亦提供本發明之結晶型。含有彼等之醫藥組合物，及使用彼等作為藥劑以治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病之方法，亦為本發明之目的。本揭示內容亦提供製備式(I)化合物之方法，該化合物包括 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺：



其中 R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} 及 均如本文中所述。本文亦提供一些化合物，其係為此方法之有用中間物。

【先前技術】

趨化因子為分子量 6-15 kDa 之趨化性細胞活素，其係藉由

極多種細胞釋出，以在其他細胞類型中，特別吸引及活化巨噬細胞、T 與 B 淋巴細胞、嗜伊紅細胞、嗜鹼細胞及嗜中性白血球(回顧於：Charo 與 Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621；Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445；及 Rollins, *Blood* 1997, 90, 909-928 中)。有兩種主要趨化因子種類，CXC 與 CC，依在胺基酸順序中之最初兩個半胱胺酸是被單一胺基酸分隔(CXC)或者為相鄰(CC)而定。CXC 趨化因子，譬如間白血球活素-8(IL-8)、嗜中性白血球活化蛋白質-2(NAP-2)及黑色素瘤生長刺激活性蛋白質(MGSA)，主要是對嗜中性白血球與 T 淋巴球具趨化性，而 CC 趨化因子，譬如 RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、單細胞趨化性蛋白質(MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 及 MCP-5)及曙塔新素(eotaxin)(-1 與 -2)，在其他細胞類型中，特別是對巨噬細胞、T 淋巴球、嗜伊紅細胞、樹突細胞及嗜鹼細胞具趨化性。亦有趨化因子，趨淋巴素-1、趨淋巴素-2(兩者均為 C 趨化因子)及富來客托活素(fractalkine)(CX₃C 趨化因子)存在，其並未落在任一種主要趨化因子亞族群中。

此等趨化因子係結合至歸屬於 G-蛋白質偶合之七跨膜功能部位蛋白質族群之專一細胞表面受體(回顧於：Horuk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 15, 159-165 中)，其係被稱為"趨化因子受體"。在結合其同系配位體時，趨化因子受體會轉導胞內訊息，經過所締合之三聚 G 蛋白質，而在其他回應中，特別造成胞內鈣濃度之快速增加，細胞形狀上之改變，增加細胞黏連分子之表現，去顆粒化作用及細胞潛移之促進作

用。有至少十種人類趨化因子受體會對CC趨化因子結合或回應，其具有下列特徵型式：(回顧於Zlotnik與Oshie *Immunity* **2000**, 12, 121)：CCR-1（或"CKR-1"或"CC-CKR-1"）[MIP-1 α 、MCP-3、MCP-4、RANTES] (Ben-Barruch等人, *Cell* **1993**, 72, 415-425, 與Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445)；CCR-2A與CCR-2B（或"CKR-2A"/"CKR-2B"或"CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B"）[MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2752-2756, 與Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445)；CCR-3（或"CKR-3"或"CC-CKR-3"）[曙塔新素-1, 曙塔新素-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere等人, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 16491-16494, 與Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445)；CCR-4（或"CKR-4"或"CC-CKR-4"）[TARC, MDC] (Power等人, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 19495-19500, 與Luster, *New Eng. J. Med.* **1998**, 338, 436-445)；CCR-5（或"CKR-5"或"CC-CKR-5"）[MIP- α , RANTES, MIP-1 β] (Sanson等人, *Biochemistry* **1996**, 35, 3362-3367)；CCR-6（或"CKR-6"或"CC-CKR-6"）[LARC] (Baba等人, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14893-14898)；CCR-7（或"CKR-7"或"CC-CKR-7"）[ELC] (Yoshie等人, *J. Leukoc. Biol.* **1997**, 62, 634-644)；CCR-8（或"CKR-8"或"CC-CKR-8"）[I-309] (Napolitano等人, *J. Immunol.*, **1996**, 157, 2759-2763)；CCR-10（或"CKR-10"或"CC-CKR-10"）[MCP-1, MCP-3] (Bonini等人, *DNA and Cell Biol.* **1997**, 16, 1249-1256)；及CCR-11 [MCP-1, MCP-2及MCP-4] (Schweickert等人, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 90550)。

除了哺乳動物趨化因子受體以外，已証實哺乳動物巨細

胞病毒、疱疹病毒及痘病毒，會在受感染細胞中表現蛋白質，而具有趨化因子受體之結合性質（回顧於：Wells 與 Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 741-748）。人類CC趨化因子，譬如RANTES與MCP-3，可造成鈣經由此等經病毒編碼受體之快速移動。受體表現可經由使正常免疫系統監督及對感染之回應遭到破壞，而隨意感染。此外，人類趨化因子受體，譬如CXCR4、CCR2、CCR3、CCR5及CCR8，可充作哺乳動物細胞被微生物（與例如人類免疫不全病毒(HIV)一樣）感染之共受體。

趨化因子及其同源受體，係牽涉作為炎性、感染性及免疫調節病症與疾病之重要介體，包括氣喘與過敏性疾病，以及自身免疫病理學疾病，譬如風濕性關節炎與多發性硬化；及代謝疾病，譬如動脈粥瘤硬化與糖尿病（回顧於：Charo 與 Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621；Z. Gao 與 W. A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733；P. H. Carter, 化學生物學上之現行見解 2002, 6, 510；Trivedi 等人, *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191；Saunders 與 Tarby, *Drug Disc. Today* 1999, 4, 80；Premack 與 Schall, *Nature Medicine* 1996, 2, 1174 中）。例如，趨化因子單細胞化學吸引劑-1(MCP-1)及其受體CC趨化因子受體2(CCR-2)，係在吸引白血球至發炎位置及在接著活化此等細胞上，扮演樞軸角色。當趨化因子MCP-1結合至CCR-2時，其會引致胞內鈣濃度之快速增加，增加細胞黏連分子之表現，及白血球潛移之促進作用。MCP-1/CCR-2交互作用之重要性之實例說明，已藉由使用以基因方式變性老鼠之實驗提供。

MCP-1^{-/-}老鼠在數種不同類型之免疫激發後，不能夠添補單細胞至發炎位置 (Bao Lu 等人, *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601)。同樣地，當以各種外源劑激發時，CCR-2^{-/-}老鼠不能夠添補單細胞或產生干擾素-γ；再者，無 CCR-2 老鼠之白血球不會回應 MCP-1 而潛移 (Landin Boring 等人, *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552)，於是証實 MCP-1/CCR-2 交互作用之專一性。兩個其他集團已獨立報告使用不同品系之 CCR-2^{-/-}老鼠之相當結果 (William A. Kuziel 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053，與 Takao Kurihara 等人, *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757)。MCP-1^{-/-}與 CCR-2^{-/-}動物之存活力與一般正常健康狀況是值得注意的，因為 MCP-1/CCR-2 交互作用之瓦解不會引致生理驟變。一起採用此等資料，導致之結論是，會阻斷 MCP-1/CCR2 作用之分子將可用於治療多種炎性與自身免疫病症 (回顧於：M. Feria 與 F. Diaz-Gonzalez, *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49；與 J. Dawson, W. Miltz 及 C. Wiessner, *C. Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35)。此項假說目前已在多種不同動物疾病模式中被確認，如下文所述。

已知 MCP-1 係在患有風濕性關節炎之病患中被向上調節 (Alisa Koch 等人, *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 772-779)。再者，數項臨証前研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療風濕性關節炎上之潛在治療價值。使 MCP-1 編碼之 DNA 疫苗最近已証實會改善大白鼠中之慢性多佐劑所引致之關節炎 (Sawsan Youssef 等人, *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 361)。同樣地，疾病徵候可經由對具有膠原所引致關節炎 (Hiroomi Ogata 等人,

J. Pathol. 1997, 182, 106) 或鏈球菌細胞壁所引致關節炎 (Ralph C. Schimmer 等人, *J. Immunol.* 1998, 160, 1466) 之大白鼠直接投予 MCP-1 用之抗體而加以控制。可能最顯著的是, MCP-1、MCP-1 (9-76) 之一種肽拮抗劑, 經証實在關節炎之 MRL-lpr 老鼠模式中, 會防止疾病開始及降低疾病徵候 (依投藥時間而定) (Jiang-Hong Gong 等人, *J. Exp. Med.* 1997, 186, 131)。再者, 已証實小分子 CCR2 拮抗劑之投藥, 會在關節炎之齧齒動物模式中, 降低臨床評分 (C. M. Brodmerkel 等人, *J. Immunol.* 2005, 175, 5370; 與 M. Xia 等人, 美國專利申請案 0069123, 2006)。抗 CCR2 抗體之投藥對老鼠 CIA 具有不同作用, 依投藥時間而定 (H. Bruhl 等人, *J. Immunol.* 2004, 172, 890)。使用 CCR2-/- 老鼠之最近研究, 已指出 CCR2 之缺失可在特定實驗情況中使齧齒動物關節炎模式更為惡化 (M. P. Quinones 等人, *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 856; M. P. Quinones 等人, *J. Mol. Med.* 2006, 84, 503)。

已知 MCP-1 係在動脈粥瘤硬化性損害中被向上調節, 且已証實 MCP-1 之循環含量係經由以治療劑治療而被降低 (Abdolreza Rezaie-Majd 等人, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 1194-1199)。數項關鍵研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用, 在治療動脈粥瘤硬化上之潛在治療價值。例如, 當 MCP-1 -/- 老鼠與缺乏 LDL 受體之老鼠雜交時, 發現主動脈脂質沉積上之 83% 降低 (Long Gu 等人, *Mol. Cell* 1998, 2, 275)。同樣地, 當 MCP-1 以基因方式自己過度表現人類載脂蛋白 B 之老鼠中切除時, 相對於 MCP-1 +/+ apoB 對照老鼠, 所形成之老鼠係被保護而免於動脈粥瘤硬化性損害形成 (Jennifa

Gosling 等人, *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 773)。同樣地, 當 CCR-2 -/- 老鼠與載脂蛋白E -/- 老鼠雜交時, 發現顯著降低動脈粥瘤硬化性損害之發生率(Landin Boring 等人, *Nature* 1998, 394, 894; T.C. Dawson 等人 *動脈粥瘤硬化* 1999, 143, 205)。最後, 當載脂蛋白E -/- 老鼠被投予一種使 CCR2 之肽拮抗劑編碼之基因時, 則損傷大小係被降低, 且斑點安定性係被增加(W. Ni 等人 *Circulation* 2001, 103, 2096-2101)。得自 CCR2-/- 老鼠之骨髓移植至 ApoE3-Leiden 老鼠中, 會抑制早期致粥瘤性(J. Guo 等人, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 447), 但對已發展之損傷係具有最小作用(J. Guo 等人, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 1014)。

患有第2型糖尿病之病患典型上係顯示胰島素抗藥性, 作為該疾病之正字標記特徵之一。胰島素抗藥性亦與稱為"代謝徵候簇"或"徵候簇X"之異常族群有關聯, 該族群包括肥胖、動脈粥瘤硬化、高血壓及脂血症障礙(回顧於: Eckel 等人, *Lancet* 2005, 365, 1415 中)。充分明瞭的是, 發炎係在使第2型糖尿病與"徵候簇X"病理學疾病中之疾病過程更為惡化上扮演一項角色(回顧於: Chen, *藥理學研究* 2006, 53, 469; Neels 與 Olefsky, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 33; Danadona 與 Aljada, *Am J Cardiol.* 2002 90, 27G-33G; Pickup 與 Crook, *Diabetologia* 1998, 41, 1241 中)。MCP-1 係被認定為在肥胖引致之胰島素抗藥性上扮演一項角色。在培養物中, 人類前脂肪細胞係於構成上表現 MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology* 2001, 175, 81)。CCR2 係被表現於脂肪細胞上; 於活體外, 添加 MCP-1 至經分化之

脂肪細胞中，會降低經胰島素刺激之葡萄糖吸收與數種脂肪生成基因 (LpL, adipsin, GLU-4)、aP2、 β 3-腎上腺素能受體及 PPAR γ 之表現 (P. Sartipy 與 D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 6902)。患有第 2 型糖尿病之病患具有比非糖尿病對照組較大含量之循環 MCP-1 (S. Nomura 等人, *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 121, 437)，且 MCP-1 自脂肪組織之釋出可經由以抗糖尿病治療劑譬如二甲雙胍 (metformin) 或噻唑啶二酮之治療而被降低 (J. M. Bruun 等人 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 2282)。

同樣地，MCP-1 亦被過度表現於肥胖之老鼠實驗模式中，且主要係藉由脂肪組織產生 (Sartipy 與 Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 7265)。在肥胖老鼠中，MCP-1 之表現既在胰島素抗藥性開始之前，又與其同時地發生 (H. Xu 等人, *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821)。另一項研究証實 MCP-1 之表現係與老鼠生殖腺周圍脂肪組織中之身體質量有正關聯性 (Weisberg 等人 *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796)。與此等數據一致，胰島素抗藥性在 db/db 老鼠中之發展係無論是經由 MCP-1 之基因缺失，或藉由顯性負肽之基因所引致表現而被改善 (H. Kanda 等人 *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1494)。邏輯倒轉亦可被証實：MCP-1 在脂肪組織中之過度表現會促進胰島素抗藥性 (N. Kamei 等人, *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 26602)。証實 MCP-1 之基因缺失不會在 db/db 老鼠中達成胰島素抗藥性之一項衝突結果亦已出現 (F. Y. Chow 等人, *Diabetologia* 2007, 50, 471)。與關於 MCP-1 之數據一致，使用 CCR2 (MCP-1 受體) 之直接研究已証實其在肥胖之形成與肥胖所引致之胰島素抗藥性上扮演一

項角色。高脂肪膳食之維持會在野生型 (C. L. Tsou 等人, *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 902) 與 ApoE^{-/-} 老鼠 (F. Tacke 等人, *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 185) 兩者中增加循環 CCR2⁺ 炎性單細胞之數目。CCR2 之基因缺失會減少老鼠脂肪組織中之經活化巨噬細胞之數目 (C. N. Lumeng 等人, 糖尿病 2007, 56, 16)，但不會影響被認為會保持 "纖瘦" 狀態之 M2 脂肪巨噬細胞之個體群 (C. N. Lumeng 等人, *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 175)。CCR2 之基因缺失會在飲食引致之肥胖模式中，降低飲食引致之肥胖，且改善胰島素敏感性 (S. P. Weisberg 等人, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115; P Cornelius, RP Gladue, RS Sebastian, WO 專利 2006/013427 A2, 2006)，依實驗條件而定 (A. Chen 等人, *Obes. Res.* 2005, 13, 1311)。小分子 CCR2 拮抗劑之投藥亦會在此相同模式中改善胰島素敏感性 (S. P. Weisberg 等人, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115)。

兩項研究係描述 CCR2 在高血壓引致之血管發炎、改造及肥大上之重要角色 (E Bush 等人, *Hypertension* 2000, 36, 360; M Ishibashi 等人, *Circ. Res.* 2004, 94, 1203)。

已知 MCP-1 係在人類多發性硬化中被向上調節，且已証實使用干擾素 β -1b 之有效療法會降低末梢血液單核細胞中之 MCP-1 表現，這指出 MCP-1 係在疾病進展上扮演一項角色 (Carla Iarlari 等人, *J. Neuroimmunol.* 2002, 123, 170-179)。其他研究已証實 MCP-1/CCR-2 交互作用之拮抗作用，在治療多發性硬化上之潛在治療價值；所有此等研究已在實驗性自身免疫腦脊髓炎 (EAE) 中被証實，其係為多發性硬化之習用動物模式。對 MCP-1 之抗體，投予具有 EAE 之動物，係顯著地減少

疾病復發(K. J. Kennedy等人, *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 98)。再者, 兩份報告已証實CCR-2 -/- 老鼠對於EAE具抵抗性(B. T. Fife等人, *J. Exp. Med.* 2000, 192, 899; L. Izikson等人, *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1075)。後續報告係藉由檢驗來自不同品系之老鼠中CCR2缺失之作用, 以延伸此等最初觀察(S. Gaupp等人, *Am. J. Pathol.* 2003, 162, 139)。值得注意的是, 小分子CCR2拮抗劑之投藥亦會在C57BL/6老鼠中使疾病進展變得遲鈍(C. M. Brodmerkel等人, *J. Immunol.* 2005, 175, 5370)。

已知MCP-1係在肺臟移植後發展閉塞性細枝氣管炎徵候簇之病患中被向上調節(Martine Reynaud-Gaubert等人, 心臟與肺臟移植期刊, 2002, 21, 721-730; John Belperio等人, *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。在閉塞性細枝氣管炎徵候簇之老鼠模式中, 對MCP-1之抗體之投藥會導致氣道閉塞之減弱; 同樣地, CCR2 -/- 老鼠在此相同模式中對於氣道閉塞具抵抗性(John Belperio等人, *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556)。此等數據指出, MCP-1/CCR2之拮抗作用可有益於治療移植後之器官排斥。此外, 研究已証實MCP-1/CCR2軸之瓦解係能夠延長胰島移植植物之存活(I Lee等人 *J Immunol* 2003, 171, 6929; R Abdi等人, *J Immunol* 2004, 172, 767)。在大白鼠移植模式中, CCR2與MCP-1係經証實在發展移植植物脈管病之移植植物中被向上調節(K Horiguchi等人, *J Heart Lung Transplant.* 2002, 21, 1090)。在另一項研究中, 抗-MCP-1基因療法會減弱移植植物脈管病(A Saiura等人, *Artherioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24, 1886)。一項研究係描述藉由MCP-1之阻斷, 抑制實驗靜脈移植植物新血管內

膜形成 (H Tatewaki 等人, *J Vasc Surg.* 2007, 45, 1236)。

其他研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療氣喘上之潛在治療價值。在卵清蛋白激發之老鼠中，MCP-1 與中和抗體之多價螯合作用，會造成枝氣管高回應性與發炎之顯著降低 (Jose-Angel Gonzalo 等人, *J. Exp. Med.* 1998, 188, 157)。已証實可以經過對 MCP-1 之抗體之投藥，在曼氏裂體吸蟲 (*Schistosoma mansoni*) 卵激發之老鼠中降低過敏性氣道發炎 (Nicholas W. Lukacs 等人, *J. Immunol.* 1997, 158, 4398)。與此一致，MCP-1 $-/-$ 老鼠顯示降低對於以曼氏裂體吸蟲卵激發之回應 (Bao Lu 等人, *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601)。

其他研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療腎臟疾病上之潛在治療價值。在絲球體性腎炎之老鼠模式中，MCP-1 用抗體之投藥，會造成顯著降低血管球新月體形成及第 I 型膠原之沉積 (Clare M. Lloyd 等人, *J. Exp. Med.* 1997, 185, 371)。此外，具有經引致之毒腎血清腎炎之 MCP-1 $-/-$ 老鼠，比其 MCP-1 $+/+$ 相對物，顯示顯著較少之管狀傷害 (Gregory H. Tesch 等人, *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73)。

數項研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療系統紅斑狼瘡上之潛在治療價值。CCR2 $^{-/-}$ 老鼠係在系統性紅斑狼瘡之老鼠模式中，相對於其 WT 相對物，顯示延長之存活期與降低之腎病 (G. Perez de Lema 等人 *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592)。此等數據係與關於 MCP-1 基因缺失之最近研究中所發現改善疾病之活性 (S. Shimizu 等人 *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch 等人, *J. Exp. Med.* 1999, 190,

1813)，或在狼瘡之齧齒動物模式中 CCR2 肽拮抗劑之投藥 (H. Hasegawa 等人，*關節炎與風濕病*, 2003, 48, 2555) 一致。

相對於未患病之迴腸， $CCR2^+$ 固有層淋巴細胞之顯著 30 倍增加係被發現於得自克隆氏病患之小腸中 (S. J. Connor 等人 *Gut* 2004, 53, 1287)。亦應注意的是，相對於對照組，在患有活性克隆氏病之病患中，於循環 $CCR2^+/CD14^+/CD56^+$ 單細胞之子集中有擴大現象。數項齧齒動物研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療克隆氏病/結腸炎上之潛在治療價值。 $CCR2^-/-$ 老鼠係被保護而免於葡聚醣硫酸鈉所引致結腸炎之作用 (Pietro G. Andres 等人, *J. Immunol.* 2000, 164, 6303)。CCR2、CCR5 及 CXCR3 之小分子拮抗劑 (老鼠結合親和力個別 = 24, 236 及 369 nM) 之投藥亦會保護抵抗葡聚醣硫酸鈉引致之結腸炎 (H. Tokuyama 等人 *Int. Immunol.* 2005, 17, 1023)。最後，MCP-1 $^-/-$ 老鼠係在結腸炎之附著素所引致模式中顯示實質上降低之結腸傷害 (巨觀與組織學兩者) (W. I. Khan 等人, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, G803)。

兩份報告描述 MCP-1 在患有炎性腸疾病之病患之腸上皮細胞與腸黏膜中之過度表現 (H. C. Reinecker 等人, *Gastroenterology* 1995, 108, 40，與 Michael C. Grimm 等人, *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59, 804)。

一項研究係描述 MCP-1 基因中之啟動子多晶型現象與硬皮病(系統硬化)之締合作用 (S Karrer 等人, *J. Invest. Dermatol.* 2005, 124, 92)。在組織纖維變性之相關模式中， $CCR2/MCP-1$

軸之抑制會降低在皮膚 (T Yamamoto 與 K Nishioka, *J Invest Dermatol.* 2003, 121, 510; AM Ferreira 等人, *J Invest Dermatol.* 2006, 126, 1900) 、肺臟 (T Okuma 等人, *J Pathol.* 2004, 204, 594; M Gharaee-Kermani 等人, *細胞活素* 2003, 24, 266) 、腎臟 (K Kitagawa 等人, *Am J Pathol.* 2004, 165, 237; T Wada 等人, *J Am Soc Nephrol* 2004, 15, 940) 、心臟 (S Hayashidani 等人, *Circulation* 2003, 108, 2134) 及肝臟 (S Tsuruta 等人, *Int J Mol Med.* 2004, 14, 837) 中之纖維變性。

一項研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療肺胞炎上之潛在治療價值。當具有 IgA 免疫複合肺臟傷害之大白鼠，以靜脈內方式使用經培養以抵抗大白鼠 MCP-1 (JE) 之抗體治療時，肺胞炎之徵候係被部份減輕 (Michael L. Jones 等人, *J. Immunol.* 1992, 149, 2147)。

數項研究已証實 MCP-1/CCR2 交互作用之拮抗作用，在治療癌症上之潛在治療價值 (回顧於 : M. J. Craig 與 R. D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 611; I. Conti 與 B. Rollins, *癌症生物學討論會* 2004, 14, 149; R. Giles 與 R. D. Loberg, *Curr. Cancer Drug Targets* 2006, 6, 659 中)。當帶有人類乳房癌細胞之免疫不全老鼠係以抗-MCP-1 抗體治療時，發現肺臟微轉移之抑制與存活期之增加 (Rosalba Salcedo 等人, *Blood* 2000, 96, 34-40)。使用人類臨床腫瘤試樣，CCR2 表現係與前列腺癌症進展有關聯 (Y. Lu 等人, *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, 676)。於活體外，MCP-1 表現已被証實會媒介前列腺癌細胞生長與侵入 (Y. Lu 等人, *Prostate* 2006, 66, 1311); 再者，藉由前列腺癌細胞表現之

MCP-1，會引致關於骨質耗損之人類骨髓原始粒子(Y. Lu等人, *Cancer Res.* 2007, 67, 3646)。

多項研究已描述MCP-1/CCR2交互作用之拮抗作用，在治療再狹窄上之潛在治療價值。在人類中，MCP-1含量係直接地與再狹窄之危險產生關聯(F. Cipollone等人, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 327)。缺乏CCR2或MCP-1之老鼠係顯示動脈損傷後之血管內膜面積與血管內膜/媒質比例之降低(相對於野生型小動物夥伴)(Merce Roque等人, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 554；A. Schober等人, *Circ. Res.* 2004, 95, 1125；W. J. Kim等人, *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310, 936)。在老鼠中，MCP-1之顯性負抑制劑在骨骼肌中之轉移感染(K. Egashira等人, *Circ. Res.* 2002, 90, 1167)亦會降低動脈損傷後之血管內膜增生。CCR2使用中和抗體之阻抑會於放置支架在靈長類動物中之後，降低新血管內膜增生(C. Horvath等人, *Circ. Res.* 2002, 90, 488)。

兩份報告描述具有經引致腦部創傷之MCP-1大白鼠之過度表現(J. S. King等人, *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127，與Joan W. Berman等人, *J. Immunol.* 1996, 156, 3017)。此外，研究已証實 $CCR2^{-/-}$ (O. B. Dimitrijevic等人, *Stroke* 2007, 38, 1345)與 $MCP-1^{-/-}$ 兩種老鼠(P. M. Hughes等人, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308)係被部份保護而免於絕血/再灌注損傷。

已知單細胞/巨噬細胞係在神經病原性疼痛之發展上扮演一項重要角色(Liu T, van Rooijen N, Tracey DJ, *Pain* 2000, 86, 25)。與此概念一致，關於CCR2在治療炎性與神經病原性兩

種疼痛上之潛在角色，已於最近經描述。CCR2^{-/-}老鼠，相對於其WT相對物，係顯示對炎性疼痛之改變回應，包括足底內福馬林注射後之降低疼痛行為，與足底內CFA注射後之稍微降低機械感覺異常(C. Abbadie等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 7947)。此外，CCR2^{-/-}老鼠並未於坐骨神經損傷後展示顯著之機械感覺異常。同樣地，小分子CCR2拮抗劑會在口服投藥後，降低機械感覺異常至損傷前程度之~80% (C. Abbadie, J. A. Lindia 及 H. Wang, WO PCT 110376, 2004)。

一項研究描述MCP-1在絕血性心肌病上之關鍵角色(N. G. rangogiannis等人, *Circulation* 2007, 115, 584)。另一項研究描述在MCP-1之抑制後，實驗心臟衰竭之減弱(S Hayashidani等人, *Circulation* 2003, 108, 2134)。

其他研究已提供MCP-1在未於上文提及之各種疾病狀態中被過度表現之証據。此等報告係提供相關証據顯示MCP-1拮抗劑可為此種疾病之有用治療劑。另一項研究已証實MCP-1在齧齒動物心臟同種移植植物中之過度表現，這指出MCP-1在移植植物動脈硬化之發病原理上之角色(Mary E. Russell等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6086)。MCP-1之過度表現，已被發現於患有自發性肺纖維變性病患之肺臟內皮細胞中(Harry N. Antoniades等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5371)。同樣地，MCP-1之過度表現已被發現於患有牛皮癬病患之皮膚中(M. Deleuran等人, *J. Dermatol. Sci.* 1996, 13, 228，與R. Gillitzer等人, *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101, 127)。與CCR2+細胞之優勢有相互關係之發現亦已被報告(C.

Vestergaard 等人, *Acta Derm. Venerol.* 2004, 84, 353)。最後，最近之報告已証實 MCP-1 係被過度表現於患有 HIV-1 有關聯癡呆症病患之腦部與腦脊髓液中 (Alfredo Garzino-Demo, WO 99/46991)。

此外，CCR2 多晶型現象已被証實至少在病患之一個子集中與肉狀瘤病有關聯 (P. Spagnolo 等人, *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, 168, 1162)。

亦應注意的是，CCR-2 已牽連作為一些 HIV 菌種之共受體 (B. J. Doranz 等人, *Cell* 1996, 85, 1149)。亦已測定出利用 CCR-2 作為 HIV 共受體，可與疾病進展產生關聯 (Ruth I. Connor 等人, *J. Exp. Med.* 1997, 185, 621)。此項發現係與最近之發現一致，後述發現係為 CCR-2 突變種 CCR2-64I 之存在，係與 HIV 在人類個體群中之延遲展開有正關聯性 (Michael W. Smith 等人, *Science* 1997, 277, 959)。雖然 MCP-1 未曾牽涉此等過程，但可能的情況是，經由結合至 CCR-2 而發生作用之 MCP-1 拮抗劑，可具有在 HIV 感染之病患中，延遲此疾病進展至 AIDS 之有利治療作用。

應注意的是，CCR2 亦為人類趨化因子 MCP-2、MCP-3 及 MCP-4 之受體 (Luster *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445)。由於本文中所述之新穎式(I)化合物會藉由結合至 CCR-2 受體，而拮抗 MCP-1，故此等式(I)化合物亦可為 MCP-2、MCP-3 及 MCP-4 被 CCR-2 所媒介作用之有效拮抗劑。因此，當於本文中指稱 "MCP-1 之拮抗作用" 時，係假定其係相當於 "CCR-2 之趨化因子刺激之拮抗作用"。因此，會調節趨化因子活性之化合物可証實在治療炎性、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及 /

或心血管疾病上之廣範圍利用性。專利公報 WO2005021500 A1 (併於本文供參考，且歸屬於本案申請人)係揭示經由 CCR2 調節 MCP-1 、 MCP-2 、 MCP-3 及 MCP-4 活性之化合物。此參考資料亦揭示製備此等化合物之各種方法，包括多步驟合成，其包括保護基之引進與後續移除。

一般期望發現具有經改良藥理學特性之新穎化合物，與已知趨化因子調節劑作比較。例如，一般期望發現具有經改良 CCR-2 抑制活性與對 CCR-2 相對於其他 G 蛋白質-偶合受體(意即 5HT2A 受體)之選擇性之新穎化合物。一般亦期望發現具有一或多種下述種類中之有利與經改良特性之化合物：

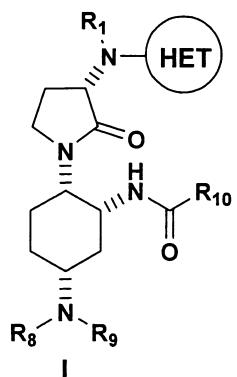
- (a) 醫藥性質(意即溶解度、滲透性、對持續釋出配方之可順從性)；
- (b) 劑量需要量(例如較低劑量及/或每日一次服藥)；
- (c) 會降低血液濃度峰頂至峰谷特性之因素(意即清除率及/或分佈之體積)；
- (d) 會增加活性藥物對受體之濃度之因素(意即蛋白質結合、分佈之體積)；
- (e) 會降低臨床藥物-藥物交互作用傾向之因素(細胞色素 P450 酶素抑制或誘發，譬如 CYP 2D6 抑制，參閱 G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, *Clin. Pharmacokinet.* 2000, 38, 41-57，其係據此併於本文供參考)；
- (f) 會降低不利副作用可能性之因素(例如除了 G 蛋白質-偶合受體以外之藥理學選擇性、潛在化學或代謝反應

性、受到限制之CNS穿透、離子通道選擇性)。特別期望發現具有所要前述藥理學特性組合之化合物。

於此項技藝中一般亦期望提供製備此種化合物之新穎及/或經改良方法。此等方法之特徵可為(並非限制)a)容易修改成較大規模生產，譬如試驗工廠或製造規模；b)能夠改良純度(包括對掌性純度)、安定性及/或中間物及/或最後化合物之容易處理性之處理步驟及/或技術；及/或c)較少處理步驟。

【發明內容】

本發明係提供MCP-1受體活性之新穎拮抗劑或部份催動劑/拮抗劑：N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，或其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前體藥物，具有所要藥理學特性之令人意外組合。亦提供本發明之結晶型。含有彼等之醫藥組合物，及使用彼等作為藥劑以治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病之方法，亦為本發明之目的。本揭示內容亦提供製備式(I)化合物之方法，該化合物包括N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺：

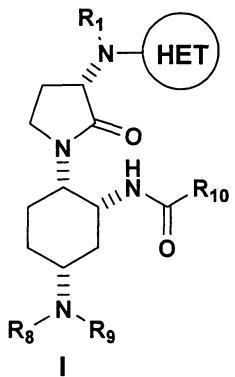


其中 R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} 及 均如本文中所述。本文亦提供一些化合物，其係為此方法之有用中間物。

本發明揭示內容亦提供 $N-((1R,2S,5R)-5-(\text{異丙基(甲基)胺基})-2-((S)-2-\text{酮基}-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-\text{基})\text{環己基})\text{乙醯胺}$ 或藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前體藥物於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病。

詳細說明

本發明係提供 MCP-1 受體活性之新穎拮抗劑或部份催動劑/拮抗劑： $N-((1R,2S,5R)-5-(\text{異丙基(甲基)胺基})-2-((S)-2-\text{酮基}-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-\text{基})\text{環己基})\text{乙醯胺}$ ，或其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前體藥物，具有所要藥理學特性之令人意外組合。亦提供本發明之結晶型。含有彼等之醫藥組合物，及使用彼等作為藥劑以治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病之方法，亦為本發明之目的。本揭示內容亦提供製備式(I)化合物之方法，該化合物包括 $N-((1R,2S,5R)-5-(\text{異丙基(甲基)胺基})-2-((S)-2-\text{酮基}-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-\text{基})\text{環己基})\text{乙醯胺}$ ：



其中 R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} 及 均如本文中所述。本文亦提供一些化合物，其係為此方法之有用中間物。

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺係令人意外地証實所要藥理學特性之組合，包括令人驚訝之高度口服生物利用率及高度地有效且具有優越安全性標準之適應徵之組合。

証實足夠程度之細胞膜滲透性(口服生物利用率之一項重要因素)之已知 CCR2 受體調節劑，譬如在 2005 年 3 月 10 日公告之專利公報 WO2005021500 A1 (2007 年 1 月 16 日頒予，歸屬於本案申請人之美國專利 7,163,937) 中所揭示者，當藉由其 CCR2-結合能力(功效之一種度量方式)度量時，其係不充分有效，及 / 或當藉由 hERG 與 Na^+ 離子通道研究度量時，其缺少如藉由離子通道選擇性所指示之適當安全性標準。

對照上而言，如本文中藉由下文標題為 "比較藥理學特性" 之段落中所提出之數據所示，相對較極性分子，N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，係証實令人驚訝之高度細胞膜滲透性，而仍保持有效 CCR2 結合能力，伴隨著

優越離子通道選擇性。

因此，本發明係提供具有經改良藥理學特性之新穎趨化因子調節劑，預期其可用於治療炎性、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病。

具體實施例

於一項具體實施例中，揭示內容係針對 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，及其藥學上可接受之鹽。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型，此結晶型包括 N-2 型式。

另一項具體實施例為 N-2 型式，其特徵為(或具有)實質上等於下列之單位晶胞參數：

晶胞尺寸：

$$a = 11.8427(3)$$

$$b = 18.1503(7)$$

$$c = 12.7923(4)$$

$$\alpha = 90$$

$$\beta = 105.362(2)$$

$$\gamma = 90$$

空間群 P2₁

分子 / 單位晶胞 2

其中該晶體係在約 +22°C (RT) 之溫度下。

另一項具體實施例為 N-2 型式，其特徵為(或具有)包含三個或更多個 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) 之粉末 x-射線繞射圖樣，該 2θ 值係選自 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2 及 18.8，在約 22°C 之溫度下。

另一項具體實施例為 N-2 型式，其特徵為(或具有)進一步包含四個或更多個 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) 之粉末 x-射線繞射圖樣，該 2θ 值係選自包括 7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2 及 18.8，在約 22°C 之溫度下。

另一項具體實施例為 N-2 型式，其特徵為(或具有)實質上如列示於表 7 中之部份原子座標。

另一項具體實施例為 N-2 型式，其特徵為(或具有)實質上根據圖 2 之粉末 x 射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺二-苯磺酸鹽之結晶型，包括型式 N-1，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{ \AA}$)；實質上如列示於表 2 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 1 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型，包括型式 E-1 (單-乙醇化物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更

多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；實質上如列示於表 5 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 3 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺 HCl 鹽之結晶型，包括型式 H4-1 (四水合物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；實質上如列示於表 9 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 4 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型圖樣，包括型式 A-1 (單-丙酮溶劑合物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；實質上如列示於表 6 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 5 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型，包括型式 DC-1 (單-二氯甲烷溶劑合物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；實質上如列示於表 3 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 6 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型，包括型式 AN-3 (單-乙腈溶劑合物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；實質上如列示於表 8 中之部份原子座標，及 / 或實質上根據圖 7 之粉末 x-射線繞射圖樣。

另一項具體實施例為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之結晶型，包括型式 THOO-1 (單-四氫呋喃溶劑合物)，其特徵為於表 1 中所發現之單位晶胞參數；3 或 4 或更多個選自表 10 之 2θ 值 ($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)；及 / 或實質上如列示於表 4 中之部份原子座標。

另一項具體實施例為一種醫藥組合物，包含藥學上可接受之載劑與實例之化合物。

另一項具體實施例為一種調節趨化因子或趨化因子受體活性之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種調節 CCR-2 受體活性之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種調節藉由 CCR2 受體所媒介之 MCP-1 、 MCP-2 、 MCP-3 與 MCP-4 及 MCP-5 活性之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種調節 MCP-1 活性之方法，其包括

對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療病症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物，該病症係選自糖尿病、肥胖、代謝徵候簇、中風、神經病原性疼痛、絕血性心肌病、牛皮癬、高血壓、硬皮病、骨關節炎、動脈瘤、發熱、心血管疾病、克隆氏病、鬱血性心衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、與HIV有關聯之癡呆症、牛皮癬、自發性肺纖維變性、移植物動脈硬化、物理上或化學上引致之腦部創傷、炎性腸疾病、肺胞炎、結腸炎、系統性紅斑狼瘡、毒腎血清腎炎、絲球體性腎炎、氣喘、多發性硬化、動脈粥瘤硬化、脈管炎、易受傷害斑、風濕性關節炎、再狹窄、靜脈新血管內膜增生、滲析-移植物新血管內膜增生、動脈-靜脈旁路血管內膜增生、器官移植、慢性同種移植腎病及癌症。

另一項具體實施例為一種治療病症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物，其中該病症係選自糖尿病、肥胖、克隆氏病、牛皮癬、自發性肺纖維變性、移植物動脈硬化、物理上或化學上引致之腦部創傷、炎性腸疾病、肺胞炎、結腸炎、系統性紅斑狼瘡、毒腎血清腎炎、絲球體性腎炎、氣喘、多發性硬化、動脈粥瘤硬化與風濕性關節炎、再狹窄、器官移植及癌症。

另一項具體實施例為一種治療病症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物，其中該病症係選自糖尿病、肥胖、克隆氏病、系統性紅斑狼瘡、絲球

體性腎炎、多發性硬化、動脈粥瘤硬化、再狹窄及器官移植。

另一項具體實施例為一種治療病症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物，其中該病症係選自多發性硬化、動脈粥瘤硬化、克隆氏病及糖尿病。

另一項具體實施例為一種治療病症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物，其中該病症係選自再狹窄、器官移植及癌症。

另一項具體實施例為一種治療糖尿病之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療克隆氏病之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療多發性硬化之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療動脈粥瘤硬化之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療再狹窄之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例化合物。

另一項具體實施例為一種治療器官移植之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例1化合物。

另一項具體實施例為一種治療癌症之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例1化合物。

另一項具體實施例為一種治療癌症之方法，其中癌症係選自乳癌、肝癌、前列腺癌及黑色素瘤。

另一項具體實施例為一種治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例1化合物。

另一項具體實施例為一種治療至少部份藉由CCR-2所媒介疾病之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例1化合物。

另一項具體實施例為一種調節CCR2活性之方法，其包括對有需要之病患投予治療上有效量之實例1化合物。

另一項具體實施例為實例1之化合物，用於製備藥劑以治療糖尿病、肥胖、代謝徵候簇、中風、神經病原性疼痛、絕血性心肌病、牛皮癬、高血壓、硬皮病、骨關節炎、動脈瘤、發熱、心血管疾病、克隆氏病、鬱血性心衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、與HIV有關聯之癡呆症、牛皮癬、自發性肺纖維變性、移植物動脈硬化、物理上或化學上引致之腦部創傷、炎性腸疾病、肺胞炎、結腸炎、系統性紅斑狼瘡、毒腎血清腎炎、絲球體性腎炎、氣喘、多發性硬化、動脈粥瘤硬化、脈管炎、易受傷害斑、風濕性關節炎、再狹窄、靜脈新血管內膜增生、滲析-移植物新血管內膜增生、動脈-靜脈旁路血管內膜增生、器官移植、慢性同種移植腎病及癌症。

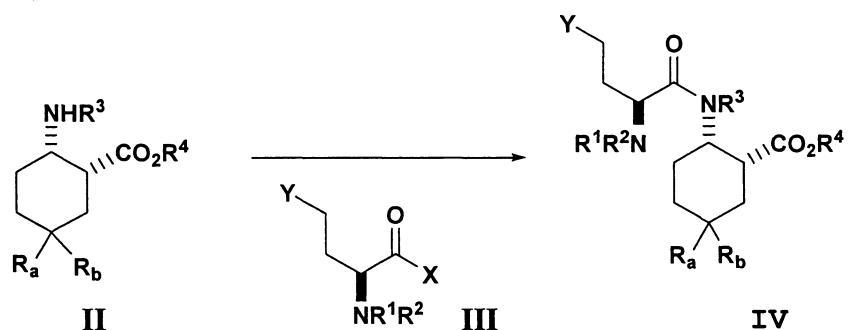
另一項具體實施例為實例之化合物，供使用於治療上。

本發明可在未偏離其精神或基本特質下，以其他特定形式具體表現。本發明亦涵蓋本文所指出本發明之替代方面與具體實施例之所有組合。應明瞭的是，任何且所有具體

實施例，均可搭配任何其他具體實施例，以描述本發明之其他具體實施例。再者，一項具體實施例之任何構件，係意欲與來自任何具體實施例之任何與所有其他構件合併，以描述其他具體實施例。

方法具體實施例

於第1項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式IV化合物或其鹽之方法：



此方法包括以下步驟：

使式II之β-胺基酯或其鹽與式III之經適當保護對掌性α-胺基酸偶合，而得醯胺IV（參閱WO2005021500）；其中：

R_a與R_b係獨立為C₁₋₆烷氧基；

或R_a與R_b和彼等均連接之碳一起合併，以形成羧基、硫代羧基、環狀縮醛或環狀硫代縮醛，其中環狀縮醛或環狀

硫代縮醛係選自-O-Z-O-與-S-Z-S-，Z為-(CT₁T₂)₂-、-(CT₁T₂)₃-

或(T₃)₀₋₄，且T₁，T₂及T₃，在每一存在處，係獨立選自氫、

C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄

烷基、OCF₃、C(=O)C₁₋₄烷基及CO₂C₁₋₄烷基(T₁，T₂及T₃較佳係各為氫)；

R₁，R₂及R₃係獨立為氫，或胺-保護基，選自苄氧羰基

(Cbz)、第三-丁氧羰基(BOC)、茀基甲基氨基羰基(FMOC)、苄基(Bn)及對-甲氧基苄基(PMB)(胺-保護基較佳為Cbz、Bn或BOC，尤其是Cbz或Bn)；

R₄為低碳C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代；

Y為鹵素、SR₁₋₂或OSO₂R₁₋₃；

X為OH、鹵素或OCOR₁₋₄；

R₁₋₂為C₁₋₆烷基、-(CH₂)C(O)OR₁₋₃或-(CH₂)C(O)R₁₋₃；

R₁₋₃，在每一存在處，為C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代；且

R₁₋₄，在每一存在處，為氫、C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代。

當於本文中使用時，視情況經取代之苄基係指苄基，其係經過其亞甲基(-CH₂-)連接，且視情況在連接至亞甲基之苯環上經取代。

於第2項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式IV產物或其鹽之方法，其中：

R_a與R_b和彼等均連接之碳原子一起合併，以形成羰基或1,3-二氧五環基團(較佳情況是，R_a與R_b和彼等均連接之碳原子一起合併，以形成1,3-二氧五環基團)；

R₁為氫；

R_2 為 Cbz；

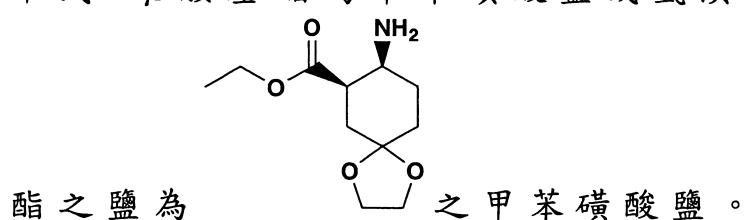
R_3 為 氢；

R_4 為 C_{1-6} 氧 烷 基；

Y 為 S(Me)；及

X 為 OH。

於第3項具體實施例中，揭示內容係提供一種方法，其中式II β -胺基酯為甲苯磺酸鹽或氫溴酸鹽。較佳式II β -胺基



於第4項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式IV化合物或其鹽之方法，其中偶合係在惰性大氣下，譬如氮或氬(較佳為氮)，於非質子性溶劑中進行，譬如丙腈、醋酸異丙酯、醋酸正-丁酯、醋酸第三-丁酯或乙腈(尤其是乙腈及/或醋酸乙酯)。

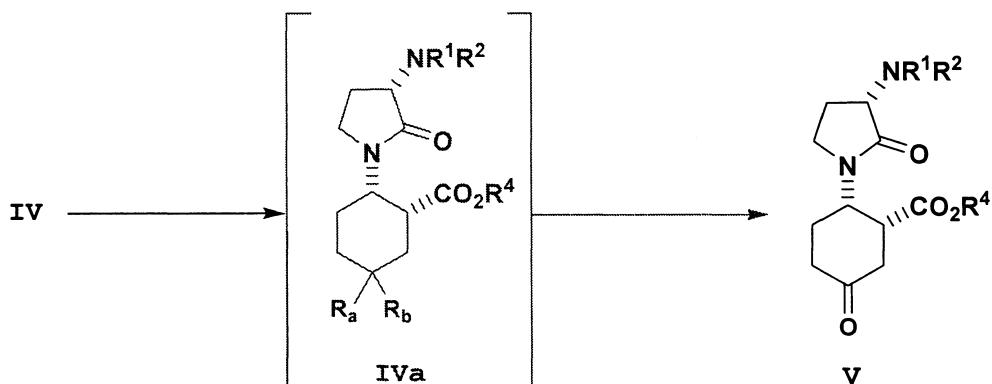
於第5項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式IV化合物或其鹽之方法，其中偶合係經由使式II β -胺基酯與二醯亞胺偶合試劑，於活化劑、經保護之式II β -胺基酯及三級胺鹼存在下接觸而達成。二醯亞胺偶合試劑包括例如EDAC之試劑。活化劑之實例包括1-羥基苯并三唑(HOBt；該術語包括其水合物)與N,N'-4-二甲胺基-吡啶。三級胺鹼包括例如三烷基胺類，譬如三乙胺、N,N-二異丙基-N-乙胺及三-正-丙基胺。

於第6項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式IV

化合物或其鹽之方法，其中二醯亞胺偶合試劑為EDAC，活化劑為HOBr，而三級胺鹼為三乙胺或N,N-異丙基-N-乙胺。

於第7項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式IV化合物或其鹽之方法，其中式II胺基酯對二醯亞胺偶合試劑對活化劑對三級胺之莫耳比，係個別為一對約0.90-1.50對約0.95-1.50對約2.00至3.00。該莫耳比係較佳個別為一對約0.95-1.05對約0.95-1.10及對約2.10至2.30。

於第8項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式V化合物或其鹽之方法：



此方法包括以下步驟：

a)使式IV化合物以烷基化劑進行烷基化，以形成經活化之化合物；與

b)使經活化之化合物當場環化，而得式IVa化合物。

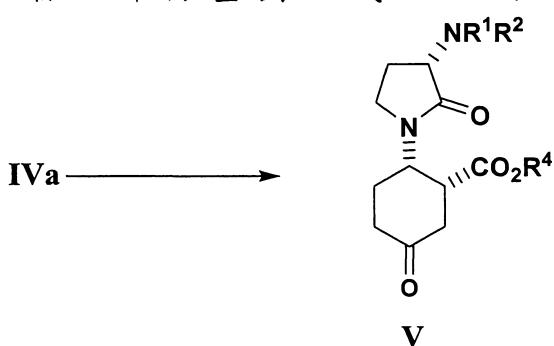
於第9項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式V化合物或其鹽之方法，其中步驟a)之烷基化劑為硫烷基化劑，譬如C₁₋₆烷基鹵化物，且經活化之化合物為化合物IV之鎔鹽，其中Y為S⁺(C₁₋₆烷基)R₁₂。較佳情況是，烷基化劑為碘化甲烷，且Y為S⁺(CH₃)₂。

於第10項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式V

化合物或其鹽之方法，其中環化步驟包括將經活化之化合物或其鹽與鹼，於溶劑存在下合併。該鹼係選自碳酸銫、重碳酸銫、碳酸鉀、第三-丁醇鈉或六甲基二矽氮化鈉(該鹼較佳為碳酸銫)。

於第11項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式V化合物或其鹽之方法，其中環化步驟係在惰性大氣下，譬如氮或氬，於溶劑中進行，溶劑係選自DMSO、DMF、DMA、N-甲基四氫吡咯酮及環丁砜。較佳情況是，惰性大氣為氮，且溶劑係選自DMSO及/或DMF。

於第12項具體實施例中，其中式IVa化合物具有縮醛部份基團，意即其中R_a與R_b係獨立為C₁₋₆烷氧基，或和彼等所連接之原子一起合併，以形成環狀縮醛或環狀硫代縮醛，揭示內容係提供一種形成式V化合物或其鹽之方法，其進一步包括使具有縮醛部份基團之式IVa化合物水解之步驟：

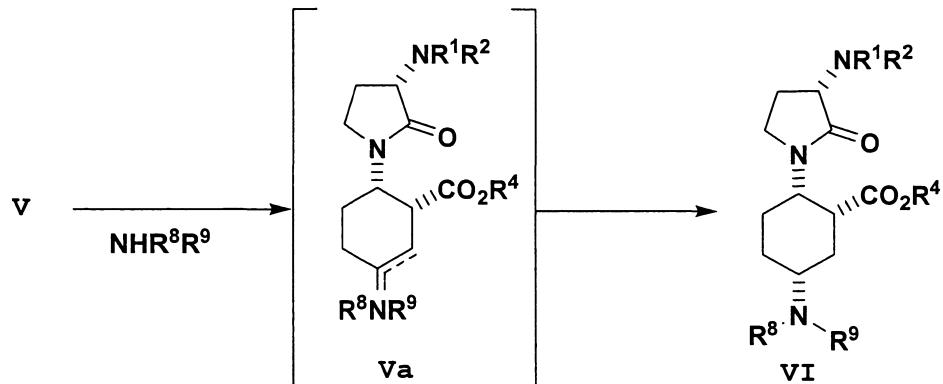


以形成式V化合物。

水解步驟可根據關於熟諳此藝者所已知使縮醛基團水解之程序進行。例如，水解步驟可包括將式IVa化合物於溶劑中，譬如丙酮、丁酮、乙腈及異丙醇或其水溶液，以酸處理。水解步驟較佳係包括將式IVa化合物於丙酮水溶液中，

以鹽酸處理。

於第13項具體實施例中，本發明揭示內容係提供一種製備具有酯部份基團之式VI化合物或其鹽之方法：



此方法包括以下步驟：

以還原方式使式V化合物以具有式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 之胺進行胺化，而得式Va之亞胺/烯胺，其中 R_8 與 R_9 係獨立選自氫與 C_{1-6} 烷基。 R_8 與 R_9 較佳係獨立選自 C_{1-6} 烷基。胺更佳為N-甲基-N-異丙胺。

於第14項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式VI產物之方法，其包括以下之還原胺化步驟：

(a) 將式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 之胺與脫水劑在溫度約 -20° 至約 $+50^\circ\text{C}$ 下，添加至非質子性溶劑中之式V化合物內，以形成式Va之亞胺/烯胺；與

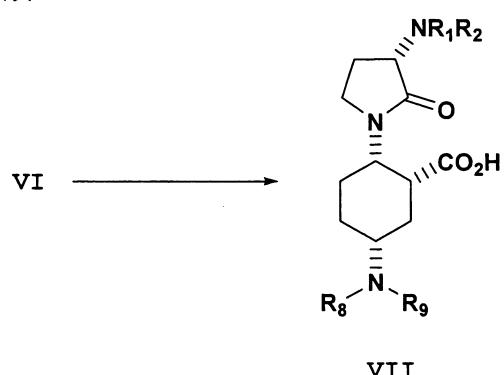
(b) 以氫氣壓力處理式Va之亞胺/烯胺與鉑觸媒5% Pt/S/C之溶液，而得式VI化合物。

於第15項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式VI化合物或其鹽之方法，其中步驟a)之脫水劑為路易士酸/布朗司特酸(較佳為四異丙氧化鈦)，且非質子性溶劑係選自二氯乙烷、二氯甲烷、乙腈、DMSO、DMF及N-甲基-四氫吡

咯酮(較佳為二氯甲烷)。

於第16項具體實施例中，揭示內容係提供一種形成式VI化合物或其鹽之方法，其中於步驟b)中，5% Pt/S/C觸媒係於大約0.5至50%(重量/重量)下存在，相對於化合物Va。氫氣較佳係在壓力約15至約35 psig下。

於第17項具體實施例中，本發明係提供一種製備式VII化合物或其鹽之方法：

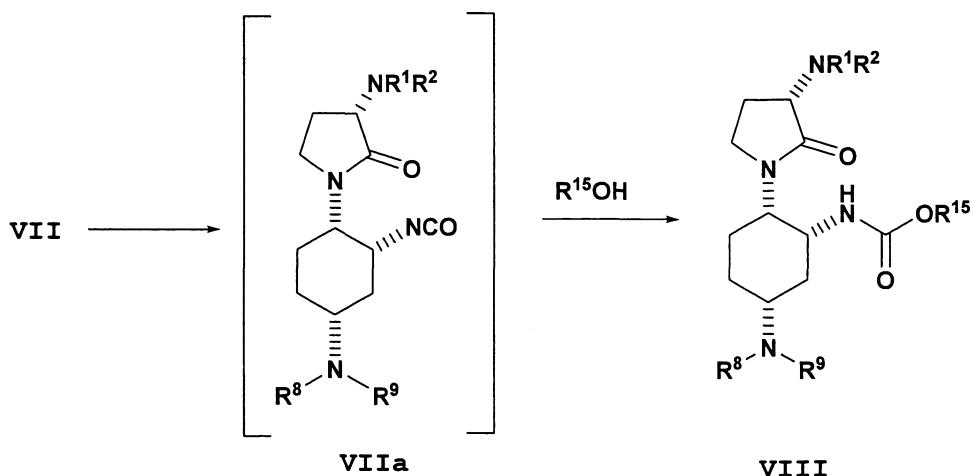


此方法包括以下步驟：

使式VI酯化合物水解，而得式VII酸化合物。溫度範圍為約40°C至約100°C(溫度範圍約50°C至約70°C為最佳)。酸類係選自硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲烷磺酸、氫溴酸及鹽酸。氫溴酸為最佳。水解步驟較佳係在鹽酸水溶液中進行，以獲得式VII化合物。

於第18項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式VII化合物鹽之方法，其進一步包括以下步驟，將鹼與式VII酸化合物之溶液混合，視情況當場進行。鹼較佳為鹼金屬氫氧化物，例如氫氧化鈉。

於第19項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式VIII胺基甲酸酯化合物或其鹽之方法：



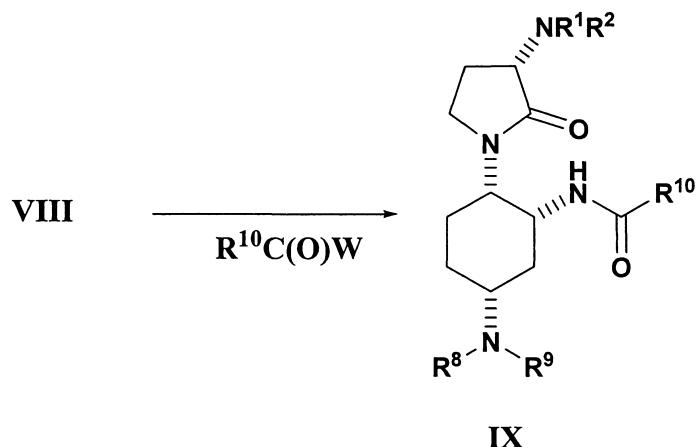
此方法包括以下步驟：

- a) 使式 VII 酸化合物轉化成式 VIIa 異氰酸酯化合物；與
- b) 使式 VIIa 異氰酸酯化合物與式 $R^{15}OH$ 醇反應，而得式 VIII 胺基甲酸酯化合物；

其中 R^{15} 為 C_{1-6} 烷基或芳基，視情況被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 及 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代。 R^{15} 較佳為第三-丁基或未經取代之芳基。

於第 20 項具體實施例中，揭示內容係提供一種經由 Curtius 重排以製備式 VIII 化合物或其鹽之方法，其包括使式 VII 化合物之鈉鹽與疊氮化物試劑（較佳為疊氮化二苯基磷醯）在含有甲苯之溶劑（較佳為第三-丁醇）中，在高於熱重排觸發點之溫度下接觸。溫度較佳係大於 $50^\circ C$ 。

於第 21 項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式 IX 化合物或其鹽之方法：



此方法包括以下步驟：

- 使式 VIII 胺基甲酸酯化合物轉變成自由態胺中間物；與
- 使自由態胺中間物以試劑 $R^{10}C(O)W$ 當場醯化，而得式 IX 化合物；

其中：

R^{10} 係獨立為 C_{1-6} 烷基或芳基，視情況被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 及 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代；且

W 為鹵素或 $R^{10}C(O)-$ 。

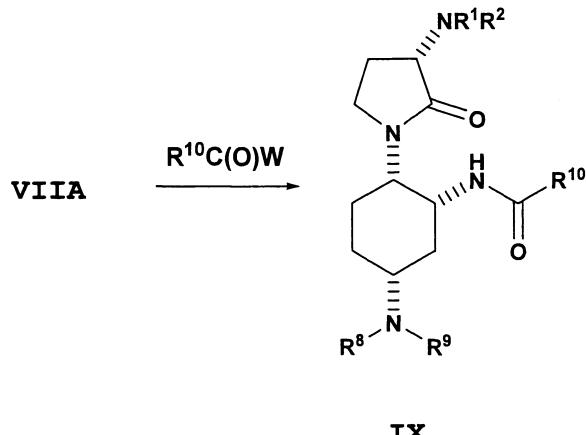
$R^{10}C(O)W$ 較佳為醋酸酐。

於第 22 項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式 IX 化合物或其鹽之方法，其中轉變步驟包括以下步驟：

- 以酸處理式 VIII 化合物之溶液；與
- 添加鹼至溶液中，而得自由態胺中間物。

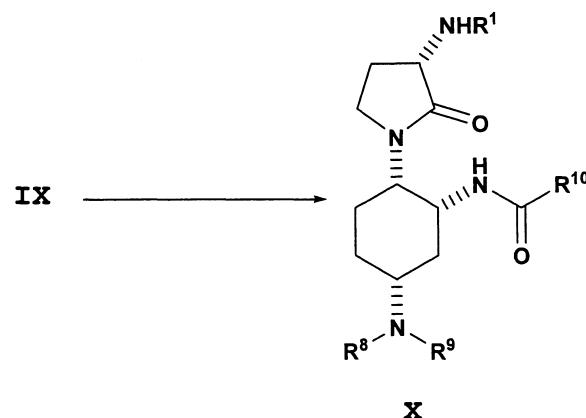
該酸較佳係選自硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲烷磺酸、氫溴酸及鹽酸，更佳為甲烷磺酸。較佳情況是，鹼為三烷基胺，較佳為三乙胺。

於第23項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式IX化合物或其鹽之替代方法：



此方法包括以下步驟，將式VIIa異氰酸酯化合物，於其相應酸 $R^{10}C(O)OH$ 存在下，視情況當場添加至醯化劑 $(R^{10}C(O))_2O$ 中，其中 R^{10} 係獨立為 C_{1-6} 烷基或芳基，視情況被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 及 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代。 R^{10} 較佳為 C_{1-6} 烷基，尤其是甲基。

於第24項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式X化合物或其鹽之方法：

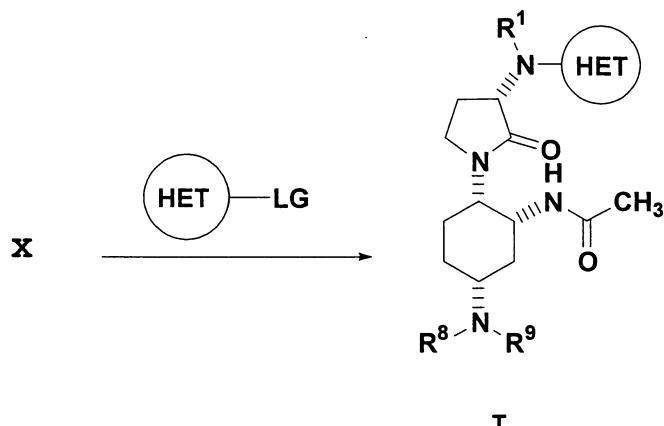


此方法包括以下步驟：

使經保護之式IX胺化合物去除保護，以提供式X化合物。在 R^2 為 Cbz 之情況下，去除保護較佳係包括使經保護之式IX

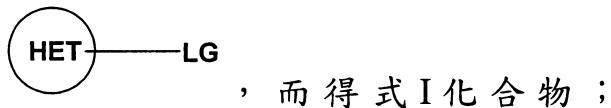
胺化合物於鈀觸媒存在下氫化。鈀觸媒較佳為 10% Pd/C。

於第 25 項具體實施例中，揭示內容係提供一種製備式 I 化合物之方法：



此方法包括以下步驟：

使式 X 化合物與下式化合物偶合：

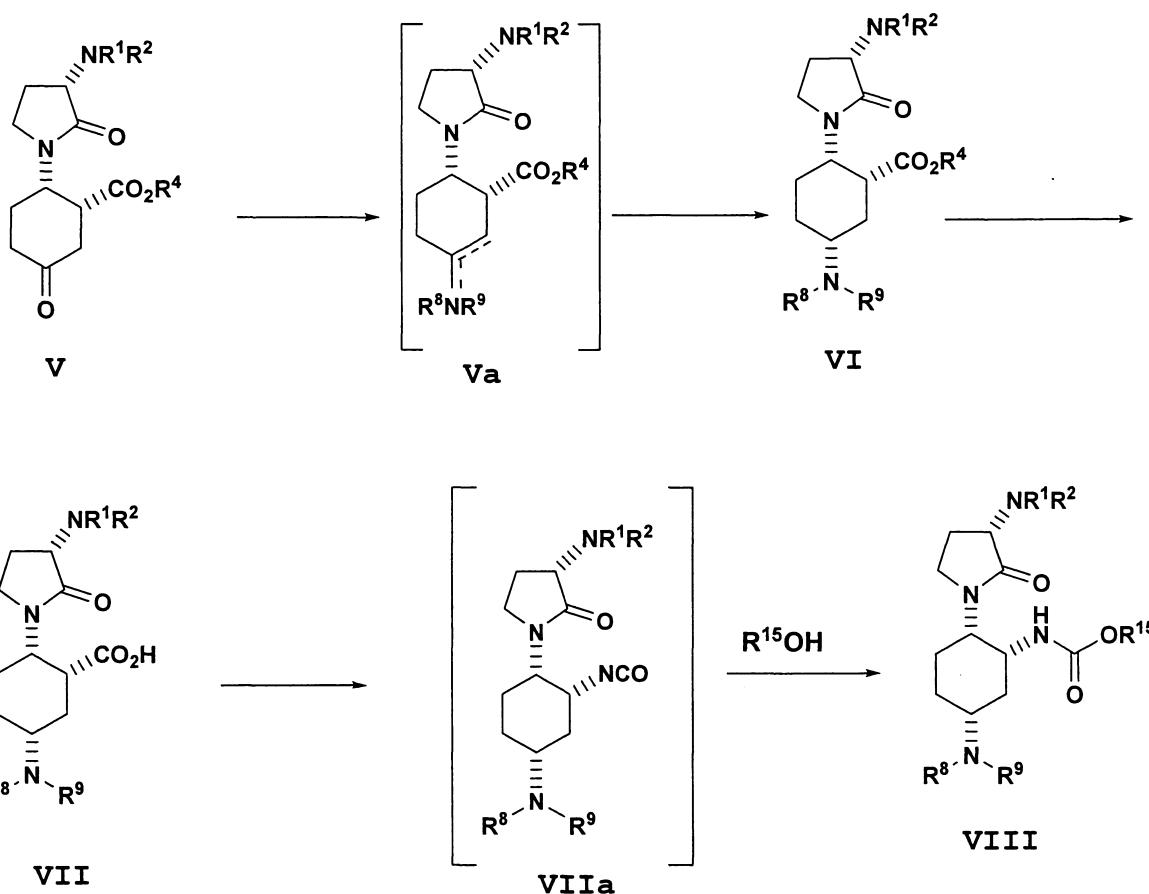


其中：

HET 為視情況經取代之 3-14 賁環基或雜芳基環，具有一至四個選自 N、O 或 S 之雜原子（較佳為一至三個雜原子，尤其是一至兩個氮原子）在至少一個環中（HET 較佳為 6-取代之喹唑啉-4-基，更佳為 6-三氟甲基-喹唑啉-4-基）；且

LG 為脫離基，選自鹵素或 $\text{OSO}_2\text{R}_{16}$ （LG 較佳為鹵素，更佳為氯基），其中 R_{16} 為 C_{1-6} 烷基，苯基，5-至 7-賁芳基，具有一或多個選自 N、S 或 O 之原子，或 3- 至 7-賁環烷基，其全部均視情況經取代（ R_{16} 之選用取代基較佳為一至三個基團，選自鹵素、 CF_3 及 C_{1-6} 烷基）。

於第 26 項具體實施例中，本發明係提供一種製備式 VIII 化合物或其鹽之新穎方法：



此方法包括以下步驟：

以還原方式使式**V**化合物以式 $NH(R^8)(R^9)$ 胺進行胺化，而得式**VI**化合物，包括以下步驟：

(a) 將胺與脫水劑在溫度約 -20° 至約 $+50^\circ C$ 下，添加至非質子性溶劑中之式**V**化合物內，以形成式**Va**之亞胺/烯胺化合物；與

(b) 以氫氣壓力處理式**Va**之亞胺/烯胺化合物與鉑觸媒5% Pt/S/C之溶液，而得式**VI**酯化合物；

使式**VI**酯化合物水解，而得式**VII**酸化合物；

使式**VII**酸化合物轉化成式**VIIa**異氰酸酯化合物；且

使式**VIIa**異氰酸酯化合物與式 $R^{15}OH$ 醇反應，而得式**VIII**

胺基甲酸酯化合物；

其中：

R₁與R₂係獨立為氫，或胺-保護基，選自苄氧羰基(Cbz)、第三-丁氧羰基(BOC)、茀基甲基氨基羰基(FMOC)、苄基(Bn)及對-甲氧基苄基(PMB)(胺-保護基較佳為Cbz、Bn或BOC，尤其是Cbz或Bn)；

R₄為低碳C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氟基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代；

R₈與R₉係獨立為氫或C₁₋₆烷基；

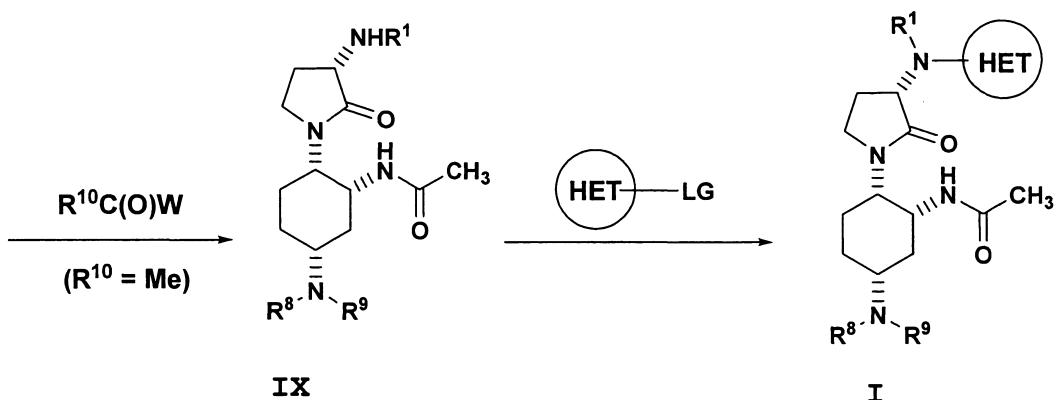
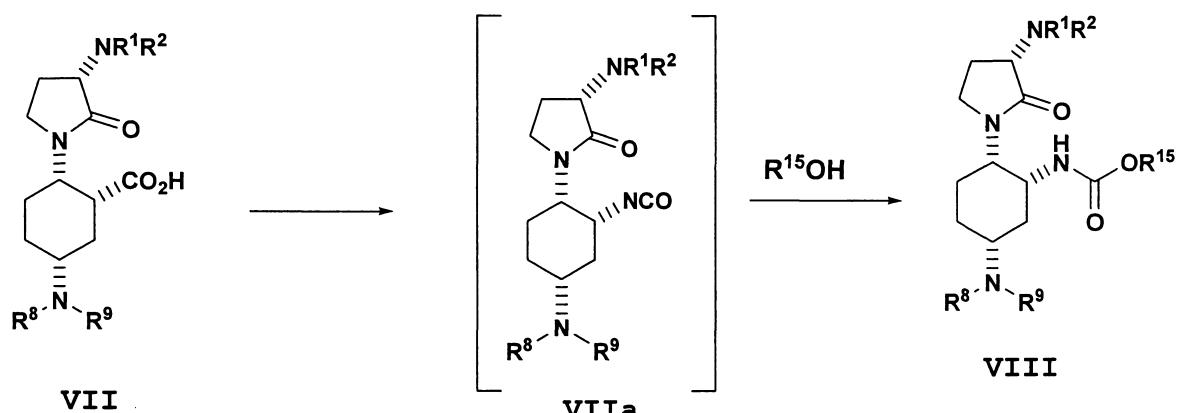
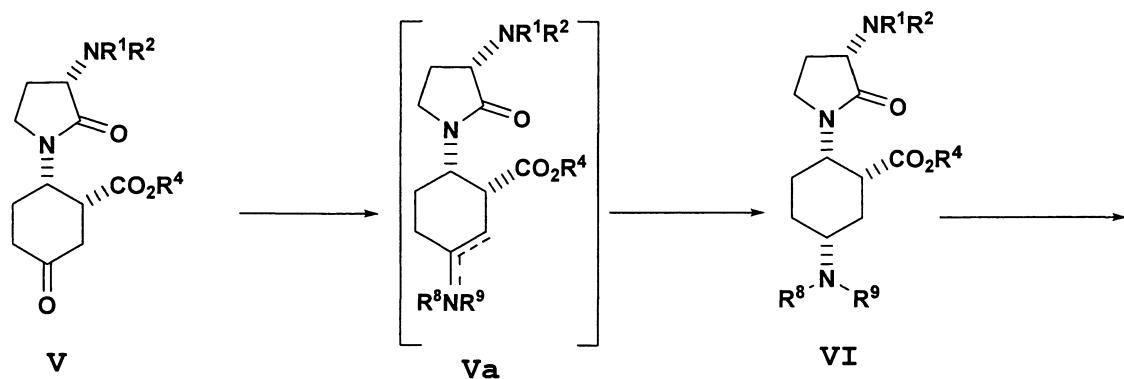
R¹⁵為C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氟基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代(R¹⁵較佳為第三-丁基或未經取代之苄基，更佳為第三-丁基)；

HET為視情況經取代之3-14員雜環基或雜芳基環，具有一至四個選自N、O或S之雜原子(較佳為一至三個雜原子，尤其是一至兩個氮原子)在至少一個環中(HET較佳為6-取代之喹唑啉-4-基，更佳為6-三氟甲基-喹唑啉-4-基)；且

LG為脫離基，選自鹵素或OSO₂R₁₆(LG較佳為鹵素，更佳為氯基)，其中R₁₆為C₁₋₆烷基，苯基，5-至7-員雜芳基，具有一或多個選自N、S或O之原子，或3-至7-員環烷基，其全部均視情況經取代(R₁₆之選用取代基較佳為一至三個基團，選自鹵素、CF₃及C₁₋₆烷基)。

於第27項具體實施例中，本發明係提供一種製備式I化合

物或其鹽之新穎方法：



此方法包括以下步驟：

以還原方式使式V化合物以式NH(R⁸)(R⁹)胺進行胺化，而得式VI化合物，以還原方式胺化係包括以下步驟：

(a) 將胺與脫水劑在溫度約-20°至約+50°C下，添加至非

質子性溶劑中之式 V 化合物內，以形成式 Va 之亞胺/烯胺化合物；與

(b) 以氫氣壓力處理式 Va 之亞胺/烯胺化合物與鉑觸媒 5% Pt/S/C 之溶液，而得式 VI 酯化合物；

使式 VI 酯化合物水解，而得式 VII 酸化合物；

使式 VII 酸化合物轉化成式 VIIa 異氰酸酯化合物；

使式 VIIa 異氰酸酯化合物與式 $R^{15}OH$ 醇反應，而得式 VIII 胺基甲酸酯化合物；

使式 VIII 胺基甲酸酯化合物轉變成自由態胺中間物；且

使自由態胺中間物以試劑 $R^{10}C(O)W$ 當場醯化，

而得經保護之式 IX 胺化合物；

使經保護之式 IX 胺化合物去除保護，而得式 X 化合物；

且

使式 X 化合物與下式化合物偶合



而得式 I 化合物；

其中：

R_1 與 R_2 係獨立為氫，或胺-保護基，選自苄氧羰基 (Cbz)、第三-丁氧羰基 (BOC)、第基甲基氨基羰基 (FMOC)、苄基 (Bn) 及對-甲氧基苄基 (PMB) (胺-保護基較佳為 Cbz、Bn 或 BOC，尤其是 Cbz 或 Bn)；

R_4 為低碳 C_{1-6} 烷基或苄基，視情況被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 及 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代；

R₈與R₉係獨立為氫或C₁₋₆烷基；

R¹⁰係獨立為C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代（較佳為C₁₋₆烷基，更佳為甲基）；

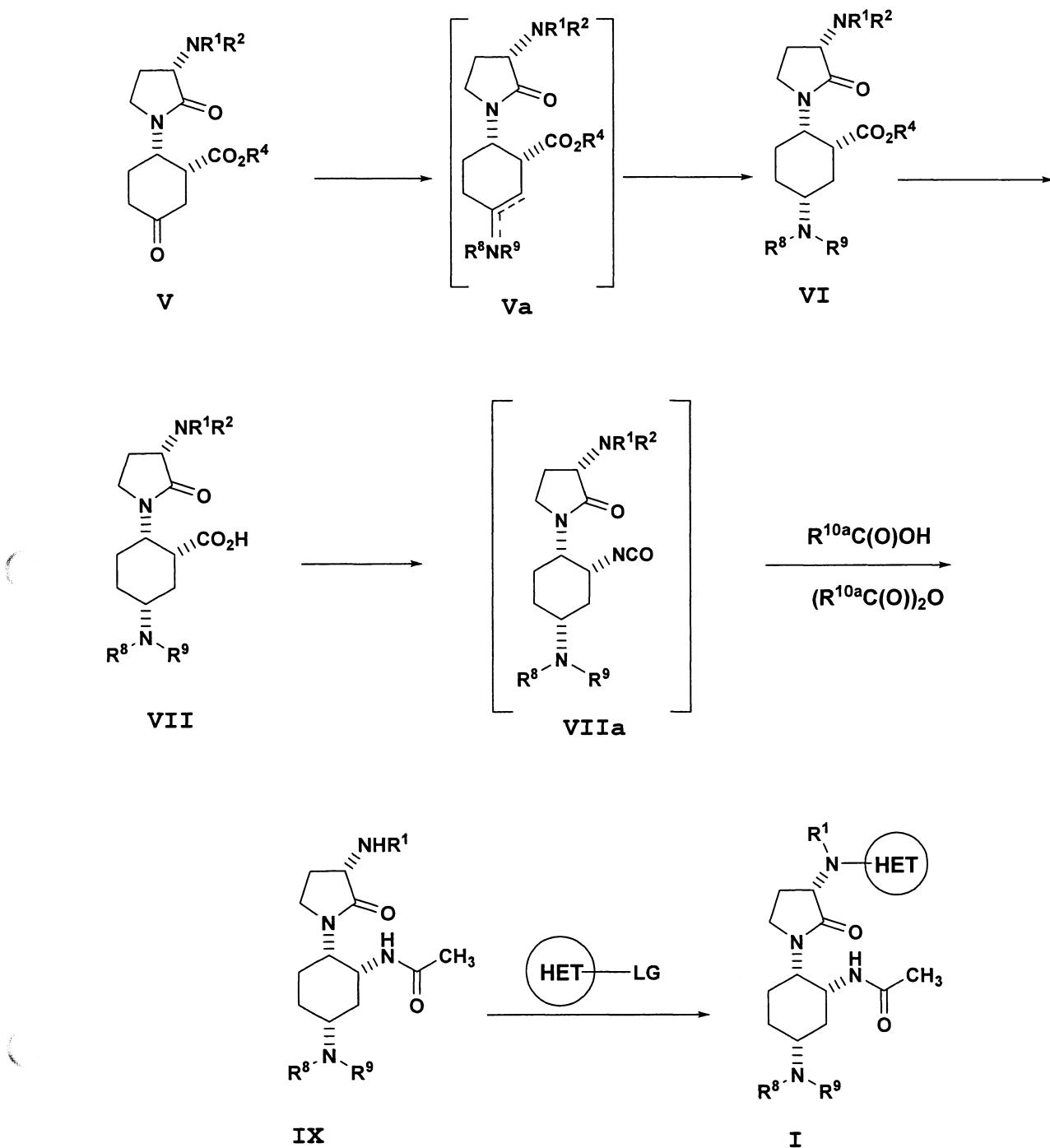
W為鹵素或R¹⁰C(O)-；

R¹⁵為C₁₋₆烷基或苄基，視情況被C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、OC₁₋₄烷基、OCF₃及C(=O)C₁₋₄烷基取代（R¹⁵較佳為第三-丁基或未經取代之苄基，更佳為第三-丁基）；

HET為視情況經取代之3-14員雜環基或雜芳基環，具有一至四個選自N、O或S之雜原子（較佳為一至三個雜原子，尤其是一至兩個氮原子）在至少一個環中（HET較佳為6-取代之喹唑啉-4-基，更佳為6-三氟甲基-喹唑啉-4-基）；且

LG為脫離基，選自鹵素或OSO₂R₁₆（LG較佳為鹵素，更佳為氯基），其中R₁₆為C₁₋₆烷基，苯基，5-至7-員雜芳基，具有一或多個選自N、S或O之原子，或3-至7-員環烷基，其全部均視情況經取代（R₁₆之選用取代基較佳為一至三個基團，選自鹵素、CF₃及C₁₋₆烷基）。

於第28項具體實施例中，本發明係提供一種製備式I化合物或其鹽之替代新穎方法：



此方法包括以下步驟：

以還原方式使式V化合物以式 $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ 胺進行胺化，而得式VI化合物，以還原方式胺化係包括以下步驟：

(a) 將胺與脫水劑在溫度約-20°至約+50°C下，添加至非質子性溶劑中之式V化合物內，以形成式Va之亞胺/烯胺化合物；與

(b) 以氫氣壓力處理式 Va 之亞胺 / 烯胺化合物與鉑觸媒 5% Pt/S/C 之溶液，而得式 VI 酯化合物；

使式 VI 酯化合物水解，而得式 VII 酸化合物；

使式 VII 酸化合物轉化成式 VIIa 異氰酸酯化合物；

將式 VIIa 異氰酸酯化合物，於其相應酸 $R^{10a}C(O)OH$ 存在下，視情況當場添加至醯化劑 $(R^{10a}C(O))_2O$ 中，而得經保護之式 IX 胺化合物；

使經保護之式 IX 胺化合物去除保護，而得式 X 化合物；

且

使式 X 化合物與下式化合物偶合



而得式 I 化合物；

其中：

R_1 與 R_2 係獨立為氫，或胺-保護基，選自苄氧羰基 (Cbz)、第三-丁氧羰基 (BOC)、茀基甲基氨基羰基 (FMOC)、苄基 (Bn) 及對-甲氧基苄基 (PMB)（胺-保護基較佳為 Cbz、Bn 或 BOC，尤其是 Cbz 或 Bn）；

R_4 為低碳 C_{1-6} 烷基或苄基，視情況被 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、齒素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 OC_{1-4} 烷基、 OCF_3 及 $C(=O)C_{1-4}$ 烷基取代；

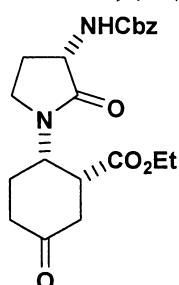
R_8 與 R_9 係獨立為氫或 C_{1-6} 烷基；

其中 R^{10a} 係獨立為 C_{1-6} 烷基或視情況經取代之苄基 (R^{10a} 較佳為甲基)；

HET 為視情況經取代之 3-14 賁雜環基或雜芳基環，具有一

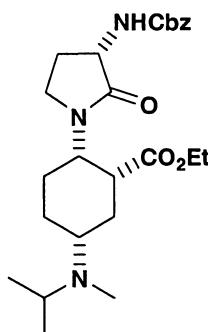
至四個選自 N、O 或 S 之雜原子(較佳為一至三個雜原子，尤其是一至兩個氮原子)在至少一個環中(HET 較佳為 6-取代之喹唑啉-4-基，更佳為 6-三氟甲基-喹唑啉-4-基)；且 LG 為脫離基，選自鹵素或 $\text{OSO}_2\text{R}_{16}$ (LG 較佳為鹵素，更佳為氯基)，其中 R_{16} 為 C_{1-6} 烷基，苯基，5-至7員雜芳基，具有一或多個選自 N、S 或 O 之原子，或3-至7員環烷基，其全部均視情況經取代(R_{16} 之選用取代基較佳為一至三個基團，選自鹵素、 CF_3 及 C_{1-6} 烷基)。

於第 29 項具體實施例中，揭示內容係提供根據任何前文具體實施例之方法，其中：



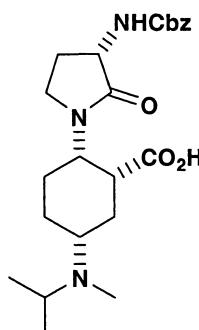
式 V 化合物為

，或其鹽；



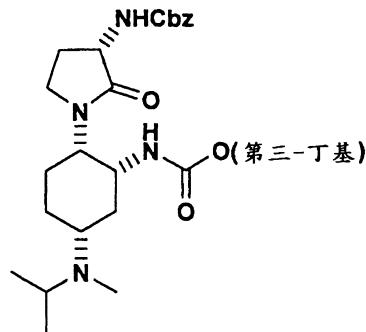
式 VI 化合物為

，或其鹽；



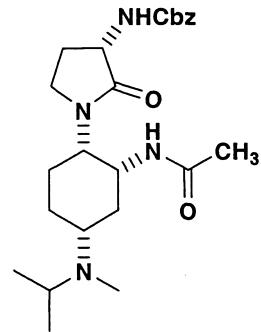
式 VII 化合物為

，或其鹽(較佳為鈉鹽)；



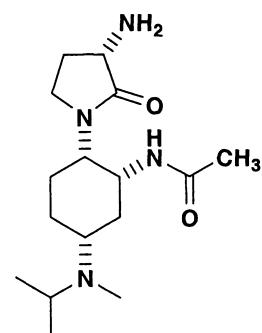
式 VIII 胺基甲酸酯化合物為

，或其鹽；



經保護之式 IX 胺化合物為

，或其鹽；

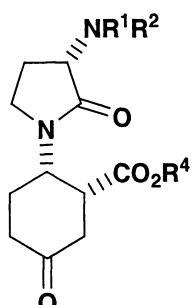


經去除保護之式 X 化合物為

，或其鹽；且式

I 化合物為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，或其鹽。

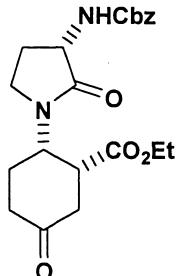
於第 30 項具體實施例中，揭示內容係提供式 V 化合物，或其鹽：



V

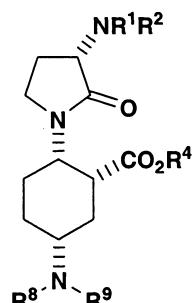
其中：

R^1 與 R^2 為 氢，或 肽-保護基，選自 BOC、Cbz 或 苄基；且
 R^4 為 低 碳 C_{1-6} 烷 基。



較佳式 V 化合物為 ，或其鹽。

於第 31 項具體實施例中，揭示內容係提供式 VI 化合物，
 或其鹽：



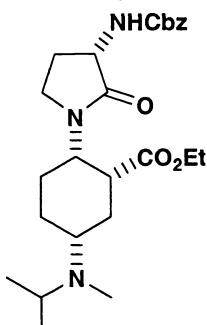
VI

其中：

R^1 與 R^2 係獨立為 氢，或 肽-保護基，選自 BOC、Cbz 或 苄基；
 且

R^4 為 C_{1-6} 烷 基；而

R^8 與 R^9 係獨立選自 氢或 C_{1-6} 烷 基。



較佳式 VI 化合物為 ，或其鹽。

於第 32 項具體實施例中，揭示內容係提供式 VII 化合物，
 或其鹽：

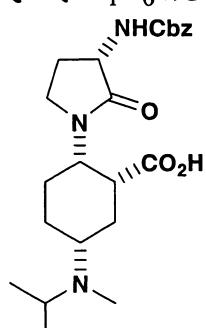


VII

其中：

R^1 與 R^2 係獨立為氫，或胺-保護基，選自 BOC、Cbz 或苄基；
且

R^8 與 R^9 係獨立選自氫或 C_{1-6} 烷基。

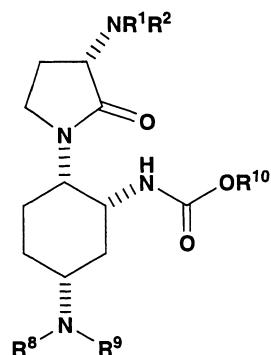


較佳式 VII 化合物為 ，或其鹽。

其較佳鹽係包括鹼金屬鹽，譬如式 VII 化合物之鈉鹽。

於第 33 項具體實施例中，揭示內容係提供式 VII 化合物，

或其鹽：

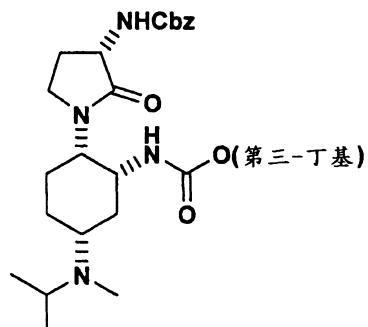


VIII

其中：

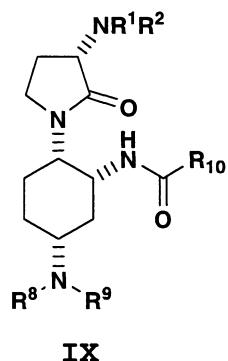
R^1 與 R^2 係獨立為氫，或胺-保護基，選自 BOC、Cbz 或苄基；

R^8 與 R^9 級獨立選自氫或 C_{1-6} 烷基；且
 R_{10} 為 C_{1-6} 烷基或苄基。



較佳式 VIII 化合物為

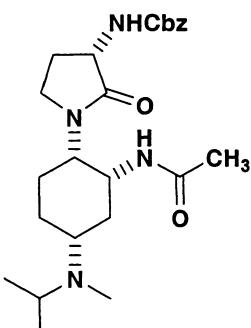
於第 34 項具體實施例中，揭示內容係提供式 IX 化合物，
 或其鹽：



IX

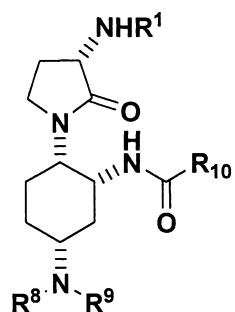
其中：

R^1 與 R^2 級獨立為氫，或胺-保護基，選自 BOC、Cbz 或苄基；
 R^8 與 R^9 級獨立選自氫或 C_{1-6} 烷基；且
 R_{10} 為 C_{1-6} 烷基或視情況經取代之苄基。



較佳式 IX 化合物為

於第 35 項具體實施例中，揭示內容係提供式 X 化合物，
 或其鹽：



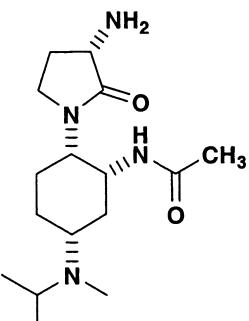
X

其中：

R¹ 独立為氫，或胺-保護基，選自 BOC、Cbz 或苄基；

R⁸ 與 R⁹ 独立選自氫或 C₁₋₆ 烷基；且

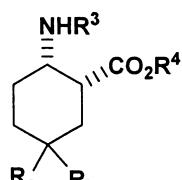
R₁₀ 為 C₁₋₆ 烷基或視情況經取代之苄基。



較佳式 X 化合物為 ，或其鹽。

於第 36 項具體實施例中，揭示內容係提供式 II 化合物，

或其鹽：



II

其中：

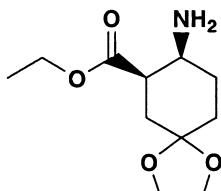
R_a 與 R_b 和彼等均連接之碳原子一起合併，以形成羧基或 1,3-二氧五環基團（較佳情況是，R_a 與 R_b 和彼等均連接之碳原子一起合併，以形成 1,3-二氧五環基團）；

R₁ 為氫；

R₂為 Cbz；

R₃為氫；且

R₄為C₁₋₆烷氧基。



較佳式II化合物為

，或其鹽。

較佳鹽為甲苯磺酸鹽或氫溴酸鹽，尤其是甲苯磺酸鹽。

於第46項具體實施例中，揭示內容係提供一種方法，其中式I化合物為N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺或其鹽。

本發明可在未偏離其精神或基本特質下，以其他特定形式具體表現。因此，上述具體實施例不應被認為是限制。本發明之任何與所有具體實施例，均可搭配任何其他一或多項具體實施例，以描述其他具體實施例。具體實施例之各個別構件(例如較佳或特殊方面)係為其自有獨立具體實施例。再者，一項具體實施例之任何構件，係意欲與來自任何具體實施例之任何與所有其他構件合併，以描述其他具體實施例。此外，本發明係涵蓋本文所指出本發明之不同具體實施例、部份具體實施例、定義、說明例及實例之組合。

定義

下文係為本專利說明書與隨文所附請求項中所使用術語之定義。對本文中基團或術語所提供之最初定義，在整個

本專利說明書與請求項中係適用於該基團或術語，個別地或作為另一種基團之一部份，除非另有指出。

"烷基"一詞係指直鏈或分枝鏈烴基，具有1至12個碳原子，較佳為1至6個碳原子。當數目以下標出現在符號"C"之後時，該下標係更明確地界定特定基團可含有之碳原子數。例如，"C₁₋₆烷基"係指具有一至六個碳原子之直鏈與分枝鏈烷基，譬如甲基、乙基、正-丙基、異丙基、正-丁基、第三-丁基、正-戊基等等。下標"0"係指一個鍵結。因此，(C₀₋₂)烷基或(C₀₋₂)羥烷基術語係包括羥基、羥甲基及羥乙基。烷基可被一至三個基團取代，取代基選自(C₁₋₆)烷基、(C₂₋₆)烯基、羥基、鹵素、氟基、硝基、CF₃、O(C₁₋₆烷基)、OCF₃、C(=O)H、C(=O)(C₁₋₆烷基)、CO₂H、CO₂(C₁₋₆烷基)、NHCO₂(C₁₋₆烷基)、-S(C₁₋₆烷基)、NH₂、NH(C₁₋₆烷基)、N(C₁₋₆烷基)₂、N(CH₃)₃⁺、SO₂(C₁₋₆烷基)、C(=O)(C₁₋₄次烷基)NH₂、C(=O)(C₁₋₄次烷基)NH(烷基)、C(=O)(C₁₋₄次烷基)N(C₁₋₄烷基)₂、C₃₋₇環烷基、苯基、苄基、苯基乙基、苯基氨基、苄氨基、萘基、四-至七-員雜環基及/或五-至六-員雜芳基。當經取代之烷基係被芳基、雜環基、環烷基或雜芳基取代時，該環狀系統均如下文定義，且因此可具有零、一、二或三個取代基，亦如下文定義。

當"烷基"一詞係與另一種基團一起使用時，譬如在"芳烷基"中，此搭配係更明確地定義經取代烷基將含有之取代基之一。例如，"芳烷基"係指如上文定義之經取代烷基，其中至少一個取代基為芳基，譬如苄基。因此，芳基(C₀₋₄)

烷基一詞包括具有至少一個芳基取代基之經取代低碳烷基，且亦包括直接結合至另一個基團之芳基，意即芳基(C_6)烷基。

"烯基"一詞係指直鏈或分枝鏈烴基，具有2至12個碳原子及至少一個雙鍵。2至6個碳原子且具有一個雙鍵之烯基為最佳。烯基可如上文關於烷基所述經取代。

"炔基"一詞係指直鏈或分枝鏈烴基，具有2至12個碳原子及至少一個參鍵。2至6個碳原子且具有一個參鍵之炔基為最佳。炔基可如上文關於烷基所述經取代。

"次烷基"一詞係指二價直鏈或分枝鏈烴基，具有1至12個碳原子，較佳為1至8個碳原子，例如 $\{-CH_2-\}_n$ ，其中n為1至12，較佳為1-8。低碳次烷基，意即1至2個碳原子之次烷基，係為最佳。"次烯基"與"次炔基"術語係個別指如上文定義烯基與炔基之二價基團。次烯基可如上文關於烷基所述經取代。

"烷氧基"一詞係指被如本文所定義之烷基取代之氧原子。例如，"烷氧基"一詞包括基團 $-O-C_{1-6}$ 烷基。

當下標係關於烷氧基、硫基烷基或胺基烷基使用時，下標係指該基團除了雜原子以外可含有之碳原子數。

應明瞭的是，對於所有基團之選擇，包括例如烷氧基、硫基烷基及胺基烷基，將由熟諳此領域者施行，以提供安定化合物。

"羰基"一詞係指二價羰基 $-C(=O)-$ 。

"醯基"一詞係指羰基，經連結至有機基團，更特別是基

團 $C(=O)R_e$ ，以及二價基團 $-C(=O)R_e^-$ ，其係被連結至有機基團。基團 R_e 可選自如本文定義之烷基、烯基、炔基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，或當合適時，為其相應之二價基團，例如次烷基。

"環烷基"一詞係指 3 至 9 個，較佳為 3 至 7 個碳原子之完全飽和與部份不飽和烴環(因此包括"環烯基環")。"環烷基"一詞包括具有零、一、二或三個取代基之環，取代基選自 (C_{1-4}) 烷基、 (C_{2-4}) 烯基、鹵素、羥基、氟基、硝基、 CF_3 、 $O(C_{1-4}$ 烷基)、 OCF_3 、 $C(=O)H$ 、 $C(=O)(C_{1-4}$ 烷基)、 CO_2H 、 $CO_2(C_{1-4}$ 烷基)、 $NHCO_2(C_{1-4}$ 烷基)、 $S(C_{1-4}$ 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_{1-4}$ 烷基)、 $N(C_{1-4}$ 烷基)₂、 $N(C_{1-4}$ 烷基)₃⁺、 $SO_2(C_{1-4}$ 烷基)、 $C(=O)(C_{1-4}$ 次烷基) NH_2 、 $C(=O)(C_{1-4}$ 次烷基) NH (烷基)及 / 或 $C(=O)(C_{1-4}$ 次烷基) $N(C_{1-4}$ 烷基)₂。"環烷基"一詞亦包括具有第二個環經稠合至其上(例如包括苯并、雜環基或雜芳基環)或具有 3 至 4 個碳原子之碳-碳橋基之環。

"鹵基"或"鹵素"術語係指氯基、溴基、氟基及碘基。

"鹵烷基"一詞係意謂經取代之烷基，具有一或多個鹵基取代基。例如，"鹵烷基"包括單、雙及三氟甲基。

"鹵烷氧基"一詞係意謂具有一或多個鹵基取代基之烷氧基。例如，"鹵烷氧基"包括 OCF_3 。

"雜原子"一詞係包括氧、硫及氮。

"芳基"一詞係指苯基、聯苯基、茀基、1-萘基及 2-萘基。"芳基"一詞包括具有零、一、二或三個取代基之環，取代基選自 (C_{1-4}) 烷基、 (C_{2-4}) 烯基、鹵素、羥基、氟基、硝基、

CF_3 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 OCF_3 、 $\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{NHCO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{S}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_3^+$ 、 $\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{NH}(\text{烷基})$ 及 / 或 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_2$ 。

"雜環基"或"雜環族"術語係指經取代與未經取代之非芳族(其可為部份或完全飽和)3-至15-員環，具有一至四個雜原子。此種環可為3-至7-員單環狀基團、7-至11-員雙環狀基團及10-至15-員三環狀基團。含有雜原子之雜環基之各環可含有一或兩個氧或硫原子及/或一至四個氮原子，其條件是各環中雜原子之總數為四或較少，及進一步條件是該環含有至少一個碳原子。完成雙環狀與三環狀基團之稠合環可僅含有碳原子，且可為飽和、部份飽和或不飽和。氮與硫原子可視情況被氧化，且氮原子可視情況被四級化。雜環基可被連接在任何可採用之氮或碳原子上。雜環基環可含有零、一、二或三個取代基，選自 $(\text{C}_{1-4})\text{烷基}$ 、 $(\text{C}_{2-4})\text{烯基}$ 、鹵素、羥基、氰基、硝基、 CF_3 、 $\text{O}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 OCF_3 、 $\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 CO_2H 、 $\text{CO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{NHCO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{S}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 NH_2 、 $\text{NH}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_2$ 、 $\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_3^+$ 、 $\text{SO}_2(\text{C}_{1-4}\text{烷基})$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{NH}(\text{烷基})$ 及 / 或 $\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-4}\text{次烷基})\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_2$ 。舉例之雜環族基團包括一氮四園基、四氫吡咯基、環氧丙烷基、二氫咪唑基、四氫噁唑基、異二氫噁唑基、噁唑啶基、異噁唑啶基、四氫呋喃基、六氫吡啶基、六氫吡阱基、2-酮

基六氫吡咗基、2-酮基六氫吡啶基、2-酮基四氫吡咯基、2-氧一氳七園烯基、一氳七園烯基、4-六氳吡啶酮基、四氳哌喃基、嗎福啉基、硫基嗎福啉基、硫基嗎福啉基亞砜、硫基嗎福啉基砜、1,3-二氳伍園、噁啶基及四氳-1,1-二酮基噻吩基等。

"雜芳基"一詞係指經取代與未經取代之芳族3-至14-員環，具有一至四個選自O、S或N之雜原子在至少一個環中。該環可為5-或6-員單環狀基團、9-或10-員雙環狀基團及11-至14-員三環狀基團。含有雜原子之雜芳基之各環可含有一或兩個氧或硫原子及/或一至四個氮原子，其條件是各環中雜原子之總數為四或較少，且各環具有至少一個碳原子。完成雙環狀與三環狀基團之稠合環可僅含有碳原子，且可為飽和、部份飽和或不飽和。氮與硫原子可視情況被氧化，且氮原子可視情況被四級化。為雙環狀或三環狀之雜芳基必須包含至少一個全芳族環，但一個或多個其他稠合環可為芳族或非芳族。雜芳基可被連接在任何環之任何可採用氮或碳原子上。雜芳基環系統可含有零、一、二或三個取代基，選自(C₁₋₄)烷基、(C₂₋₄)烯基、鹵素、羥基、氰基、硝基、CF₃、O(C₁₋₄烷基)、OCF₃、C(=O)H、C(=O)(C₁₋₄烷基)、CO₂H、CO₂(C₁₋₄烷基)、NHCO₂(C₁₋₄烷基)、S(C₁₋₄烷基)、NH₂、NH(C₁₋₄烷基)、N(C₁₋₄烷基)₂、N(C₁₋₄烷基)₃⁺、SO₂(C₁₋₄烷基)、C(=O)(C₁₋₄次烷基)NH₂、C(=O)(C₁₋₄次烷基)NH(烷基)及/或C(=O)(C₁₋₄次烷基)N(C₁₋₄烷基)₂。

舉例之雜芳基包括吡咯基、吡唑基、二氳吡唑基、咪唑

基、噁唑基、異噁唑基、噻唑基、噻二唑基、異噻唑基、呋喃基、噻吩基、噁二唑基、吡啶基、吡阱基、嘧啶基、嗒阱基、三阱基、吲哚基、苯并噁唑基、苯并二氫伍圓烯基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、喹啉基、四氫異喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、苯并哌喃基、吲阱基、苯并呋喃基、色酮基、香豆基、苯并哌喃基、噓啉基、喹噓啉基、吲唑基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基、二氫異吲哚基、四氫喹啉基等。特定雜芳基包括例如6-取代之喹唑啉-4-基與6-三氟甲基-喹唑啉-4-基。

在基團為視情況經取代之情況中，其係包括經取代與未經取代之基團。

此處所描述之化合物可具有不對稱中心。含有不對稱取代原子之本發明化合物，可以光學活性或外消旋形式單離。此項技藝中習知如何製備光學活性形式，譬如藉由外消旋形式之解析，或藉由光學活性起始物質之合成而得。烯烴、C=N雙鍵等之許多幾何異構物，亦可存在於本文所述之化合物中，且所有此種安定異構物均意欲涵蓋在本發明中。本發明化合物之順式與反式幾何異構物係經描述，並可被單離成異構物之混合物，或成為經分離之異構物形式。一種結構之所有對掌性、非對映異構物、外消旋形式及所有幾何異構形式，均為所意欲的，除非明確指示特定立體化學或異構物形式。

本文中所揭示化合物之一種對掌異構物，與另一種比較，可顯示優越活性。因此，所有立體化學物質係被認為

是本發明之一部份。當需要時，外消旋物質之分離可藉由HPLC，使用對掌性管柱，或藉由解析，使用解析劑譬如氯化樟腦礦醯達成，如 Steven D. Young 等人，抗微生物劑與化學療法，1995, 2602-2605。

於本文中採用之"藥學上可接受"之措辭，係指在安全可靠醫學判斷之範圍內，適用於與人類及動物之組織接觸，而不會有過度毒性、刺激性、過敏性回應或其他問題或併發症，伴隨著合理利益/風險比之化合物、物質、組合物及/或劑型。

於本文中使用之"藥學上可接受之鹽"係指所揭示化合物之衍生物，其中母體化合物係經由製造其酸或鹼鹽而被改質。藥學上可接受鹽之實例，包括但不限於鹼性殘基譬如胺類之礦酸或有機酸鹽；酸性殘基譬如羧酸類之鹼或有機鹽；及其類似物。藥學上可接受之鹽，包括母體化合物之習用無毒性鹽或四級銨鹽，例如製自無毒性無機或有機酸。例如，此種習用無毒性鹽包括衍生自無機酸者，無機酸譬如鹽酸、苯礦酸、氫溴酸、硫酸、氨基礦酸、磷酸、硝酸等；及製自有機酸之鹽，有機酸譬如醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、蘋果酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、雙羥萘酸、順丁烯二酸、羥基順丁烯二酸、苯基醋酸、麩胺酸、苯甲酸、柳酸、礦胺酸、2-乙醯基苯甲酸、反丁烯二酸、甲苯礦酸、甲烷礦酸、乙烷二礦酸、草酸、羥乙礦酸等。

本發明藥學上可接受之鹽，可自含有鹼性或酸性部份之

母體化合物，藉習用化學方法合成而得。一般而言，此種鹽可經由使此等化合物之自由態酸或鹼形式，與化學計量之適當鹼或酸，在水中，或在有機溶劑中，或在此兩者之混合物中反應而製成；一般而言，非水性媒質，例如醚、醋酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈，係為較佳的。適當鹽之清單可參閱 Remington 氏醫藥科學，第 17 版，Mack 出版公司，Easton, PA, 1985, 第 1418 頁，其揭示內容係併於本文供參考。

由於已知前體藥物會提高許多想要之醫藥品質（例如溶解度、生物利用率、製造等...），故本發明化合物可以前體藥物形式傳輸。因此，本發明係意欲涵蓋目前所請求化合物之前體藥物，其傳輸方法及含有彼等之組合物。“前體藥物”係意欲包括任何共價結合之載體，當此種前體藥物被投予哺乳動物病患時，其會在活體內釋出本發明之活性母體藥物。本發明中之前體藥物係經由改變存在於化合物中之官能基而製成，其方式是致使此等改變，無論是在例行操作中或在活體內，分裂成母體化合物。前體藥物包括本發明之化合物，其中羥基、氨基或氫硫基係結合至任何基團，當本發明之前體藥物被投予哺乳動物病患時，其會個別分裂而形成自由態羥基、自由態氨基或自由態氫硫基。前體藥物之實例包括但不限於在本發明化合物中之醇與胺官能基之醋酸酯、甲酸酯及苯甲酸酯衍生物。

“安定化合物”與“安定結構”係意欲表示一種化合物，其足夠強健而自反應混合物中留存著，單離至有用純度，及調配成有效治療劑。本發明係意欲具體化表現安定化合物。

"治療上有效量"係意欲包括單獨本發明化合物之量，或所請求化合物之組合之量，或本發明化合物併用其他活性成份之量，有效抑制MCP-1或有效治療或預防本文中所討論之病症。

於本文中使用之"進行治療"或"治療作業"係涵蓋在哺乳動物中，特別是在人類中之疾病狀態之治療，且包括：
(a)預防該疾病狀態發生於哺乳動物中，特別是當此種哺乳動物易罹患該疾病狀態，但尚未被診斷為具有該疾病時；
(b)抑制該疾病狀態，意即遏制其發展；及/或(c)減輕該疾病狀態，意即造成該疾病狀態之退化。

於本文中使用以指稱特定型式例如"N-2"之名稱，不應被認為是限制關於具有類似或相同物理與化學特性之任何其他物質，而是應明瞭此等指稱僅只是鑑別符號，其應根據亦於本文中提出之特徵鑑定資訊加以解釋。

本發明係提供N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之自由態鹼之結晶型，作為一種新穎物質，特別是呈藥學上可接受之型式。於某些較佳具體實施例中，自由態鹼之結晶型係呈實質純式。自由態鹼之較佳具體實施例係揭示於實例中，譬如N-2、DC-1、THOO-1、E-1、A-1及AN-3。

本發明亦提供N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之鹽之結晶型，作為一種新穎物質，特別是呈藥學上可接受之型式。於某些較佳具體實施例中，鹽之結晶型係

呈實質純式。鹽之較佳具體實施例係揭示於實例中，譬如二-苯磺酸鹽之N-1型式，與HCl鹽之H4-1型式。

於本文中使用之"多晶型物"係指形成晶體之分子、原子及/或離子具有相同化學組成但不同空間排列之結晶型。

於本文中使用之"溶劑合物"係指分子、原子及/或離子之結晶型，其進一步含有被併入晶體結構中之一或多種溶劑之分子。在溶劑合物中之溶劑分子可以規則排列及/或非有序排列存在。溶劑合物可含有無論是化學計量或非化學計量之溶劑分子量。例如，具有非化學計量之溶劑分子量之溶劑合物，可由於溶劑自溶劑合物之部份損失所造成。

於本文中使用之"非晶質"係指不為結晶性之分子、原子及/或離子之固體形式。非晶質固體不會顯示明確之X-射線繞射圖樣。

於本文中使用之"實質上純"，當參考結晶型使用時，係意謂化合物具有純度大於90重量%，包括大於約90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98及99重量%，且亦包括等於約100重量%之化合物I，以化合物重量為基準。其餘物質包括該化合物之其他型式，及/或由於其製備而發生之反應不純物及/或處理不純物。例如，N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之結晶型，當藉由此時已知且此項技藝中一般所接受之方式度量時，可被視為實質上純，因其具有純度大於90重量%，其中其餘小於10重量%之物質係包含N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三

氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之其他型式，及/或反應不純物及/或處理不純物。

結晶型之試樣可具有實質上純相均一性，這顯示有優勢量之單晶型式及視情況具有之少量一或多種其他結晶型存在。超過一種結晶型存在於試樣中，可藉由譬如粉末X-射線繞射(PXRD)或固態核磁共振光譜學(SSNMR)之技術測定。例如，在以實驗方式度量之PXRD圖樣與模擬PXRD圖樣之比較上，額外吸收峰之存在，可表示超過一種結晶型在試樣中。模擬PXRD可計算自單晶X-射線數據。參閱 Smith, D.K., "用於計算X-射線粉末繞射圖樣之FORTRAN程式", Lawrence 放射實驗室, Livermore, California UCRL-7196 (1963年4月)。

結晶型較佳係具有實質上純相均一性，如藉由在以實驗方式度量之PXRD圖樣中，由於不存在於模擬PXRD圖樣中之額外吸收峰所發生之低於總吸收峰面積之10%，較佳係低於5%，且更佳係低於2%所顯示者。最佳為一種結晶型，其具有實質上純相均一性，在以實驗方式度量之PXRD圖樣中之總吸收峰面積，具有由於不存在於模擬PXRD圖樣中之額外吸收峰所發生之低於1%。

製備結晶型之程序係為此項技藝中已知。結晶型可藉由多種方法製備，包括例如自適當溶劑之結晶化作用或再結晶化作用，昇華作用，自熔融體之生長，自另一相之固態轉變，自超臨界流體之結晶化作用，及噴射噴霧。結晶型來自溶劑混合物之結晶化作用或再結晶化作用之技術，包

括例如溶劑之蒸發，降低溶劑混合物之溫度，將分子及/或鹽之過飽和溶劑混合物加入晶種，使溶劑混合物凍乾，及添加反溶劑(反萃溶劑)至溶劑混合物中。

此等型式可使用單晶X-射線繞射作特徵鑑定與區別，其係以一種型式之單晶在固定分析溫度下之單位晶胞度量為基礎。單位晶胞之詳細說明係提供於Stout & Jensen, X-射線結構測定：實用指南，Macmillan公司，New York (1968)，第3章中，其係併於本文供參考。或者，原子在結晶格子內空間關係上之獨特排列，可根據所發現之部份原子座標作特徵鑑定。另一種表現晶體結構特徵之方式係藉由粉末X-射線繞射分析，其中係將實驗或所發現之繞射分佈形態，與代表純粉末物質之模擬分佈形態作比較，兩者均在相同分析溫度下操作，且關於主題型式之度量值係被特徵鑑定為一系列 2θ 值。

可使用表現此型式特徵之其他方式，譬如固態核磁共振(SSNMR)、示差掃描卡計法及熱重分析。此等參數亦可合併使用，以表現主題型式之特徵。

於本文中採用之"可忽視之重量損失"一詞，當藉由TGA作特徵鑑定時，係顯示純(未經溶劑化合)結晶型之存在。

於本文中採用之"可忽視之%吸水率"一詞，當藉由水份吸著等溫線作特徵鑑定時，係顯示經測試之型式為非吸濕性。

於本發明之一項具體實施例中，N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)四氫

吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之結晶型，係以實質純式提供。此結晶型可被採用於醫藥組合物中，其可視情況包含一或多種其他經選擇之成份，例如來自包括賦形劑、載劑及其他活性醫藥成份或不同分子結構之活性化學個體之一。

結晶型較佳係具有實質上純相均一性，如藉由在以實驗方式度量之PXRD圖樣中，由於不存在於模擬PXRD圖樣中之額外吸收峰所發生之低於總吸收峰面積之10%，較佳係低於5%，且更佳係低於2%所顯示者。最佳為一種結晶型，其具有實質上純相均一性，在以實驗方式度量之PXRD圖樣中之總吸收峰面積，具有由於不存在於模擬PXRD圖樣中之額外吸收峰所發生之低於1%。

於另一項具體實施例中，係提供一種組合物，其基本上包含N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之結晶型。此項具體實施例之組合物可包含至少90重量%該型式，以其在組合物中之重量為基準。

反應不純物及/或處理不純物之存在可藉由此項技藝中已知之分析技術測定，例如層析、核磁共振光譜學、質量光譜法或紅外線光譜學。

結晶型可藉由多種方法製備，包括例如自適當溶劑之結晶化作用或再結晶化作用，昇華作用，自熔融體之生長，自另一相之固態轉變，自超臨界流體之結晶化作用，及噴射噴霧。結晶型來自溶劑混合物之結晶化作用或再結晶化

作用之技術，包括例如溶劑之蒸發，降低溶劑混合物之溫度，將分子及/或鹽之過飽和溶劑混合物加入晶種，使溶劑混合物凍乾，及添加反溶劑(反萃溶劑)至溶劑混合物中。可採用高通過量結晶化作用技術，以製備結晶型，包括多晶型物。

藥物之晶體，包括多晶型物，製備方法，及藥物晶體之特徵鑑定，係討論於藥物之固態化學，S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer 及 J.G. Stowell, 第 2 版，SSCI, West Lafayette, Indiana (1999) 中。

關於採用溶劑之結晶化技術，一或多種溶劑之選擇，典型上係依一或多項因素而定，譬如化合物之溶解度、結晶化技術及溶劑之蒸氣壓。可採用溶劑之組合，例如可使化合物溶解至第一種溶劑中而得溶液，接著添加反溶劑，以降低化合物在溶液中之溶解度，且獲得晶體之形成。“反溶劑”為其中化合物具有低溶解度之溶劑。製備晶體之適當溶劑包括極性與非極性溶劑。

在一種製備晶體之方法中，係使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(為自由態鹼或鹽)懸浮及/或攪拌於適當溶劑中，而得漿液，可將其加熱以促進溶解。於本文中使用之“漿液”一詞係意謂飽和溶液，其亦可含有另一數量之固體，而得於特定溫度下之不均勻混合物。關於此點之適當溶劑包括例如極性非質子性溶劑與極性質子性溶劑，及其中兩種或多種之混合物，如本文中所揭示。

可將種晶添加至任何結晶化作用混合物中，以促進結晶

化作用。正如熟練技師將明瞭的，使用晶種係作為一種控制特定結晶型生長之方式，或作為一種控制結晶性產物粒子大小分佈之方式。因此，所需要晶種量之計算，係依可採用晶種之大小與平均產物粒子之所要大小而定，譬如在"批次結晶器之程式化冷卻"，J.W. Mullin 與 J. Nyvlt，化學工程科學(1971) 26：369-377 中所述者。一般而言，係需要小尺寸晶種，以有效地控制晶體在批次中之生長。小尺寸晶種可藉由較大晶體之篩濾、研磨或微粉化，或藉由溶液之微結晶化作用產生。應小心的是晶體之研磨或微粉化不會造成來自所要結晶型之結晶度上之任何改變(意即改變成非晶質或另一種多晶型物)。

經冷卻混合物可於真空下過濾，且可將經單離之固體以適當溶劑洗滌，譬如冷再結晶作用溶劑，並於氮氣下乾燥，而得所要之結晶型。經單離之固體可藉由適當光譜或分析技術分析，譬如 SSNMR、DSC、PXRD 或其類似方式，以確保產物之較佳結晶型形成。所形成之結晶型典型上係以大於約 70 重量% 經單離產率，但較佳係大於 90 重量% 之量製成，以最初被採用於結晶化作用程序中之 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之重量為基準。若必要，此產物可經共研磨或通過網目篩網，以去除產物團塊。

結晶型可直接製自用於製備 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯

-1-基)環己基)乙醯胺(自由態鹼或鹽)之最後處理步驟之反應媒質。這可例如藉由在最後處理步驟中採用化合物可自其結晶之溶劑或溶劑混合物達成。或者，結晶型可藉蒸發或溶劑添加技術獲得。供此項目的使用之適當溶劑，包括任何本文中所述之溶劑，包括質子性極性溶劑，譬如醇類，及非質子性極性溶劑，譬如酮類。

以下述作為一般指引，可將反應混合物過濾以移除任何不期望之不純物、無機鹽等，接著以反應物或結晶化作用溶劑洗滌。可使所形成之溶液濃縮，以移除過量溶劑或氣態組份。若採用蒸餾，則所收集餾出物之最後量可以改變，依製程因數而定，包括例如容器大小、攪拌能力等。以下述作為一般指引，在進行溶劑置換之前，可使反應溶液蒸餾至原先體積之約 1/10。可根據標準製程技術，將反應物取樣與檢測，以測定反應之程度與重量%產物。若需要，可添加或移除其他反應溶劑，以使反應濃度達最佳化。最後濃度較佳係被調整至約 50 重量%，此時典型上造成漿液。

較佳可直接添加溶劑至反應容器，而無需蒸餾反應混合物。供此項目的使用之較佳溶劑，係為可最後參與結晶格子者，如上文關於溶劑交換所討論者。雖然最後濃度可依所要之純度、回收等而改變，但自由態鹼在溶液中之最後濃度，較佳為約 4% 至約 7%。可將反應混合物在溶劑添加之後攪拌，且同時溫熱。以下述作為說明，可將反應混合物攪拌約 1 小時，同時溫熱至約 70°C。反應較佳係經熱過濾，並以無論是反應溶劑、所添加之溶劑或其組合洗滌。可添

加種晶至任何結晶化作用溶液中，以引發結晶化作用。

本文中所述之各種型式可經由利用一般熟諳此藝者已知之各種分析技術彼此區別。此種技術包括但不限於粉末X-射線繞射(PXRD)、示差掃描卡計法(DSC)及/或熱重分析(TGA)。或者，此等型式可使用單晶X-射線繞射作特徵鑑定與區別，其係以一種特定型式之單晶在固定分析溫度下之單位晶胞度量為基礎。單位晶胞之詳細說明係提供於Stout & Jensen, X-射線結構測定：實用指南，Macmillan公司，New York (1968)，第3章中，其係併於本文供參考。明確言之，原子在結晶格子內於空間關係上之獨特排列，可根據所發現之部份原子座標作特徵鑑定。另一種表現晶體結構特徵之方式係藉由粉末x-射線繞射分析，其中係將所發現之繞射分佈形態，與產生自單晶結構數據之模擬分佈形態作比較。關於主題型式之粉末x-射線繞射度量值係被特徵鑑定為一系列 2θ 值(通常為四或更多個)。

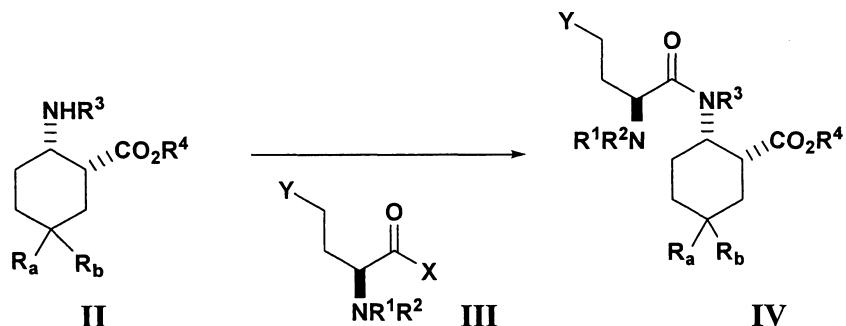
可使用表現此型式特徵之其他方式，譬如固態核磁共振(SSNMR)、示差掃描卡計法(DSC)、熱記錄術及結晶性或非晶質型態學之總體檢查。此等參數亦可合併使用，以表現主題型式之特徵。

一般熟諳此藝者將明瞭X-射線繞射圖樣可被獲得而具有度量誤差，其係依所採用之度量條件而定。特定言之，一般已知X-射線繞射圖樣中之強度可能波動，依所採用之度量條件，及晶體之形狀或型態學而定。應進一步明瞭的是，相對強度亦可依實驗條件而改變，因此正確強度等級不應

納入考量。此外，關於習用 X-射線繞射圖樣繞射角度之度量誤差，典型上為約 $0.2^\circ 2\theta$ 值或較低，較佳為約 $0.1^\circ 2\theta$ 值(如後文所討論)，且此種程度之度量誤差應被納入考量，譬如關於前文所提及之繞射角度。因此，應明瞭的是，本發明之結晶型並不限於提供 X-射線繞射圖樣完全相同於本文所揭示附圖中所描繪 X-射線繞射圖樣之結晶型。任何提供 X-射線繞射圖樣實質上相同於附圖中所揭示者之結晶型，係落在本發明之範圍內。確定 X-射線繞射圖樣實質同一性之能力，係在一般熟諳此藝者之技術範圍內。

合成

圖式 1：醯胺 IV 之製備



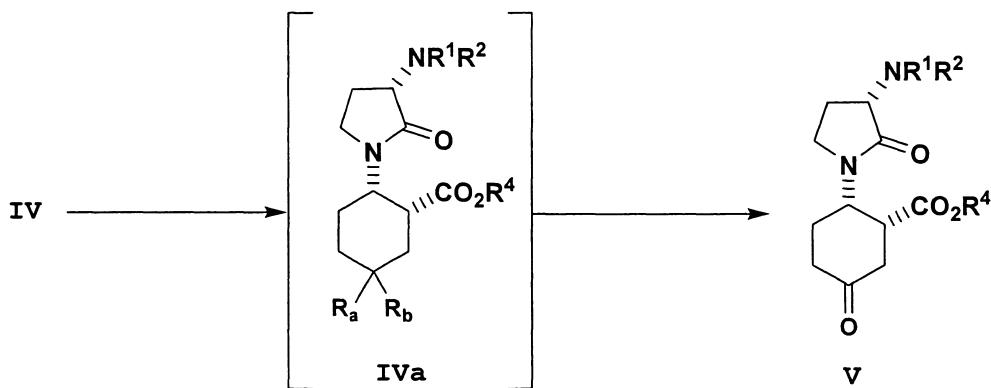
式 II β -胺基酯或其鹽，包括甲苯磺酸鹽或氫溴酸鹽，係使用此項技藝中已知之方法，與經適當保護之式 III 對掌性 α -胺基酸偶合，而得醯胺 IV。參閱，例如 WO2005021500 中之製備。此偶合反應可以二醯亞胺試劑，於活化劑與三級胺鹼存在下，在惰性大氣譬如氮或氩(較佳為氮)下，於非質子性溶劑譬如丙腈、醋酸異丙酯、醋酸正-丁酯、醋酸第三-丁酯或乙腈(尤其是乙腈及/或醋酸乙酯)中進行。二醯亞胺偶合試劑包括例如 EDAC 之試劑。活化劑之實例包括 1-羥基苯并三唑(HOBt；該術語包括其水合物)與 N,N'-4-二甲胺基

-吡啶。三級胺鹼包括例如三乙胺、N-N-二異丙基-N-乙胺及三-正-丙基胺。式II胺基酯對二醯亞胺偶合試劑對活化劑對三級胺之莫耳比，係個別為一對約0.90-1.50對約0.95-1.50對約2.00至3.00。該莫耳比較佳係個別為一對約0.95-1.05對約0.95-1.10及對約2.10至2.30。

β -胺基酯係經選擇，以致使 R_a 與 R_b 為烷氨基或烷基硫醇化物基團，或與彼等所連接之碳原子一起形成羰基，或形成環狀或非環狀縮醛或硫代縮醛，較佳為1,3-二氧五園基團。 R_4 為 C_{1-6} 烷基，較佳為乙基。

式III對掌性 α -胺基酸係併入可官能基化之末端殘基Y，其無論是表示或可被精巧地製成適用於Y所連接之側鏈末梢碳在醯胺氮上之稍後環化作用之烷基化基團，因此，Y可選自一些基團，譬如鹵素、SMe或 OSO_2R_{12} ，其中 R_{12} 為 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)C(O)OR_{13}$ 或 $-(CH_2)C(O)R_{13}$ ；且 R_{13} ，在每一存在處，為 C_{1-6} 烷基。 X 為OH、鹵素或 $OCOR_{14}$ ，其中 R_{14} 為 C_{1-6} 烷基。關於式III對掌性 α -胺基酸之適當保護基 R_1 與 R_2 係獨立選自氫或胺-保護基，其可藉由水解作用或氫解作用，在標準條件下被移除。此種基團係包括但不限於苄氧羰基(Cbz)、第三-丁氧羰基(BOC)、茀基甲基氧基羰基(FMOC)、苄基(Bn)或對-甲氧基苄基(PMB)。較佳基團為Cbz、BOC或Bn基團。Cbz為最佳。

圖式 2：式 IV 鹼胺之製備



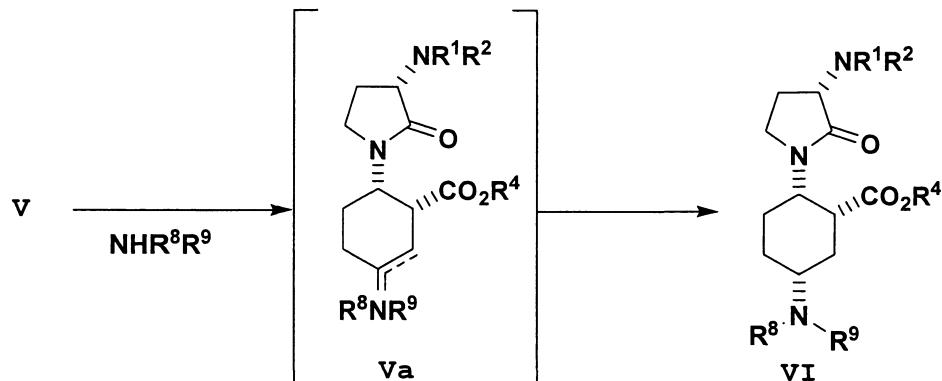
式 V 化合物係經由烷基化部份基團 Y 於醯胺氮上之環化作用，以形成四氫吡咯酮環而製成，於該轉變期間，Y 係充作脫離基。於一項較佳具體實施例中，烷基化部份基團係表示藉由甲硫胺酸所衍生醯胺 IV ($Y=SMe$) 之活化作用，使用此項技藝中所習知之硫-烷基化劑(例如 C_{1-6} 烷基或芳基鹵化物，較佳為碘化甲烷)所產生之锍鹽 ($Y=S^+(Me)R_{13}$ ，其中 R_{13} 為 C_{1-6} 烷基、芳基或經取代之芳基，甲基為最佳)。參閱，例如 Freidinger 等人，J. Org. Chem. 1982, 47, 10。

環化作用係在惰性大氣譬如氮或氬(較佳為氮)下，於溶劑中，經由使化合物 IV 或其鹽與鹼，於非質子性溶劑存在下接觸而進行。此種鹼可為例如但不限於碳酸銫、重碳酸銫、碳酸鉀、第三-丁醇鈉或六甲基二矽氮化鈉，尤其是碳酸銫。非質子性溶劑包括例如但不限於 DMSO、DMF、DMA、N-甲基四氫吡咯酮(NMP)及環丁砜，較佳為 DMSO 及 / 或 DMF。

在 R_a 與 R_b 係獨立為 C_{1-6} 烷氧基，或和彼等所連接之原子一起合併，以形成環狀或非環狀縮醛或硫代縮醛之情況下，縮醛基團係根據此項技藝中所習知之方法，藉由去除保護而被移除，以形成羰基。對於縮醛，去除保護可藉由

水解作用進行，較佳係在溶劑譬如丙酮、丁酮、乙腈及異丙醇或其水溶液中進行，且較佳係在丙酮水溶液中進行。其中該縮醛去除保護係需要質子酸類，例如硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲烷磺酸、氫溴酸或鹽酸，鹽酸為最佳。

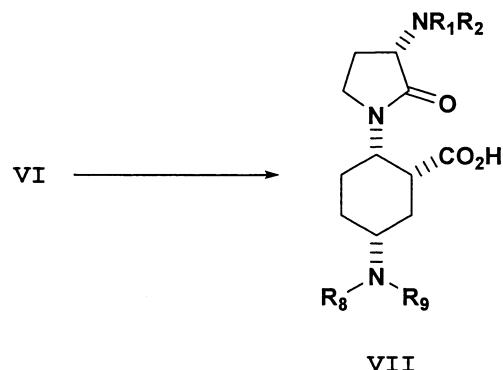
圖式3：化合物V之還原胺化作用



化合物VI係在兩個步驟中經由以還原方式使式V化合物胺化而製成，其方式是(a)將胺 $\text{NH}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$ 與脫水劑添加至式V在非質子性溶劑中之溶液內，並在 -20° 至 $+50^\circ\text{C}$ 之溫度下混合，以形成式Va之亞胺/烯胺；與(b)在氫氣壓力下，以鉑觸媒處理式Va亞胺/烯胺之溶液，該鉑觸媒較佳係含有去活化劑，譬如硫，較佳為5% Pt/C/S。胺取代基 R_8 與 R_9 係獨立選自氫與 C_{1-6} 烷基。式 $\text{NH}(\text{R}_8)(\text{R}_9)$ 胺較佳為N-甲基-N-異丙胺。脫水劑為路易士酸/布朗司特酸脫水作用促進劑，其係包括但不限於鈦試劑，較佳為四氯化鈦或四異丙氧化鈦或其混合物(尤其是四異丙氧化鈦)。參閱，例如 R. Mattson 等人, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 2552-2554。非質子性溶劑可選自但不限於一些溶劑，譬如二氯乙烷、二氯甲烷、乙腈、DMSO、DMF及N-甲基-四氫吡咯酮(較佳為二氯甲烷)。中間物亞胺/烯胺Va在二氯甲烷中之溶液，較佳係在15-35 psig之壓力與5% Pt/S/C

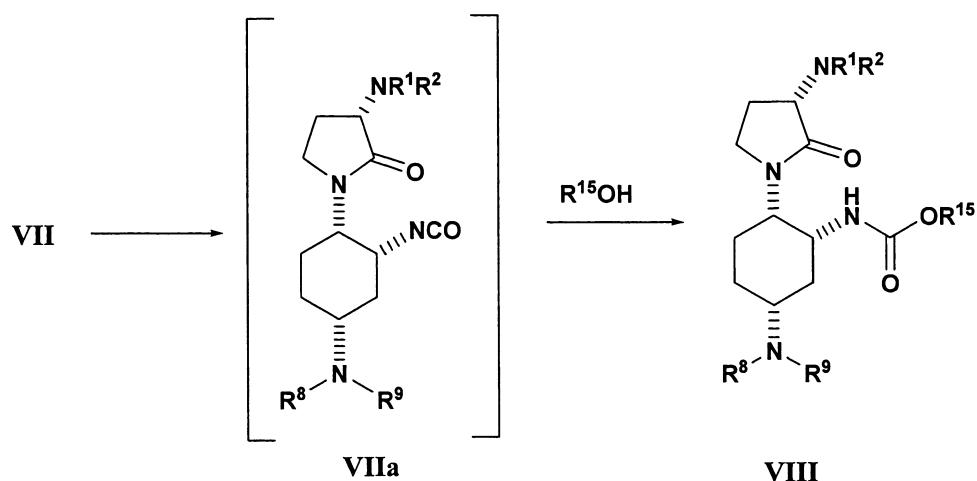
下，在相對於化合物 V 為大約 0.5 至 50% (重量 / 重量) 下，以氫氣處理。最佳範圍為 5-10% (重量 / 重量)。

圖式 4：式 VII γ -胺基酸或其鹽之製備



使式 VI 化合物之酯水解，以獲得相應之式 VII 酸或其鹽。水解作用可藉由鹼水解作用，使用此項技藝中一般已知之方法進行，或者，在高溫下使用酸類水溶液，以獲得其相應之式 VII γ -胺基酸。酸水解作用為最佳。溫度範圍為約 40 °C 至約 100 °C (約 50 °C 至約 70 °C 之溫度範圍為最佳)。酸類係選自但不限於硫酸、甲苯磺酸、硝酸、甲烷磺酸、氫溴酸或鹽酸。鹽酸為最佳。式 VII 化合物可視情況被轉化成其羧酸鹽。VII 較佳係被轉化成其鈉鹽。

圖式 5：胺基甲酸酯 VIII 之製備

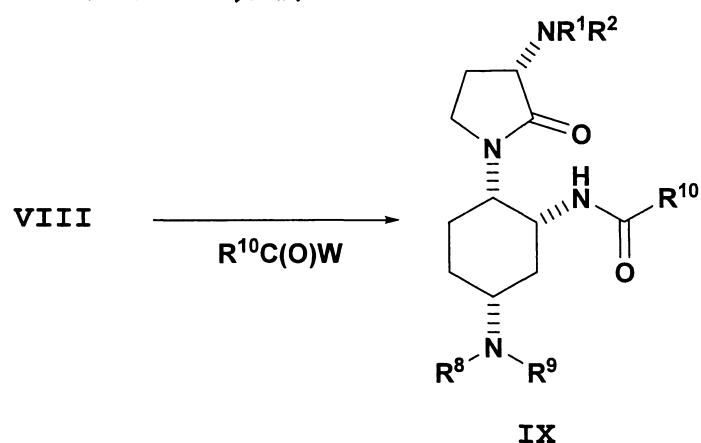


式 VIII 胺基甲酸酯類係經由使式 VII γ -胺基酸轉化成具有

式 VIIa 之異氰酸酯而製成；且使異氰酸酯與式 $R^{15}OH$ 之醇反應，而得式 VIII 胺基甲酸酯。變數 R^{15} 級經選擇，以致使胺基甲酸酯形成胺-保護基，其可在標準水解作用或氫解作用條件下移除。此種胺-保護基較佳為 $N-CO_2$ -第三-丁基(得自 $R^{15}=$ 第三-丁基)或 $N-CO_2$ -苄基(得自 $R^{15}=$ 苄基)或 $N-CO_2$ -取代之苄基(得自 $R^{15}=$ 經取代之苄基)。較佳醇為第三-丁醇。

VII 之轉化成異氰酸酯 VIIa 可經由數種方法之一進行，意即 Curtius-、Hofmann- 或 Schmidt-Lossen 重排。Curtius 重排較佳係經由使 γ -胺基酸 VII (或其鹽) 與疊氮化二苯基磷醯，於醇溶劑(較佳為第三-丁醇)中，較佳但不限於含有甲苯或其他適當非質子性共溶劑，在高於熱重排成異氰酸酯之觸發點之溫度(較佳係在於或高於 $50^\circ C$ 下)下接觸而進行。

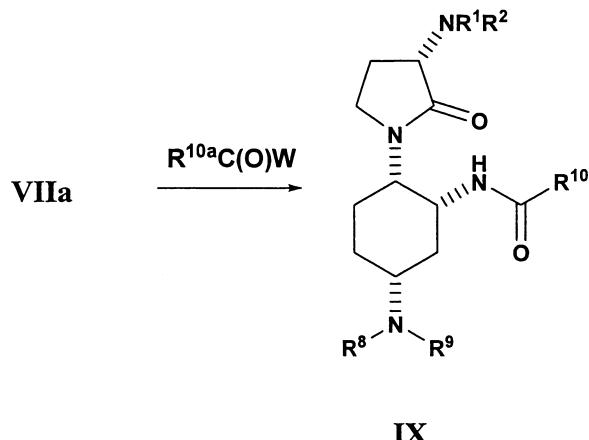
圖式 6：式 IX 化合物之製備



式 IX 化合物係以下述方式製成，使式 VIII 化合物中之胺基甲酸酯部份基團去除保護，接著使自由態胺以式 $R^{10}C(O)W$ 試劑醯化，其中 W 為鹵素或 $R^{10}C(O)$ ，而得式 IX 化合物。胺基甲酸酯去除保護係藉由此項技藝中一般已知之方法進行(例如對於 $R^{10}=$ 第三-丁基，酸去除保護可以硫酸、甲苯礦

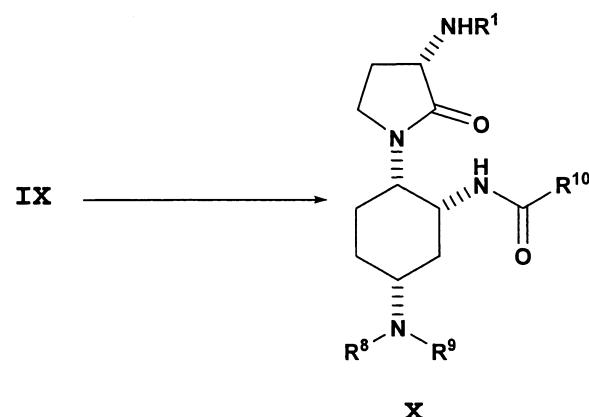
酸、硝酸、甲烷磺酸、氫溴酸或鹽酸進行-甲烷磺酸為最佳)。然後添加鹼(較佳為三乙胺)，並使自由態胺與式 $R_{10}C(O)W$ 化合物接觸，其中 W 為鹵素或 $R^{10}C(O)$ ，而得結構 IX 化合物。

圖式 7：式 IX 化合物之替代製備



式 IX 化合物之替代製備包括直接醯化中間物異氰酸酯 VIIa (參閱上文圖式 5)，其方式是視情況當場添加至醯化劑 $R^{10a}C(O)W$ 中，其中 W 為 $R^{10a}C(O)$ ，於其相應酸 (W = 氢) 存在下。醯化作用較佳係經由將異氰酸酯引進醋酸與醋酸酐之混合物 (其中 R^{10a} 為甲基，且 W 為氫) 中進行，而得式 IX 化合物。

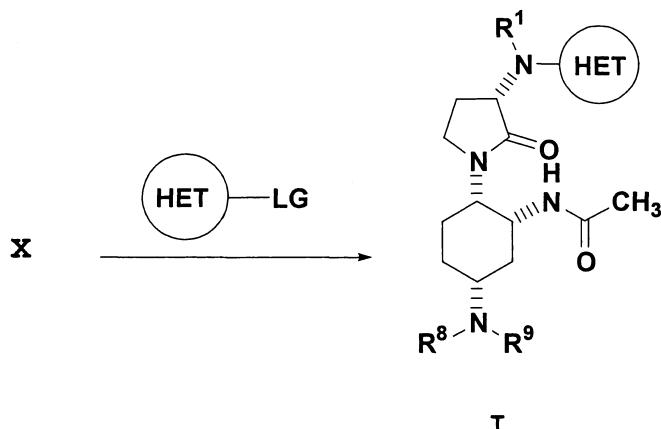
圖式 7：式 X 化合物之製備



在式 IX 化合物中之 R^2 基團係藉由去除保護移除，以提供

式 X 化合物。若 R² 為 Cbz，則去除保護較佳係藉由氫化作用，於鈀觸媒(較佳為 10% Pd/C)存在下達成。

圖式 8：式 I 化合物之製備



I

式 I 化合物係經由使已去除保護之式 X 肽與下式化合物：

偶合而製成，以獲得式 I 化合物。此種偶合反應及其進行條件，係為熟諳此藝者所已知。HET 為視情況經取代之 3-14 員雜環基或雜芳基環，具有一或多個選自 N、O 或 S 之雜原子(較佳為一至三個雜原子，尤其是一至兩個氮原子)。較佳雜芳基包括但不限於 6-取代之喹唑啉-4-基，更佳為 6-三氟甲基-喹唑啉-4-基。於本文中使用之脫離基(LG)包括但不限於一些基團，譬如鹵素、C₁₋₆烷氧基、甲烷磺酸鹽、九氟烷磺酸鹽、磺酸鹽、甲苯磺酸鹽及三氟甲烷磺酸鹽。LG 較佳為選自鹵素或 OSO₂R₁₋₆ 之脫離基，其中 R₁₋₆ 為苯基，5-至 7-員雜芳基，具有一或多個選自 N、S 或 O 之原子，C₁₋₆ 烷基或 3-至 7-員環烷基，其全部均視情況被一至三個選自鹵素、CF₃ 及 C₁₋₆ 烷基之基團取代。較佳脫離基為鹵素，尤其是氯化物。

關於本發明之方法，起始物質係為市購可得或可容易地

由一般熟諳此藝者製備。溶劑、溫度、壓力、具有所要基團之起始物質及其他反應條件，可容易地由一般熟諳此藝者按適當方式選擇。此方法可按比例增大，以製備較大量之式I化合物，譬如以商業化生產設備。

【實施方式】

實例

下述實例係說明本發明化合物與起始物質之具體實施例，而非意欲限制請求項之範圍。

按適當方式，反應係於乾燥氮(或氬)之大氣下進行。關於無水反應，係採用得自EM之Dri-Solv溶劑。關於其他反應，係使用試藥級或HPLC級溶劑。除非另有述及，否則全部市購所得之試劑均以接收時之情況使用。

LC/MS度量值係使用Shimadzu HPLC/Waters ZQ單一四極質譜儀混合系統獲得。關於吾人感興趣吸收峰之數據，係自正模式電噴霧離子化作用報告。NMR(核磁共振)光譜典型上係於Bruker或JEOL 400 MHz與500 MHz儀器上，在所指示之溶劑中獲得。所有化學位移係以距離具有溶劑共振而作為內標準之四甲基矽烷之ppm作報告。 $^1\text{H-NMR}$ 光譜數據典型上係報告如下：化學位移，多重性(s = 單重峰，brs = 寬廣單峰，d = 二重峰，dd = 二重峰之二重峰，t = 三重峰，q = 四重峰，sep = 七重峰，m = 多重峰，app = 表觀)，偶合常數(Hz)及積分。

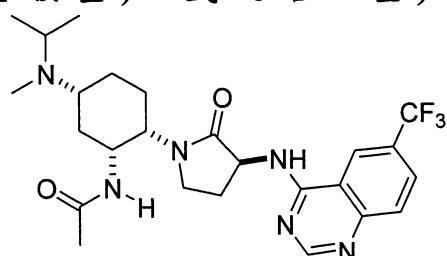
熟諳此藝者將明瞭本文中所使用之標準縮寫。為了易於參考，故縮寫係包括但未必受限於：sat. = 飽和，HPLC = 高

性能液相層析法，AP = 面積百分比，KF = Karl-Fischer，RT = 室溫(除非另有指定，否則RT為約22°C之溫度)，mmol = 毫莫耳，HRMS = 高解析質量光譜，TBTU = 四氟硼酸O-苯并三唑-2-基-N,N,N',N'-四甲基銨，MTBE = TBME = 第三-丁基甲基醚，EDAC = N-(3-二甲胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽，EDC = N-(3-二甲胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺，TEA = 三乙胺，DPPA = 疊氮化二苯基磷醯，IPA = 異丙醇，TFA = 三氟醋酸，DCM = 二氯甲烷，THF = 四氫呋喃，DMF = N,N-二甲基甲醯胺，BOP = 六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)參(二甲胺基)磷，EtOAc = 醋酸乙酯，DMSO = 二甲亞砜，°C = 攝氏度數，eq = 當量或數當量，g = 克或數克，mg = 毫克或數毫克，mL(或ml) = 毫升或數毫升，h = 小時或數小時，M = 莫耳濃度，N = 當量濃度，min = 分鐘或數分鐘，MHz = 百萬赫茲，TLC = 薄層層析法，v/v = 體積對體積比例。

" α "、" β "、"R"及"S"係為熟諳此藝者所熟悉之立體化學名稱。

實例 1

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺



實例 1，步驟 1：使(1R,2S,5R)-2-苄基氨基-7-酮基-6-氮-雙環并[3.2.1]辛烷-6-羧酸第三-丁酯(89.6克，0.24莫耳，參閱：

P. H. Carter 等人，PCT 申請案 WO 2005/021500) 溶於醋酸乙酯(1.5 升)中，並將所形成之溶液以飽和 NaHCO_3 (2×0.45 升) 與飽和 NaCl (1×0.45 升) 洗滌。使溶液脫水乾燥(Na_2SO_4)，然後直接過濾進入3頸3升圓底燒瓶中。將溶液以直接氮注入滌氣，然後，在氮大氣下裝填 10% Pd/C (13.65 克)。將燒瓶抽氣，且以氮逆充填；將其再重複兩次。使氮起泡經過此溶液 30 分鐘，接著，將反應物在 1 大氣壓 H_2 下攪拌 18 小時。將燒瓶抽氣，以氮逆充填，及裝填新觸媒(6 克 10% Pd/C)。使氮起泡經過此溶液 30 分鐘，然後，將反應物於 1 大氣壓 H_2 下攪拌 18 小時。將燒瓶抽氣，並以氮逆充填。使混合物經過矽藻土過濾；接著，以醋酸乙酯洗滌過濾墊。以乙腈(0.3 升)稀釋濾液(~1.6 升 EtOAc 體積)，且相繼裝填 L-N-Cbz-甲硫胺酸(68 克，0.24 莫耳)、TBTU (77 克，0.24 莫耳) 及 N,N-二異丙基乙胺(42 毫升，0.24 莫耳)。將反應物在室溫下攪拌 4 小時，於此段時間內，其係從懸浮液改變成透明溶液。藉由添加飽和 NH_4Cl (0.75 升) 與水(0.15 升)使反應淬滅；將混合物以 EtOAc (0.75 升) 再稀釋。將液相混合，並分離，且將有機相以飽和 Na_2CO_3 (2×0.9 升) 與飽和 NaCl (1×0.75 升) 洗滌。使溶液脫水乾燥(Na_2SO_4)，過濾，及在真空中濃縮，而得 (1R,2S,5R)-2-((S)-2-(苄氧羰基胺基)-4-(甲硫基)丁醯胺基)-7-酮基-6-氮-雙環并[3.2.1]辛烷-6-羧酸第三-丁酯，為油狀物，將其帶至下一步驟，無需進一步純化。關於主要吸收峰之 LC/MS : $[\text{M-Boc}+\text{H}]^+ = 406.3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 528.3$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH) : δ 7.36 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 4.0 (m, 1H),

2.5-2.7 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (m, 4H), 1.9 (m, 1H), 1.7 (m, 2H), 1.54 (s, 9H). 亦存在 EtOAc [1.26 (t), 2.03 (s), 4.12 (q)] 與 N,N,N,N-四甲基脲 [2.83 (s)].

實例 1，步驟 2：使 (1R,2S,5R)-2-((S)-2-(芐氧羰基胺基)-4-(甲硫基)丁醯胺基)-7-酮基-6-氮-雙環并[3.2.1]辛烷-6-羧酸第三-丁酯之試樣(假定為 0.24 莫耳；參閱先前程序)溶於碘甲烷(1,250 克)中，並在室溫下攪拌 48 小時。在真空中濃縮反應物。使殘留物溶於二氯甲烷中，及在真空中濃縮。將其再重複兩次。使所形成之泥狀物溶於二氯甲烷(0.4 升)中，並倒入正迅速攪拌之 MTBE 溶液(4.0 升)中。將所形成之黃色固體經由抽氣過濾收集，且在高真空下乾燥，而得銻鹽(179 克)。將此物質帶至下一步驟，無需進一步純化。關於主要吸收峰之 LC/MS : $[M-Me_2S+H]^+ = 458.4$; $[M]^+ = 520.4$. 1H -NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7.35 (m, 5H), 5.09 (s, 2H), 4.33 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.3-3.45 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (m, 1H), 2.0-2.3 (m, 4H), 1.7 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). 亦存在 MTBE [1.18 (s), 3.2 (s)] 與微量之 N,N,N,N-四甲基脲 [2.81 (s)]。

實例 1，步驟 3：使得自前一步驟之全部銻鹽(假定為 0.24 莫耳)溶於 DMSO (2.0 升)中。將所形成之溶液於氮氣及室溫下攪拌，並分次裝填碳酸鉍(216 克)。將此懸浮液於室溫下攪拌 3 小時，然後過濾，以移除固體。將溶液區分成數份~0.22 升，且按上述處理：將反應混合物(~0.22 升)以醋酸乙酯(1.5 升)稀釋，並以水(3×0.5 升)與鹽水(1×0.3 升)連續洗滌。使有機相脫水乾燥(Na_2SO_4)，過濾，及在真空中濃縮。

獲得所要之(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(芊 氧 羰 基 胺 基)-2-酮 基 四 氣 吡 咯 -1-基)-7-酮 基 -6-氮 雙 環 并 [3.2.1]辛 烷 -6-羧 酸 第 三 -丁 酯 (90.8 克 , 83%) , 為微晶性泡沫物 , 不含四甲基脲不純物質。關於主要吸收峰之LC/MS : $[M\text{-Boc}+\text{H}]^+ = 358.4$; $[M+\text{Na}]^+ = 480.4$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_4\text{-MeOH}$) : δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.2 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.28-2.42 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 1.7-2.0 (m, 5H), 1.55 (s, 9H) 。若需要 , 此物質可藉由溶於MTBE (1體積)中 , 添加至庚烷 (3.3體積)中 , 及收集所形成之沉澱物 , 而被單離成固體。

實例 1 , 步驟 4 : 於(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(芊 氧 羰 基 胺 基)-2-酮 基 四 氣 吡 咯 -1-基)-7-酮 基 -6-氮 雙 環 并 [3.2.1]辛 烷 -6-羧 酸 第 三 -丁 酯 (108 克 , 0.236 莫耳)在THF (1升)中之正在攪拌溶液內 , 裝填氫氧化鋰單水合物 (21.74 克 , 0.519 莫耳)。慢慢添加水 (0.3 升) , 以致使溫度不超過20°C 。將反應物在室溫下攪拌過夜 , 且於真空中移除揮發性物質。經由添加1N HCl (450毫升)與 NaH_2PO_4 調整pH值至~4。將所形成之白色沉澱物藉過濾收集 , 並以水 (2×1 升)洗滌。使固體溶於二氯甲烷 (1.5升)與水 (~1升)中。使有機層脫水乾燥 (Na_2SO_4) , 過濾 , 及在真空中濃縮。使殘留物溶於EtOAc (0.7升)中 , 並將所形成之溶液在回流下加熱1小時。於冷卻至室溫後 , 分離固體 , 及經由過濾收集。使此等固體於異丙醇中藉再結晶純化 , 而得所要之(1R,2S,5R)-2-((S)-3-(芊 氧 羰 基 胺 基)-2-酮 基 四 氣 吡 咯 -1-基)-5-(第 三 -丁 氧 羰 基 胺 基)環 己 烷 羧 酸 , 為白色固體 (104.5 克 , 93% 產率)。關於主要吸收峰之LC/MS : $[M\text{-tBu}+\text{H}]^+ = 420.2$;

$[M\text{-Boc}+H]^+ = 376.2$; $[M+H]^+ = 476.2$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_4\text{-MeOH}$) : δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.45-3.6 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.0 (m, 2H), 1.6-1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

實例 1，步驟 5：於 3 升圓底燒瓶中，裝填 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄 氧 羰 基 胺 基)-2-酮 基 四 氢 吡 啯 -1-基)-5-(第 三 -丁 氧 羰 基 胺 基)環 己 烷 羥 酸 (75.5 克， 0.158 莫耳)、 EDC • HCl (33.5 克， 0.175 莫耳)、 1-羥 基 苯 并 三 喹 (23.6 克， 0.175 莫耳) 及 二 氯 甲 烷 (1 升)。將 反 應 物 在 室 溫 下 攪 拌 2 小 時， 於 此 段 時 間 內， 其 係 從 白 色 懸 浮 液 改 變 成 透 明 溶 液。使 氨 (氣 體) 起 泡 進 入 溶 液 中， 直 到 pH 值 為 強 鹼 性 (紙) 為 止， 並 將 反 應 物 攪 拌 10 分 鐘； 重 複 添加 此 氨， 且 將 反 應 物 再 攪 拌 10 分 鐘。添 加 水。將 有 機 相 以 飽 和 NaHCO_3 、 NaH_2PO_4 及 鹽 水 洗 滌， 然 後 在 真 空 中 濃 縮。將 殘 留 物 以 乙 脂 (0.5 升) 配 成 漿 液， 然 後 濃 縮， 獲 得 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄 氧 羰 基 胺 基)-2-酮 基 四 氢 吡 啙 -1-基)-5-(第 三 -丁 氧 羰 基 胺 基)環 己 烷 羥 酰 胺， 為 白 色 固 體 (75.9 克， ~100%)， 將 其 使 用 於 下 一 步 驟， 無 需 進 一 步 純 化。關 於 主 要 吸 收 峰 之 LC/MS : $[M\text{-Boc}+H]^+ = 375.3$; $[M+H]^+ = 475.4$; $[M\text{-tBu}+H]^+ = 419.3$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $d_4\text{-MeOH}$) : δ 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.25 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.9-2.05 (m, 2H), 1.65-1.9 (m, 4H), 1.46 (s, 9H).

實例 1，步驟 6：將 反 應 以 三 等 份 進 行， 並 合 併 供 水 溶 液 處 理。於 5 升 3 頸 圓 底 燒 瓶 中， 添 加 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(苄 氧 羰

基胺基)-2-酮基四氫吡咯-1-基)-5-(第三-丁氧羰基胺基)環己烷羧醯胺(25.3克，53毫莫耳)、乙腈(1.9升)及2.6升水/冰。將混合物攪拌，並冷卻至0°C。添加碘苯二醋酸鹽(25.77克，80毫莫耳)，且將反應物攪拌2小時；添加另外0.5當量之碘苯二醋酸鹽。將反應物攪拌9小時(反應溫度<10°C)。於混合物中，添加8當量N,N-二異丙基乙胺與2當量醋酸酐。於接下來之三十分鐘內，每十分鐘添加4當量N,N-二異丙基乙胺與2當量醋酸酐，直到反應已進行至完成(HPLC)為止。在真空中移除乙腈；自殘留物分離出一些固體，及將其藉過濾收集。以二氯甲烷(3升，接著1升)萃取其餘殘留物。相繼以水、飽和NaHCO₃及鹽水洗滌有機相。將所收集之固體，伴隨著活性碳(15克)，添加至有機相中。將混合物於40°C下攪拌30分鐘，然後過濾，及在真空中濃縮。使殘留物溶於EtOAc(1升)中，並將所形成之溶液在75°C下攪拌1小時，然後，使其冷卻至室溫。分離固體，及藉過濾收集。使此固體藉再結晶進一步純化：首先，使其溶於0.5升CH₂Cl₂中，然後在真空中濃縮，接著自1升EtOAc再結晶；將其重複三次。將得自上述母液之固體使用相同方法再結晶三次。使合併之固體自己腈(0.7升)再結晶兩次，以提供66克(84%)(1R,3R,4S)-3-乙醯胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基胺基)-2-酮基四氫吡咯-1-基)環己基胺基甲酸第三-丁酯(純度>99.5%，藉HPLC)。關於主要吸收峰之LC/MS： $[M+H]^+$ = 489.4； $[M-tBu+H]^+$ = 433.3。
¹H-NMR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7.3-7.4 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.6 (m, 2H), 2.44 (m, 1H),

2.12 (m, 1H), 1.87-2.05 (m, 4H), 1.87 (s, 3H), 1.55-1.7 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。Hofmann 重排之立體化學真實性係經過此化合物之 X- 射線晶體結構分析確認，如圖 1 中所示。

實例 1，步驟 7：於 (1R,3R,4S)-3-乙醯胺基-4-((S)-3-(芊氧羰基胺基)-2-酮基四氫吡咯-1-基)環己基胺基甲酸第三-丁酯 (66 克，0.135 莫耳) 在二氯甲烷 (216 毫升) 中之正在攪拌溶液內，添加三氟醋酸 (216 毫升)。將反應物於室溫下攪拌 2 小時，及在真空中濃縮。使殘留物溶於甲醇中，並在真空中濃縮所形成之溶液；將其重複一次。獲得 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-胺基環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸芊酯，為油狀物，並直接使用於下文步驟 8 中。LC/MS 實測值 $[M+H]^+ = 389.4$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH)： δ 7.3-7.4 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.41 (寬廣 s, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.00 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.81 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.65 (q, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.3-3.4 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 1.95-2.24 (m, 5H), 2.00 (s, 3H), 1.6-1.8 (m, 2H).

實例 1，步驟 8：於 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-胺基環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸芊酯 (~0.135 莫耳) 在甲醇 (675 毫升) 中之正在攪拌溶液內，相繼裝填丙酮 (37.8 克，4 當量)、醋酸鈉 (33.2 克，3 當量) 及氰基硼氫化鈉 (16.9 克，2 當量)。將混合物於室溫下攪拌 6 小時，及過濾。使濾液溶於二氯甲烷 (1 升) 中；以 1N NaOH (1 升) 洗滌此溶液。於 0°C 下，使在過濾中所收集之固體溶於 1N NaOH (1 升) 中，然後以二氯甲烷 (1 升) 萃取。合併有機萃液，且以 HCl 水溶液 (200 毫升 1N HCl + 800 毫升水) 萃取。以飽和 NaHCO_3 (500 毫升)，

接著以 1N NaOH (100 毫升) 使水相鹼化，直到 pH 11 為止。以二氯甲烷(2 升)萃取水相。合併有機萃液，脫水乾燥 (Na_2SO_4)，過濾，及在真空中濃縮，而得 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-(異丙基胺基)環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸苄酯，為油狀物。LC/MS 實測值 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 431.45$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH)： δ 7.3-7.4 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.24 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.61 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.52 (q, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.04 (寬廣 s, 1H), 2.96 (七重峰, $J = 6.3$ Hz, 1H), 2.40 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.7-1.9 (m, 5H), 1.65 (m, 1H), 1.12 (表觀 dd, $J = 6.3, 1.1$ Hz, 6H).

實例 1，步驟 9(參閱下文替代步驟 9)：使 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-(異丙基胺基)環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸苄酯 (~115 毫莫耳) 在二氯甲烷 (600 毫升) 中之正在攪拌溶液冷卻至 0°C，並相繼裝填甲醛 (18.6 克，37 重量% 溶液)、三乙胺 (23 毫升) 及三乙醯基硼氫化鈉 (28.7 克)。將混合物於室溫下攪拌 30 分鐘，且以二氯甲烷 (至高達 1.2 升) 稀釋。將此溶液以 500 毫升飽和 $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$ (飽和 NaHCO_3 ，pH 至 11 w/1N NaOH) 洗滌三次。以 HCl 水溶液 (200 毫升 1N HCl + 600 毫升水) 萃取有機層。以飽和 NaHCO_3 (500 毫升)，接著以 1N NaOH (100 毫升) 使水相鹼化，直到 pH 11 為止。以二氯甲烷 (1.2 升) 萃取水相。合併有機萃液，脫水乾燥 (Na_2SO_4)，過濾，及在真空中濃縮，而得 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-(異丙基(甲基)胺基)環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸苄酯，為油狀物，將其直接使用於下文步驟 10 中。LC/MS 實測值

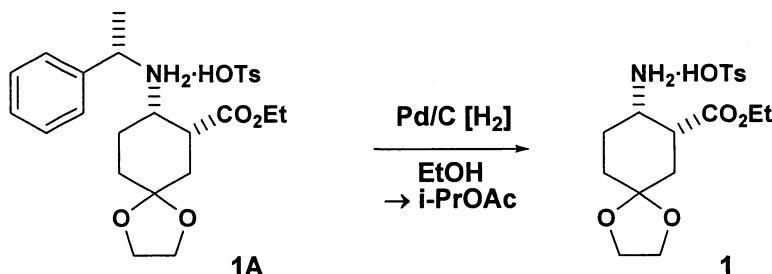
$[M+H]^+ = 445.4$. 1H -NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7.3-7.4 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.33 (br s, 1H), 4.25 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.11 (br s, 1H), 3.5-3.6 (m, 2H), 2.77 (v br s, 2H), 2.41 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.0-2.1 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.7-1.9 (m, 5H), 1.10 (表觀 dd, $J = 17, 6.4$ Hz, 6H).

實例 1，步驟 10：於 (S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-(異丙基(甲基)胺基)-環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基胺基甲酸苄酯 (~0.115 莫耳) 在甲醇 (600 毫升) 中之溶液內，添加 10% Pd/C (6 克 50% 潮濕觸媒)。將燒瓶抽氣，並以氫逆充填。將混合物於 1 大氣壓 H_2 下攪拌 2 小時，且藉由經過矽藻土過濾移除觸媒。使濾液在真空中濃縮，以提供 N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-酮基四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基(甲基)胺基)環己基)乙醯胺，為油狀物，將其帶至下一步驟，無需進一步純化。LC/MS 實測值 $[M+H]^+ = 311.47$. 1H -NMR (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 4.39 (br s, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.3-3.5 (m, 4H), 2.73 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.0-2.2 (m, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.6-1.75 (m, 4H), 1.07 (表觀 dd, $J = 21, 6.4$ Hz, 6H).

實例 1，步驟 11：於 N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-酮基四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基(甲基)胺基)環己基)乙醯胺 (~35 克，0.115 莫耳) 在異丙醇 (600 毫升) 中之溶液內，添加 4-氯基-6-(三氟甲基)喹唑啉 (32 克，0.138 莫耳，1.2 當量，參閱：P.H. Carter 等人，PCT 申請案 WO 2005/021500)。將混合物於室溫下攪拌過夜，然後添加三乙胺 (46 克，0.46 莫耳，4 當量)。將混合物在 60 °C 下攪拌 10 小時。於減壓下移除溶劑，而得油狀物。與異丙醇之共沸蒸餾係進行兩次。使殘留物溶於二氯甲烷 (600

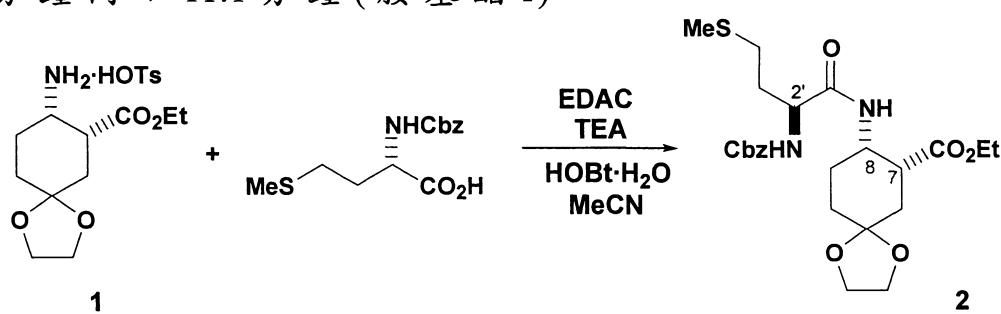
毫升)中，並以水(250毫升，含有4當量醋酸)萃取。將二氯甲烷(600毫升)添加至合併之含水洗液中，且使混合物冷卻至0°C。添加NaOH水溶液(50重量%)，並攪拌，直到pH值達到11為止。以二氯甲烷(2x600毫升)萃取兩次水層。使合併之有機萃液脫水乾燥(Na₂SO₄)，過濾，及在真空中濃縮，而得標題化合物之非晶質自由態鹼(99%純度，藉HPLC)。LC/MS實測值[M+H]⁺=507.3。¹H-NMR(400MHz, d₄-MeOH): δ 8.82(s, 1H), 8.59(s, 1H), 8.05(dd, J=8.8, 1.8Hz, 1H), 7.9(d, J=8.7Hz, 1H), 5.28(t, J=8.6Hz, 1H), 4.58(br s, 1H), 4.06(m, 1H), 3.52-3.68(m, 2H), 3.43(m, 1H), 2.76(br s, 1H), 2.55(m, 1H), 2.28(s, 3H), 2.1-2.3(m, 3H), 2.0(s, 3H), 2.0(m, 1H), 1.65-1.8(m, 3H), 1.09(表觀dd, J=24, 6.4Hz, 6H).

實例1，替代步驟9

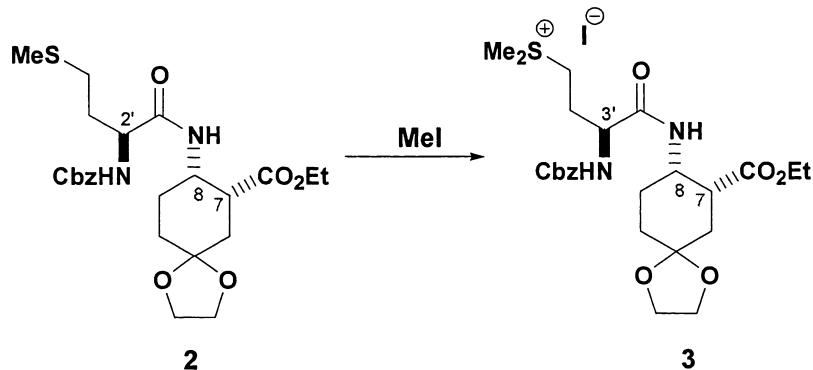


實例1，替代步驟9aⁱ：於氫化器中，添加(7R,8S)-8-((S)-1-苯基-乙胺基)-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4-甲苯磺酸鹽1A(1417克，2.8莫耳，參閱：WO2004098516，類似美國專利6,835,841製成)、乙醇(200標準純度，11.4升)及10%Pd/C觸媒(50%潮濕，284克)。將混合物以氮惰性化，然後，以氫氣(45psig)加壓，及在約40°C下激烈攪拌，直到起始物質被消耗為止(HPLC)。使此懸浮液冷卻，以氮氣滌氣，並趁惰性化時，藉過濾移除觸媒。將用過之觸媒以乙醇(4.3升)洗滌。合併

濾液與洗液，及在真空下濃縮至體積為2-3升，同時保持批料在40°C -60°C之間。添加醋酸異丙酯(5升)，並使混合物濃縮至體積為~2升，直到移除大部份乙醇(<0.5%)為止，且殘留水份含量為<1,000 ppm。將批料體積藉由添加醋酸異丙酯調整至~7.5升。將混合物加熱至80°C，直到透明為止，接著冷卻至65°C -70°C。添加1之種晶(5克)，及使批料冷卻至50°C，歷經2小時，然後再冷卻至20°C，歷經4小時，並保持~10小時。過濾所形成之漿液，且以醋酸異丙酯(2升)洗滌濾餅。使產物於真空及~35°C下乾燥，直到使揮發性物質減至低於~1% (LOD)為止。獲得(7R,8S)-8-胺基-1,4-二氧-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯4-甲苯磺酸鹽1，為白色結晶性固體(936克，83%產率；HPLC純度：99.8%)。¹H-NMR：(300 MHz, CDCl₃) 8.14-7.89 (brs, 3H), 7.75 (d, J 9.0 Hz, 2H), 7.15 (d, J 8.0 Hz, 2H), 4.22-4.04 (m, 2H), 4.01-3.77 (m, 4H), 3.55-3.43 (m, 1H), 3.20-3.13 (m, 1H), 2.40-2.27 (m, 4H), 2.21-1.94 (m, 2H), 1.81-1.51 (m, 3H), 1.23 (t, J 7.0 Hz, 3H)；HPLC：Waters Xterra MS C18 4.6毫米x 150毫米內徑，3.5微米粒子大小，0.05% NH₄OH (5% ACN, 95% H₂O, 溶劑A)，至0.05% NH₄OH (95% ACN, 5% H₂O, 溶劑B)，5% B至20% B，在10分鐘內，改變至95% B，在25分鐘內，然後改變至5% B，在1分鐘內；11.1分鐘(胺基酯1)。

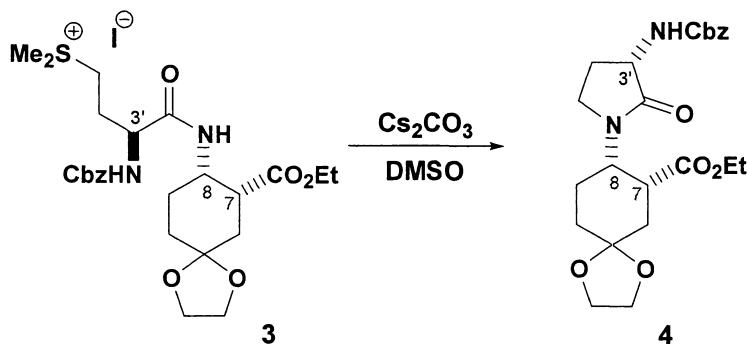


實例 1，替代步驟 9aⁱⁱ：將胺基酯 1 (63 克， 0.16M， 1 當量；已知化合物之還原性去除保護之產物 - (參閱例如 R. J. Cherney, WO 2004/098516 與 G. V. Delucca & S. S. Ko, WO 2004/110993) 放置在圓底燒瓶中，並添加 MeCN (500 毫升)。然後添加 EDAC (33.1 克， 0.17M， 1.1 當量)、 HOBr • H₂O (21.2 克， 0.16M， 1.0 當量) 及 N-Cbz-L-甲硫胺酸 (46.7 克， 0.17M， 1.05 當量)，接著為 TEA (48.0 毫升， 0.35M， 2.2 當量)。發現放熱至 38°C。將反應物質在室溫下留置攪拌。30 分鐘後，HPLC 顯示完全轉化，將反應物質以 EtOAc (2.5 升) 稀釋，且以 KHCO₃ (4 x 500 毫升，20 重量% 水溶液) 與鹽水 (500 毫升) 洗滌。分離有機相，以 MgSO₄ 脫水乾燥，及濃縮。使殘留物溶於 TBME 中，及再濃縮，而得 (7R,8S)-8-{(2S)-2-芐氧羰基氨基-4-甲硫基-丁醯氨基}-1,4-二氫-螺 [4.5]癸烷-7-羧酸乙酯 2，為黏性半固體 (76.2 克，98% 產率，93AP 純度)。¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.30 (m, 5H), 7.03 (d, J 9.0 Hz, 1H), 5.66 (d, J 8.0 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.35-4.25 (m, 2H), 4.19-4.04 (m, 2H), 3.98-3.86 (m, 4H), 2.87-2.80 (m, 1H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.18 (dd, J 14.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.05-1.67 (m, 6H), 1.26 (t, J 7.0 Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6 x 150 毫米，0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O) 至 0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10 分鐘梯度液。10.01 分鐘 (化合物 2, 93.1 AP). HRMS: m/z 495.2166 [計算值: C₂₄H₃₅N₂O₇S 495.2165].



實例 1，替代步驟 9b：使甲硫胺酸醯胺 2 (75.0 克，0.15M) 溶於 MeI (225 毫升，3 毫升/克) 中 - 發現一部份出氣但未放熱。將反應物質留置於黑暗中攪拌 16.5 小時。在此段時間後，已形成濃稠淡黃色沉澱物。然後，將燒瓶抽空至 200 毫米 Hg，並移除一部份 MeI。將殘留物質在 TBME (500 毫升) 中配成漿液，於 30 分鐘攪拌後，過濾漿液，以 TBME (500 毫升) 洗滌濾餅。此物質之 NMR 分析顯示少量 MeI 留下。將濾餅於 TBME (500 毫升) 中再配成漿液，過濾，以 TBME (500 毫升) 洗滌，及在真空下乾燥，而得碘化 [(3S)-3-苯氧羰基胺基-3-{(7R,8S)-7-乙氧羰基-1,4-二-氧-螺[4.5]癸-8-基胺甲醯基}-丙基]-二甲基銨 3，為自由流動性灰白色固體 (93.5 克，97%，99 面積 % 純度)。

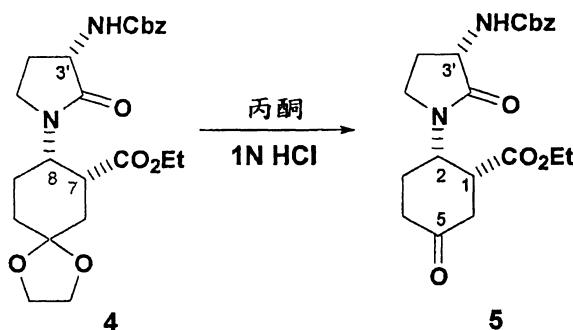
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J 9.0 Hz, 1H), 7.38-7.27 (m, 5H), 6.40 (d, J 7.0 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.76-4.65 (m, 1H), 4.48-4.39 (m, 1H), 4.14-3.85 (m, 6H), 3.84-7.73 (m, 1H), 3.68-3.55 (m, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.90-2.83 (s, 1H), 2.52-1.55 (m, 8H), 1.24 (t, J 7.0 Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6 x 150 毫米, 0.05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O) 至 0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), 0-100% 10 分鐘梯度液. 2.45 分鐘 (I-), 8.14 分鐘 (化合物 3, 43.6AP, I⁻ 54.6AP). HRMS: m/z 509.2341 [計算值: C₂₅H₃₇N₂O₇S 509.2321].



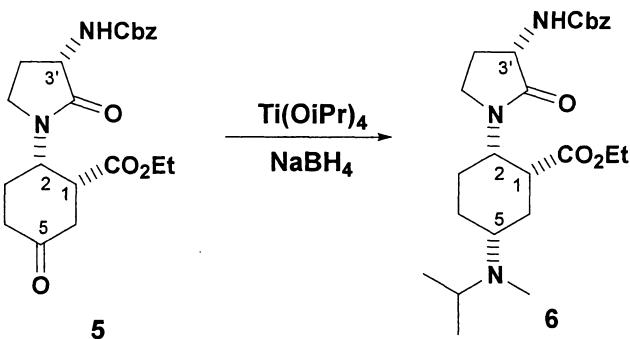
實例 1，替代步驟 9c：將 Cs_2CO_3 (61.5 克， 0.19M， 1.5 當量) 放置在圓底燒瓶中，並添加無水 DMSO (2.4 升)。然後分次添加锍鹽 3 (80.0 克， 0.13M， 1.0 當量)。一旦添加完成後，立即將反應物質留置於黑暗中攪拌 20 小時。接著，將反應物質分離成兩半，且每一半係個別處理：將反應物質以 EtOAc (2.0 升) 稀釋，並以鹽水 (2 升) 洗滌，以鹽水 (500 毫升) 洗滌有機相。然後，以 EtOAc (500 毫升) 洗滌合併之水層。接著，將合併之有機相以鹽水 (3×750 毫升) 洗滌。將反應物質之第二個一半以相同方式處理，並使合併之有機物質以 MgSO_4 脫水乾燥，及濃縮，而得 ($7R,8S$)-8-{($3S$)-3-苄基氨基-2-酮基-四氫吡咯-1-基}-1,4-二氫-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯 4，為淺色油 (56.5 克， 0.13M， ~100 面積-% 純度)，藉 NMR 分析為純的。

$^1\text{H-NMR}$ ：(300 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.30 (m, 5H), 5.37 (br d, J 4.0 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.27-4.18 (m, 1H), 4.17-3.82 (m, 8H), 3.32 (td, J 10.0 Hz, 60.0 Hz, 1H), 3.23 (q, J 5.0 Hz, 1H), 2.63-2.57 (m, 1H), 2.42-2.25 (m, 2H), 1.94-1.68 (m, 5H), 1.25 (t, J 7.0 Hz, 3H). HPLC：YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6×150 毫米，0.05% TFA (20% MeOH , 80% H_2O) 至 0.05% TFA (20% MeOH , 80% MeCN)，0-100% 10 分鐘梯度液。8.99 分鐘 (化合物 5, 於管柱上製成, 4.2AP), 9.48 (化合物 4, 74.3AP). HRMS：m/z

447.2127 [計算值： $C_{23}H_{31}N_2O_7$ 447.2131].

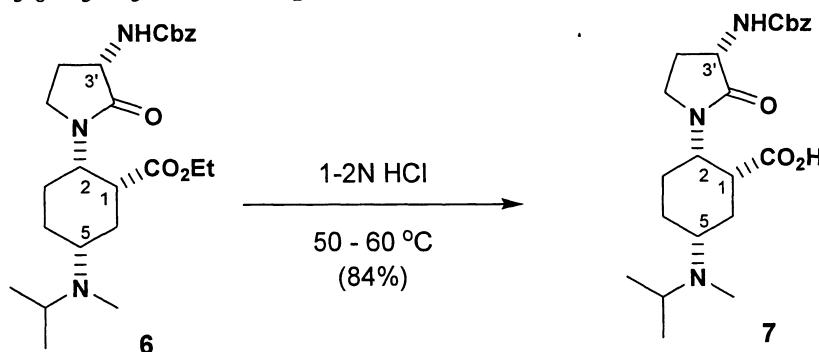


實例 1，替代步驟 9d：使四氫吡咯酮 4 (50.0 克，0.11M) 溶於丙酮 (500 毫升) 中，並添加 1N HCl (500 毫升)。然後，將反應物質加熱至 65°C。20 分鐘後，HPLC 顯示完成反應。使反應物質冷卻至室溫，且於迴轉式蒸發器上移除丙酮。於此蒸餾期間，產物自溶液沉澱，為白色固體。將其藉過濾單離，及以水洗滌濾餅。接著，使濾餅與甲苯 (3×300 毫升) 以共沸方式乾燥，而得 (1R,2S)-2-((3S)-3-苄基氨基-2-酮基-四氫吡咯-1-基)-5-酮基-環己烷羧酸乙酯 5，為白色固體 (39.8 克，88%，97 面積-% 純度)。 1H -NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.32 (m, 5H), 6.65 (br d, J 4.0 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.54-4.47 (m, 1H), 4.34-4.26 (m, 1H), 4.18 (dq, J 11.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 4.09 (dq, J 11.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 3.36-3.20 (m, 3H), 2.70-2.35 (m, 6H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.81 (五重峰, J 11.0 Hz, 1H), 1.24 (t, J 7.0 Hz, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6×150 毫米，0.05% TFA (20% MeOH, 80% H_2O) 至 0.05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN)，0-100% 10 分鐘梯度液。8.95 分鐘 (化合物 5)。HRMS: m/z 403.1864 [計算值： $C_{21}H_{27}N_2O_6$ 403.1869].



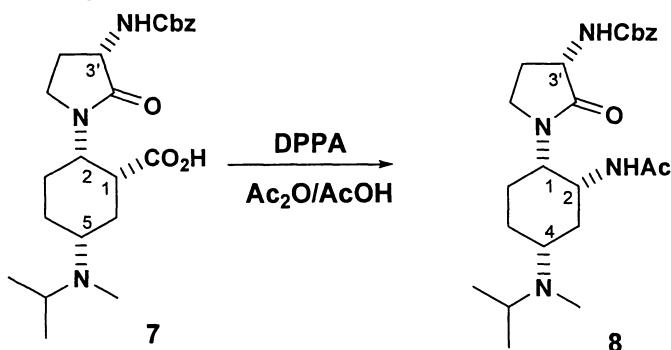
實例 1，替代步驟 9e：將環己酮 5 (22.5 克，0.06M，1 當量)、DMSO (30 毫升) 及 $\text{Ti}(\text{O}-\text{iPr})_4$ (33.7 毫升，0.11M，2.04 當量) 放置在圓底燒瓶中。然後，以一份添加 N-異丙基-N-甲胺 (11.6 毫升，0.11M，2.0 當量)。將混合物於室溫下留置攪拌 30 分鐘，然後在冰/水中冷卻至 $<3^\circ\text{C}$ 。然後，添加 MeOH (30 毫升)，接著分次添加 NaBH_4 (4.33 克，0.11M，2.04 當量)-溫度保持 $<8^\circ\text{C}$ 。在添加完成後 30 分鐘，將反應物質以二氯甲烷 (300 毫升)，然後以 NaOH (1N，40 毫升) 稀釋。使所形成之漿液經過矽藻土過濾，並以二氯甲烷 (100 毫升) 洗滌濾餅。在減壓下濃縮所形成之液體，且使殘留物溶於 EtOAc (500 毫升) 中。將此溶液以 1N HCl (2×400 毫升) 萃取，然後，使合併之水層以 Na_2CO_3 鹼化。以 EtOAc (4×250 毫升) 萃取，提供透明且無色有機相，使其以 Na_2SO_4 脫水乾燥，及濃縮，而得白色粉末 (24.6 克，96%，7:1 d.r.)。然後，將此物質在己烷 (670 毫升) 中配成漿液過夜。藉過濾單離固體，並於減壓下乾燥，而得 (1R,2S,5R)-2-((3S)-3-苄基氨基-2-酮基-四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基-甲基-氨基)-環己烷羧酸乙酯 6，為白色固體 (20.9 克，81%，24:1 d.r.)。 $^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.28 (m, 5H), 5.55 (d, J 4.5, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.42 (q, J 4.5, 1H), 4.23-4.12 (m, 1H), 4.08 (dq, J 10.5, 7.0, 1H), 4.02 (dq, J 10.5, 7.0, 1H), 3.84 (t, J 9.0,

1H), 3.46-3.36 (m, 1H), 3.04 (七重峰, J 6.5, 1H), 2.86-2.80 (m, 1H), 2.63-2.48 (m, 2H), 2.17 (s, 3H, Me), 2.10-1.63 (m, 7H), 1.22 (t, J 7.0, 3H), 1.00 (d, J 6.5, 3H), 0.97 (d, J 6.5, 3H). HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6 x 150 毫米, 0.01M NH₄OAc (MeOH: 水 20: 80) 至 0.01M NH₄OAc (MeOH: 水 : MeCN 20: 5: 75) 10 至 100% 15 分鐘梯度液. 8.23 (化合物 6), 8.88 (5-epi-化合物 6). HRMS: 460.2798 [計算值 : C₂₅H₃₈N₃O₅ 460.2811].



實例 1，替代步驟 9f: 使胺基酯 6 (9.76 克, 2.12 毫莫耳) 溶於 2N HCl (80 毫升) 中，然後，在惰性大氣下加熱至 ~55°C。將反應物攪拌 20 小時，接著冷卻至室溫。將反應溶液以甲苯(數份 25 毫升)洗滌兩次，藉由添加 KOH 丸粒中和至 pH 6-7，然後，以二氯甲烷(數份 100 毫升)萃取八次。使合併之萃液脫水乾燥 (Na₂SO₄)，過濾，及在減壓下濃縮至 50 毫升總體積。接著，在添液漏斗中，將濃溶液慢慢添加至甲基第三-丁基醚 (300 毫升) 中，歷經 15 分鐘，並激烈攪拌。將所形成之白色漿液於環境溫度下攪拌 1 小時，然後冷卻至 0°C，且攪拌 1 小時。過濾產物，及以甲基第三-丁基醚(數份 25 毫升)洗滌兩次。藉由與乙腈 (300 毫升) 共沸蒸餾，移除得自濕濾餅之水。使產物在減壓下乾燥，以提供 (1R,2S,5R)-2-((3S)-3-

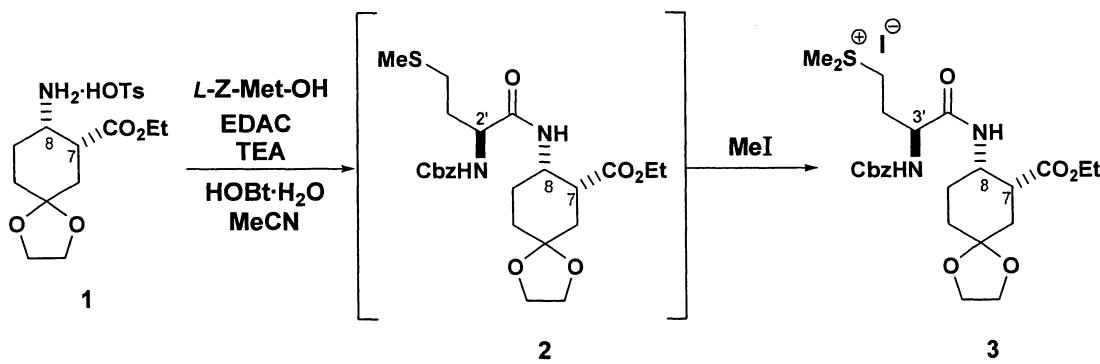
芳 氧 羥 基 胺 基 -2- 酮 基 - 四 氢 吡 咯 -1- 基)-5-(異丙基 - 甲 基 - 肽 基)- 環 己 烷 羧 酸 7 (7.69 克 , 84% 產 率) , 為 白 色 泡 沫 物 。 $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, 50°C, CDCl_3) δ 7.44-7.32 (m, 5H), 6.10 (寬 廣 s, 1H), 5.19 (表 觀 s, 2H), 4.42 (dd, $J = 15.6, 7.8$ Hz, 1H), 4.29-4.23 (m, 1H), 3.68-3.60 (m, 2H), 3.33-3.27 (m, 2H), 3.20 (寬 廣 s, 1H), 2.99 (寬 廣 s, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.49-2.45 (m, 3H), 2.33-2.31 (m, 1H), 2.00 (ddd, $J = 9.0, 8.6, 3.9$ 1H), 1.95-1.78 (m, 2H), 1.36-1.21 (m, 6H)。 LCMS : m/z 432.20 [計 算 值 : $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ 432.25]。



實例 1 , 替代步驟 9g: 於 N_2 下 , 使 肽 基 酸 7 (6.3 克 , 14.7 毫 莫耳 , 1.0 當量) 溶於 THF (80 毫升) 中 , 並 分 次 添加 NaH (584 毫克 , 14.7 毫莫耳 , 1.0 當量 , 在 磺 油 中 之 60 重 量 % 分 散 液) 。 當 添加 完 成 且 氣 體 釋 出 已 停 止 時 , 使 反 應 物 質 在 減 壓 下 濃 縮 , 並 使 所 形 成 之 固 體 與 甲 苯 (50 毫升) 共 沸 , 而 得 白 色 固 體 (KF 0.59 重 量 %) 。 將 此 固 體 於 N_2 下 , 在 甲 苯 (100 毫升) 中 配 成 漿 液 , 並 加 热 至 90°C 。 逐 滴 添加 DPPA (3.32 毫升 , 15.3 毫 莫耳 , 1.05 當量) , 歷 經 ~2 分 鐘 。 ~5 分 鐘 後 , 所 有 固 體 已 溶 解 , 10 分 鐘 後 , 發 現 白 色 固 體 之 沉 澱 。 30 分 鐘 後 , HPLC 分 析 顯 示 完 成 反 應 。 使 反 應 物 質 冷 却 至 室 溫 , 然 後 過 濾 , 以 甲 苯 洗 濾 餅 。 接 著 , 將 液 體 在 90°C 下 慢 慢 添 加 至 $\text{AcOH}/\text{Ac}_2\text{O}$

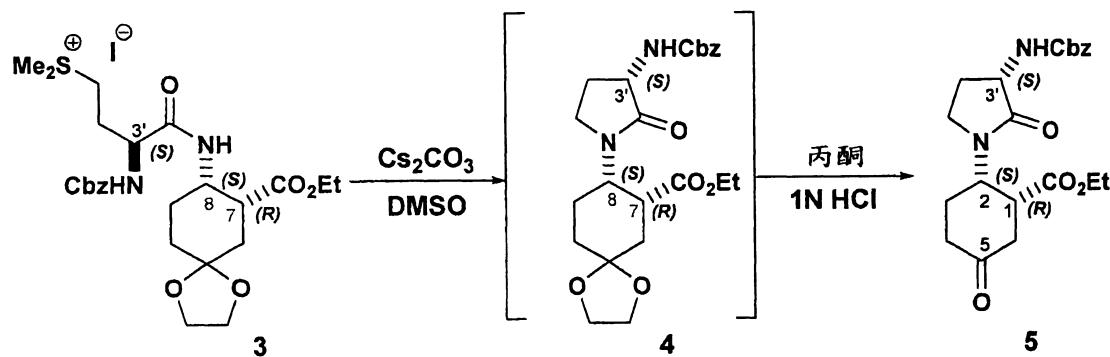
(80/20, 168 毫升)溶液中。45 分鐘後，HPLC 仍然顯示一些異氰酸酯。於 1.15 小時下，使反應物質冷卻至室溫，且以甲苯(100 毫升)與水(100 毫升)稀釋。移除有機層，及以 1N HCl(100 毫升)洗滌甲苯。然後，使合併之水相以 $K_2CO_3(s)$ 鹼化，並以 NaOH(10N)達到 pH 12，保持溫度低於 20°C。接著，以二氯甲烷(4 x 150 毫升)萃取水層，使合併之有機層以 K_2CO_3 脫水乾燥，及濃縮，而得(S)-1-((1S,2R,4R)-2-乙醯氨基-4-(異丙基(甲基)氨基)環己基)-2-酮基四氫吡咯-3-基氨基甲酸苄酯 8，為白色泡沫物(4.5 克，70%，94AP 純度)。 1H -NMR 係與得自上述途徑之物質相同(實例 1，步驟 9)。HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 微米 4.6 x 150 毫米，0.05% TFA(20% MeOH, 80% H_2O)至 0.05% TFA(20% MeOH, 80% MeCN)，0-100% 10 分鐘梯度液。7.20 分鐘(化合物 8)，7.85 分鐘(尿素二聚體)。HRMS: 445.2809 [計算值： $C_{24}H_{37}N_4O_4$ 445.2815]。

實例 1 之替代製備



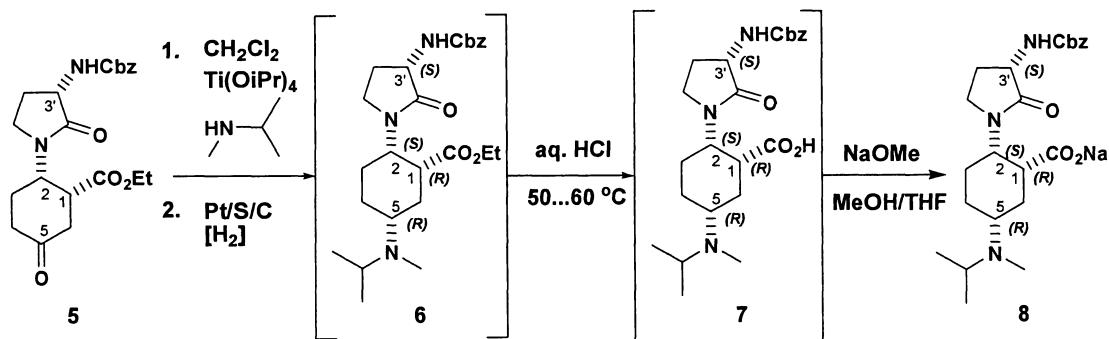
實例 1，替代製備，步驟 1：將(7R,8S)-8-氨基-1,4-二氫-螺[4.5]癸烷-7-羧酸乙酯 4-甲苯磺酸鹽 1(450.1 克)與 1-乙基-3-(3-二甲基-氨基-丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(236.3 克)、1-羥基苯并三唑水合物(171.9 克)、N-苄氧羰基-L-甲硫氨酸(333.4 克)及乙腈

(3.1 升) 合併。於此經攪拌混合物中，三乙胺(249.5 克)係在低於 30°C 下添加。於反應完成(HPLC)時，將混合物以醋酸乙酯(8.2 升)稀釋，並以 25% 碳酸氫鉀水溶液(2×4.5 升)，接著以水(4.5 升)洗滌。分離有機相，及在減壓下濃縮，獲得(7R,8S)-8-((S)-2-苄 氧 羰 基 胍 基 -4-甲 硫 基 -丁 鹽 基 胍 基)-1,4-二 氧 -螺 [4.5]癸 烷 -7-羧 酸 乙 酯 2 之溶液(1.4 升)。添加碘化甲烷(2.39 公斤)，使容器隔離光線，並使混合物在緩慢攪拌下保持約 24 小時。於濃稠黃色沉澱物中，添加甲基第三-丁基醚(2.7 升)，且使混合物保持約 1 小時。藉過濾單離產物，及將濾餅以甲基第三-丁基醚(2×1.4 升)洗滌，然後在真空下乾燥，產生碘化 [(S)-3-苄 氧 基 -羥 基 胍 基 -3-((7R,8S)-7-乙 氧 羰 基 -1,4-二 氧 -螺 [4.5]癸 -8-基 胍 甲 鹽 基)-丙 基]-二 甲 基 銨 3 (671.4 克，~94% 產率)，為灰白色固體(HPLC 純度 99.9%)。



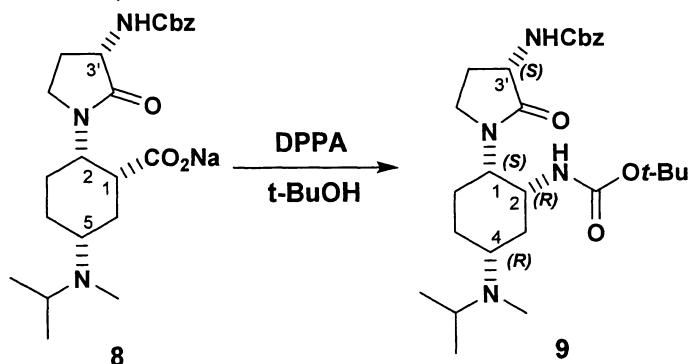
實例 1，替代製備，步驟 2：將銩鹽 3 (619.4 克)與碳酸銠(416.8 克)及無水二甲亞碸(6.2 升)在裝有洗氣器之反應器中合併，以中和揮發性硫化物。保持劇烈攪動，直到獲得完全轉化(HPLC)為止。添加醋酸乙酯(12.4 升)，接著為 20% 鹽水(3 升)。分離有機相，以鹽水(2×3 升)洗滌兩次，並蒸發，獲得(7R,8S)-8-((S)-3-苄 氧 羰 基 胍 基 -2-酮 基 -四 氢 吡 啶 -1-基)-1,4-

二 氧 - 螺 [4.5]癸 烷 -7- 羧 酸 乙 酯 4 在 醋 酸 乙 酯 中 之 溶 液 (~0.8 升)。添 加 丙 酮 (2.55 升)，接 著 為 0.5M 鹽 酸 水 溶 液 (2.3 升)。伴 隨 著 良 好 混 合，將 溶 液 加 热 至 50 到 60°C，直 到 完 成 4 轉 化 成 (1R,2S)-2-((S)-3-辛 氧 羰 基 胺 基 -2-酮 基 -四 氢 吡 問 -1-基)-5-酮 基 -環 己 烷 羧 酸 乙 酯 5 為 止 (HPLC)。在 低 於 40°C 時，使 混 合 物 在 減 壓 下 濃 縮，冷 却 至 ~30°C，及 添 加 水 (4.1 升)。使 所 形 成 之 浆 液 冷 却 至 5 到 10°C，並 攪 拌 ~1 小 時。過 濾 產 物，且 以 水 (2 x 2.5 升) 洗 滌 濾 餅。在 脫 液 時，使 濾 餅 在 真 空 烘 箱 中，低 於 40 °C 下 乾 燥 至 恒 重，獲 得 環 己 酮 5 (272 克，70% 產 率) (HPLC 純 度 98.7%)。



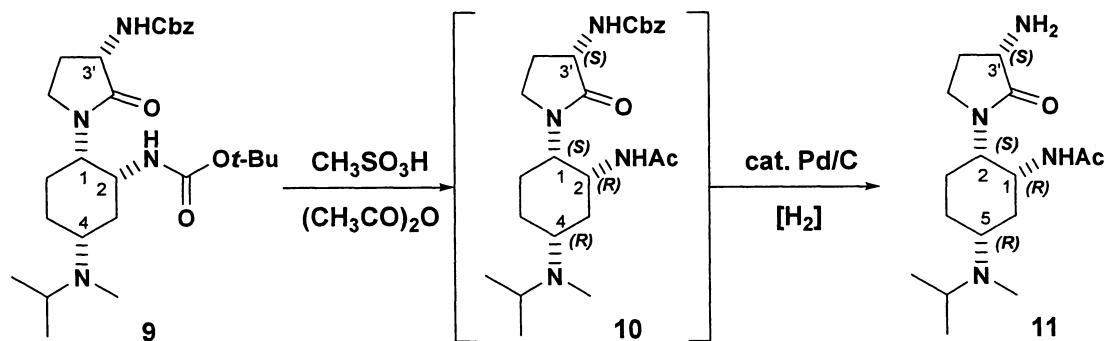
實 例 1，替 代 製 備，步 驟 3：使 環 己 酮 5 (206 克) 溶 於 二 氯 甲 烷 (1.1 升) 中，並 裝 填 至 氢 化 器 中。添 加 四 異 丙 氧 化 鈦 (218.2 克) 與 N-異 丙 基 N-甲 胺 (63.64 克)，且 將 混 合 物 於 環 境 溫 度 (23 至 25°C) 下 攪 拌 至 少 5 小 時。添 加 鉑 觸 媒 (5% Pt/S/C，15 克，約 7.5%，相 對 於 5)，並 於 ~30 psig 下 進 行 氢 化 作 用 至 少 6 小 時，產 生 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-辛 氧 羰 基 胺 基 -2-酮 基 -四 氢 吡 問 -1-基)-5-(異 丙 基 -甲 基 -胺 基)-環 己 烷 羧 酸 乙 酯 6 及 其 5-epi-異 構 物 (~7%) 之 混 合 物。藉 過 濾 移 除 觸 媒，並 使 濾 液 在 減 壓 下 濃 縮 至 約 ~600 毫 升。添 加 潮 濕 醋 酸 乙 酯 (~3% 水，2.0 升)，並 劇

烈攪動，歷經至少 1.5 小時期間。持續再攪拌至少 6 小時。過濾漿液。將濾餅以醋酸乙酯(1.0 升)洗滌，且拋棄。使合併之濾液與洗液濃縮至~400 毫升。添加甲苯(2.0 升)，及以 2M 鹽酸水溶液(2×400 毫升)洗滌溶液。使水層溫熱至 50° 到 60°C ，歷經約 20 小時，或 6 之水解作用係被視為完成(HPLC)。添加氫氧化鈉水溶液以調整至 pH~10，並以甲苯(3×600 毫升)萃取混合物。拋棄有機相，且藉由添加鹽酸水溶液將 pH 再調整至~6。使水相在減壓下濃縮至~600 毫升，及以二氯甲烷(至少 3×2.0 升)萃取。使合併之二氯甲烷層在減壓下蒸發，並連續以 THF 置換，獲得 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-芻基-2-酮基-四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基-甲基-胺基)-環己烷羧酸 7 (~148 克) 在 THF (~4 升) 中之溶液。添加 8 之種晶，接著為甲醇鈉(81.24 克)在甲醇中之 25% 溶液，在低於 25°C 下。使漿液再保持至少 16 小時，並攪拌。藉過濾單離產物，且以 THF (4×200 毫升)洗滌濾餅，及在真空中，低於 30°C 下乾燥至恒重。獲得乾燥之 (1R,2S,5R)-2-((S)-3-芻基-胺基-2-酮基-四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基-甲基-胺基)-環己烷-羧酸鈉鹽 8 (139 克，~60% 產率，得自 5)。



實例1，替代製備，步驟4：將胺基酯鈉鹽8(100克)、磷

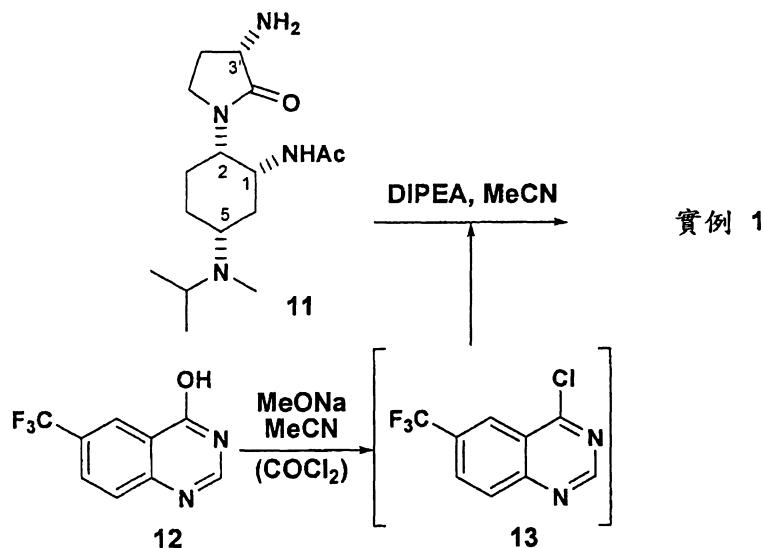
酸二苯酯(3.86克)、第三-BuOH(1275毫升)及甲苯(225毫升)合併，並在減壓下加熱至回流。收集約500毫升餾出物，並拋棄，同時連續以甲苯在第三-BuOH中之溶液置換。移除真空，並將餾出物轉換經過裝滿分子篩之管柱滲濾，及使其返回容器。於乾燥完成後，將DPPA(52.4毫升；已溶於60毫升甲苯中)在80°C下慢慢添加至漿液中。於完全轉化(HPLC)時，藉真空蒸餾移除第三-BuOH，並連續以甲苯置換。使混合物冷卻至室溫，並以10% K₂HPO₄水溶液(1 x 800毫升，1 x 400毫升)與水(400毫升)洗滌兩次。將有機相加熱，及在真空中濃縮至約270毫升。移除真空，並在約80°C下慢慢添加庚烷(1.1升)，接著為9之種晶(~1克)。使漿液慢慢冷卻至室溫，且將{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-第三-丁氧羰基氨基-4-(異丙基-甲基-氨基)-環-己基]-2-酮基-四氫吡咯-3-基}-氨基甲酸苄酯9藉過濾單離，為白色固體(86.76克，78%產率)。



實例 1，替代製備，步驟 5：使氨基甲酸第三-丁酯9(50克)溶於甲苯(500毫升)與i-PrOH(150毫升)中。然後，將所形成之溶液加熱至60°C。甲烷磺酸(19.6毫升)係在低於65°C下添加。於反應完成(HPLC)時，使混合物冷卻至室溫，且三乙胺(69.4毫升)係在低於25°C下慢慢添加。接著，在低於25°C

下添加醋酸酐。1小時後，醋酸(250毫升)係在低於25°C下添加。拋棄甲苯相，且將2-甲基-THF(500毫升)添加至水相中。將混合物激烈攪拌，及以NaOH(25%水溶液)鹼化至pH 12。拋棄水相，並將有機層以鹽水(250毫升)洗滌。在減壓下濃縮有機層，且連續以i-PrOH置換。使溶液冷卻，及過濾，以提供i-PrOH溶液中之{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-乙醯胺基-4-(異丙基-甲基-胺基)-環己基]-2-酮基-四氫吡咯-3-基}-胺基甲酸苄酯**10**，將其直接使用於氫化作用。

實例1，替代製備，步驟6：於含有乙醯胺**10**(~61克)在i-PrOH(~625毫升)中之溶液內，添加10% Pd/C潮濕觸媒(2.5克)，並使此懸浮液在30 psig及約25°C下氫化至少2小時。於完成(HPLC)時，藉過濾移除觸媒，及使濾液濃縮至約550毫升。添加水(8.8毫升)，接著為i-PrOH溶液中之5.6N鹽酸(69.5毫升)。使所形成之漿液在室溫下保持過夜。藉過濾單離產物，並將濾餅以i-PrOH(2 x 100毫升)沖洗，且於~50°C下，在真空中乾燥至恒重，而得N-[(1R,2S,5R)-2-((S)-3-胺基-2-酮基-四氫吡咯-1-基)-5-(異丙基-甲基-胺基)-環己基]-乙醯胺**11**(55.6克，97%產率)，為其鹽酸鹽(73.6%自由態鹼檢測，HPLC)。



實例 1，替代製備，步驟 7：於 MeCN (400 毫升) 中之 6-三氟甲基 - 喹唑啉 -4- 醇 12 (20.1 克) 內，添加 甲醇鈉 在 甲醇 中之 5.5M 溶液 (17.0 毫升)。使所形成之懸浮液在減壓下蒸餾，並連續以 MeCN 置換，以移除 甲醇。於漿液中添加 DMF (1.4 克)，接著為氯化草醯 (13.0 毫升)，在低於 50°C 下。於反應完成 (HPLC) 時，在減壓下移除過量試劑，而得 ~400 毫升漿液。使混合物冷卻至室溫，且以 10% K₂HPO₄ 水溶液 (1 x 1.0 升，1 x 0.5 升) 洗滌，而得約 450 毫升潮濕 MeCN 溶液中之 4-氯基 -6-三氟甲基 - 喹唑啉 13 (~21.2 克)，將其直接使用於後續偶合反應 (HPLC 純度 99.8%) 中。

實例 1，替代製備，步驟 8：於乙醯胺 11 (28.5 克，HCl 鹽，73.6% 自由態鹼檢測)、乙腈 (100 毫升)、N,N-二-異丙基-N-乙胺 (61 毫升) 之混合物中，在室溫下添加 13 (~21.2 克) 在 MeCN (~450 毫升) 中之溶液。使均勻混合物保持過夜。於反應完成 (HPLC) 時，使混合物在真空中濃縮至約 125 毫升。添加醋酸之 9.5% 水溶液 (240 毫升)，並以二氯甲烷萃取水相。分離水相，且添加甲基第三-丁基醚 (450 毫升)，接著為 2N 氢氧化鋰

水溶液，以調整至 pH > 11.5。分離有機層，以水洗滌，及過濾。將約一半之醚相以甲基第三-丁基醚(~250 毫升)稀釋，及在真空中濃縮。庚烷(45 毫升)係在低於 60°C 下慢慢添加，接著為實例 1 之種晶(0.4 克)。添加另外之庚烷(125 毫升)，並使混合物慢慢冷卻至室溫，且使所形成之漿液保持過夜。藉過濾單離產物，將濾餅以庚烷洗滌，及在真空中乾燥至恒重，而得 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)-噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺 14 (15.0 克，85% 產率)。

關於實例 1 之結晶化作用程序

實例 1，雙-BSA 鹽之製造及純化：使得自實例 1 步驟 11 之全部非晶質自由態鹼溶於甲醇(600 毫升)中。將所形成之溶液在 60°C 下加熱，並添加苯磺酸(2.5 當量)。使混合物冷卻至室溫，且藉過濾收集所形成之白色固體，而產生標題化合物之雙-苯磺酸鹽(95 克，86%)。此物質為 >99% 純，藉 HPLC。使此物質自 80/20 EtOH/H₂O 藉再結晶進一步純化，其係提供不含任何殘留甲醇之鹽。HPLC 純度 = 99.8%。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ ppm 8.75 (1H, s), 8.66 (1H, s), 8.25 (1H, d, J = 8.80 Hz), 7.90 (1H, d, J = 8.80 Hz), 7.75 (4H, d, J = 8.25 Hz), 7.43-7.57 (6H, m), 5.42 (1H, t), 4.33-4.44 (1H, m), 4.09-4.19 (1H, m), 3.83-3.91 (1H, m), 3.74-3.83 (2H, m), 3.61 (1H, t, J = 11.55 Hz), 2.75 (3H, d, J = 6.60 Hz), 2.61-2.70 (1H, m), 2.31-2.44 (1H, m), 2.20-2.27 (1H, m), 2.17 (2H, d, J = 12.10 Hz), 1.94-2.04 (1H, m, J = 12.65 Hz), 1.90-1.95 (3H, m), 1.72-1.91 (2H, m), 1.37 (3H, d, J = 6.05 Hz), 1.29 (3H, d, J = 6.60 Hz)。示差掃

描卡計法係使用 10°C / 分鐘之加熱速率，且顯現出熔解 / 分解吸熱峰，其中開始溫度為 297.6°C ，而尖峰溫度於 299.1°C 下。

實例 1，自由態鹼之結晶化作用：使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之非晶質自由態鹼之試樣(1克)溶於二氯甲烷(5毫升)中。於溶液中，添加庚烷(30毫升)，然後溫熱以蒸餾二氯甲烷。使溶液冷卻至 40°C ；白色固體沉澱。將此懸浮液加熱至 90°C ，並攪拌2小時。使此懸浮液冷卻至室溫，且過濾，以提供標題化合物之純自由態鹼。藉 $^1\text{H-NMR}$ 顯現無殘留溶劑。

實例 2

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之結晶型 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之各種結晶型，包括自由態鹼與鹽型式及其溶劑合物，係按上述製備與特徵鑑定。

關於特徵鑑定諸型式之程序

單晶數據

數據係在 Bruker-Nonius (BRUKER AXS 公司, 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA) CAD4 序列繞射計上收集。單位晶胞參數係經過 25 個高角度反射之實驗繞射計設定之最小平方分析獲得。強度係使用 Cu K α 放射 ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)，在恒溫下，以 θ - 2θ 可變掃描技術度量，且僅對 Lorentz-極化因數

校正。背景計數係在掃描極端處，對一半掃描時間收集。或者，單晶數據係於 Bruker-Nonius Kappa CCD 2000 系統上，使用 Cu K α 放射 ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) 收集。所度量強度數據之轉位與處理係以在收集程式套裝中之 HKL2000 包裝軟體 (Otwinsky, Z. & Minor, W. (1997) 巨分子結晶學, Carter, W. C. Jr & Sweet, R. M. 編著 (Academic, NY), 第 276 卷, 第 307-326 頁) 進行 (收集數據集與處理使用者界面：收集：數據集軟體, R. Hooft, Nonius B. V., 1998)。或者，單晶數據係於 Bruker-AXS APEX2 CCD 系統上，使用 Cu K α 放射 ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) 收集。所度量強度數據之轉位與處理，係以 APEX2 包裝軟體/程式套裝 (APEX2 數據收集與處理使用者界面：APEX2 使用者手冊, v1.27；BRUKER AXS 公司, 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711 USA) 進行。

當需要時，晶體係在數據收集期間，於 Oxford 低溫系統之冷流中冷卻 (Oxford Cryosystems Cryostream 冷卻器 : J. Cosier 與 A.M. Glazer, J. Appl. Cryst., 1986, 19, 105)。

結構係藉由直接方法解析，且以所發現之反射為基礎，使用以下之任一種精修，SDP (SDP，結構測定包裝，Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716。散射因數，包括 f 與 f' ，在 SDP 軟體中，係取自 "國際結晶學表"，Kynoch 出版社，Birmingham, England, 1974；第 IV 卷，表 2.2A 與 2.3.1) 包裝軟體，伴隨著少許局部修正，或結晶學包裝 MAXUS (maXus 解決與精修軟體套裝 : S. Mackay, C. J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus : 關於得自繞射數據或 SHELXTL⁴ 之晶體結構解決與精修之電腦程式。所導出之原子參數 (座標與溫度因

數)係經過全矩陣最小平方精修。於精修中被降至最少之函數為 $\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2$ 。R 係被定義為 $\Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$ ，而 $R_w = [\Sigma_w(|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma_w |F_o|^2]^{1/2}$ ，其中 w 為適當加權函數，以所發現強度之誤差為基礎。差異圖係在所有精修階段下檢驗。氫係在理想化位置上，以均向性溫度因數引進，但無氫參數被改變。

X-射線粉末繞射數據 (PXRD)

PXRD 數據係使用 Bruker C2 GADDS 獲得。放射為 Cu K α (40 KV, 50 mA)。試樣-偵測器距離為 15 公分。將粉末試樣放置在 1 毫米或較小直徑之密封玻璃毛細管中；將毛細管在數據收集期間旋轉。數據係對 $3 \leq 2\theta \leq 35^\circ$ 收集，其中試樣曝露時間為至少 2000 秒。將所形成之二次元繞射弧積分，以產生傳統 1-次元 PXRD 圖樣，具有步階大小為 0.02 度 2θ ，在 3 至 35 度 2θ 之範圍內。將約 200 毫克裝填至 Philips 粉末 X-射線繞射 (PXRD) 試樣保持器中。將試樣轉移至 Philips MPD 單元 (45 KV, 40 mA, Cu K α) 中。數據係在室溫下，於 2 至 32 2θ 範圍中收集(連續掃描模式，掃描速率 0.03 度/秒，自動發散與抗散射狹縫，接收狹縫：0.2 毫米，試樣轉子：ON)

示差掃描卡計法 (DSC)

DSC 實驗係在 TA InstrumentsTM Q1000 或 2920 型中進行。將試樣(約 2-6 毫克)於鋁淺盤中稱重，且精確地記錄至百分之一毫克，並轉移至 DSC。儀器係以氮氣於 50 毫升/分鐘下滌氣。於 10°C/分鐘加熱速率下，在室溫與 300°C 之間收集數據。圖形係以吸熱峰向下製成。

熱重分析 (TGA)

TGA 實驗係在 TA InstrumentsTM Q500 或 2950 型中進行。將試樣(約 10-30 毫克)置於預先稱量皮重之鉑淺盤中。試樣之重量係藉由儀器精確地度量，並記錄至千分之一毫克。將爐子以氮氣在 100 毫升/分鐘下滌氣。於 10°C / 分鐘加熱速率下，在室溫與 300°C 之間收集數據。

型式之製備與分析

關於此等實例之單位晶胞數據及其他性質，係呈現於表 1 中。單位晶胞參數係得自單晶 X-射線結晶學分析。單位晶胞之詳細說明可參閱 Stout & Jensen, *X-射線結構測定：實用指引* (MacMillian, 1968) 之第 3 章。

關於實例 2a、b、c、d、e、f、g 及 h 之部份原子座標，係個別呈現於表 2、3、4、5、6、7、8 及 9 中。

此外，關於實例 2a、b、d、e、f、g 及 h 之特性粉末 X-射線繞射吸收峰位置(度 $2\theta \pm 0.1$)@RT，係呈現於表 10 中。其全部均以高品質圖樣為基礎，以繞射計(Cu K α)收集，使用旋轉毛細管，其中 2θ 係以 NIST 其他適當標準作校準。

最後，圖 1、2、3、4、5、6 及 7 係個別呈現實例 2a、b、d、e、f、g 及 h 之 XRPD 圖樣。圖 8 與 9 個別揭示實例 2a 之 DSC 與 TGA 分析，而圖 10、11 及 12 係個別揭示實例 2f 之 DSC、TGA 及水份吸著等溫線光譜。

型式製備、XRD、DSC 及 TGA 特徵鑒定

實例 2a，N-1 型式，二苯磺酸鹽：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺二-苯

磺酸鹽自醋酸乙酯、乙醇、甲醇及丙酮結晶。型式 N-1 二苯磺酸鹽為 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺二-苯磺酸鹽之不含溶劑(無水或溶劑之分子)型式。型式 N-1 二苯磺酸鹽之特徵為 XRD 圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。型式 N-1 二苯磺酸鹽之特徵為 DSC 热解曲線，具有熔解/分解吸熱峰，其中開始典型上係在約 296 °C 下。型式 N-1 二苯磺酸鹽之特徵為 TGA 热曲線，在達到約 280°C 下，具有可忽略之重量損失(與未經溶劑化合之型式一致)。

實例 2b，DC-1 型式：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(約 0.5 克)之油狀似凝膠(非晶質)自由態鹼之試樣，自 BSA 鹽之試樣萃取後，溶於二氯甲烷(約 3 毫升)中。於此溶液中，添加約 5 毫升庚烷，並將所形成之油狀混合物在開口燒杯中，於 20-25°C 下，藉由磁攪拌棒激烈攪拌。於蒸發溶劑後，獲得白色固體。使固體再懸浮於約 5 毫升庚烷與 0.2 毫升二氯甲烷之混合物中，並於 25°C 下攪拌 7 天。過濾所形成之漿液，且風乾，以提供 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 DC-1。型式 DC-1 之特徵為每莫耳 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態

鹼，一莫耳二氯甲烷。型式 DC-1 之特徵為 XRD 圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。

實例 2c，THOO-1 型式：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，1 毫克，溶於 80 微升 THF 中。將溶劑藉由 Speed-vac (SpeedVac Plus, SC250DDA, Savant/ 热電子公司) 在高真空及 22°C 下移除，歷經 16 小時。將總共 100 微升 MIBK/ 庚烷 (1/2 體積比) 添加至此井中。於環境溫度 (20-25°C) 下保持 2 週後，在此井中發現結晶。型式 THOO 之特徵為每一莫耳 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，一莫耳 THF。

實例 2d，E-1 型式：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，自己醇與庚烷之溶液結晶。型式 E-1 之特徵為每一莫耳 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，一莫耳乙醇。型式 E-1 之特徵為 XRD 圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。

實例 2e，A-1 型式：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，於濃度超過 150 毫克 / 毫升下懸浮丙酮中。使此懸浮液

於室溫下達成平衡，以提供稍微稀懸浮液。過濾一部份此懸浮液，並將濾液與此懸浮液兩者於5°C下冷凍，以提供單丙酮溶劑合物之結晶(A-1)。型式A-1之特徵為每一莫耳N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，一莫耳丙酮。型式A-1自由態鹼之特徵為XRD圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。

實例2f，N-2型式：

使已萃取自BSA鹽試樣之N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之油狀似凝膠(非晶質)自由態鹼試樣(約0.5克)，懸浮於庚烷(約5毫升)中。將燒瓶以金屬刮勺刮搖，並將此懸浮液於25°C下藉由磁攪拌棒激烈攪拌。於攪拌24小時後，獲得結晶性粒子之白色漿液。過濾漿液，且使濕濾餅在真空中乾燥(40°C)，以提供自由態鹼之純N-2型式(藉PXRD確認)。型式N-2之特徵為XRD圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。型式N-2為N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之不含溶劑(無溶劑合物分子，或無水或溶劑之分子)型式。型式N-2之特徵為DSC熱解曲線，具有熔解吸熱峰開始典型上在約158°C至約162°C下。型式N-2之特徵為TGA熱曲線，在達到約145°C下，具有可忽略之重量損失，其係與單晶結構數據一致。重量損失係相應於偶發之溶劑。水份吸著等溫線之特徵為

在約 25% 至 約 75% RH 之範圍內，於 25°C 下，0.15% 重量增加，這表示 N-2 型式為輕微吸濕性(吾人將陳述為極輕微或非吸濕性)。

實例 2g，型式 AN-3：

將 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼之懸浮液，於~200 毫克/毫升下，在乙腈中製成，並使其在室溫下達成平衡，以提供稍微稀懸浮液。過濾一部份此懸浮液，且使濾液與此懸浮液兩者在 5°C 下冷凍，以提供乙腈溶劑合物之結晶(AN-3)。型式 AN-3 之特徵為每一莫耳 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺自由態鹼，一莫耳乙腈。型式 AN-3 之特徵為 XRD 圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。

實例 2h，型式 H4-1, HCl：

使 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺之自由態鹼之試樣(約 0.2 克)溶於乙醇(約 1 毫升)中。於自由態鹼溶液中，添加約 310 微升在乙醇中之 HCl 溶液(約 1.25M 濃度)。將此溶液以少量 HCl 鹽之結晶漿液接種。於所形成之混濁溶液中添加 3 毫升庚烷。白色漿液係逐漸發展，歷經 1-2 小時，同時在 20-25°C 下攪拌。將漿液於 20°C 下再攪拌 12 小時，過濾，及以庚烷洗滌。使濕濾餅在真空中乾燥(40°C)，以提供 HCl 鹽四水合物，型式 H4-1, HCl。型式 H4-1, HCl 之特

徵為每莫耳 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺鹽酸鹽，具有4莫耳水。型式H4-1, HCl鹽四水合物之特徵為SRD圖樣，其係符合自單晶結構數據所產生之模擬圖樣。

表 1
單位晶胞參數

化合物	鹽	型式	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	V(Å ³)
實例2a	二-BSA	N-1	RT	15.1737(8)	7.6544(4)	16.7722(9)	90	93.758(2)	90	1943.8(2)
實例2b	鹼	DC-1	RT	8.7496(5)	10.729(2)	31.029(3)	90	90	90	2912.8(6)
實例2c	鹼	THOO-1	-50	8.7909(6)	11.1527(5)	30.862(2)	90	90	90	3025.8(3)
實例2d	鹼	E-1	RT	8.2050(5)	11.2186(5)	32.041(2)	90	90	90	2949.3(3)
實例2e	鹼	A-1	RT	8.8773(7)	10.5735(8)	31.319(2)	90	90	90	2939.8(4)
實例2f	鹼	N-2	RT	11.8427(3)	18.1503(7)	12.7923(4)	90	105.362(2)	90	2651.4(2)
實例2g	鹼	AN-3	RT	7.5341(9)	13.514(2)	14.342(2)	90	91.671(8)	90	1459.6(4)
實例2h	HCl	H4-1	RT	11.8391(2)	11.8391(2)	78.158(2)	90	90	90	9487.2(4)

表 1 (續)
單位晶胞參數

化 合 物	Z'	Vm	sg	dcalc
實例 2a	1	972	P2 ₁	1.406
實例 2b	1	728	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.349
實例 2c	1	756	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.340
實例 2d	1	737	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.245
實例 2e	1	735	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1.276
實例 2f	2	663	P2 ₁	1.269
實例 2g	1	730	P2 ₁	1.246
實例 2h	1	791	P6 ₁ 22	1.292

於表 1 中使用之變數係定義於下文：

T = 關於結晶學數據之溫度，以攝氏表示(RT為室溫，其係為約+22°C)

V = 單位晶胞之體積

Z' = 每不對稱單位之藥物分子數目

$V_m = V$ (單位晶胞) / (每晶胞之 Z 藥物分子)

sg = 空間群

d_{calc} = 經計算之晶體密度

表 2
關於實例 2a 型式 N-1, 二苯磺酸鹽之原子座標

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
S1	0.4296	0.3405	0.1278	H57	0.5146	0.6132	0.0473
O2	0.3848	0.2640	0.1944	H58	0.4218	0.5168	0.2790
O3	0.5075	0.2480	0.1097	H59	0.5591	0.9137	0.0886
O4	0.3692	0.3687	0.0581	H60	0.5305	1.0179	0.2235
C5	0.4631	0.5514	0.1598	H61	0.4602	0.8229	0.3179
C6	0.5031	0.6610	0.1068	H62	-0.0921	0.0872	0.5134
C7	0.4500	0.6066	0.2360	H63	-0.0975	0.3507	0.7393
C8	0.5279	0.8279	0.1298	H64	-0.2621	0.3609	0.7274
C9	0.5113	0.8867	0.2054	H65	-0.2589	0.0940	0.5014
C10	0.4744	0.7756	0.2590	H66	-0.3412	0.2321	0.6040
S11	0.0304	0.2103	0.6431	H67	0.2813	0.2966	0.2330
O12	0.0580	0.0675	0.5918	H68	0.3163	0.2103	-0.0149
O13	0.0507	0.1758	0.7265	H69	0.0931	0.1273	0.5084
O14	0.0615	0.3788	0.6162	H70	0.0812	0.1334	-0.0296
C15	-0.0863	0.2166	0.6296	H71	0.2494	0.4855	-0.0720
C16	-0.1295	0.1458	0.5613	H72	0.2837	0.3700	-0.1556
C17	-0.1335	0.2944	0.6877	H73	0.3692	0.2507	0.3208
C18	-0.2249	0.3021	0.6795	H74	0.1718	0.1588	-0.1410
C19	-0.2234	0.1541	0.5537	H75	0.1760	0.5937	0.0122
C20	-0.2690	0.2305	0.6124	H76	0.0713	0.5818	0.0518
N21	0.1351	0.3402	0.0394	H77	0.2388	0.1059	0.5751
N22	0.2122	0.3075	0.2421	H78	0.0144	0.2704	-0.1359
N23	0.2612	0.1387	-0.0417	H79	-0.0107	0.3948	-0.0519
N24	0.0979	0.2591	0.3211	H80	0.0877	0.3884	0.1993
O25	0.1429	0.0840	0.1114	H81	0.1400	0.4103	-0.2251
N26	0.1222	0.1701	0.4545	H82	0.1443	0.8789	-0.2785
O27	0.2029	-0.1265	-0.0688	H83	0.1063	0.6705	-0.3097
N28	0.1897	0.6703	-0.2034	H84	0.0611	0.7736	-0.2276

原 子	X	Y	Z	原 子	X	Y	Z
C29	0.1114	0.2601	-0.0390	H85	0.3994	0.1229	0.5687
C30	0.2281	0.4006	-0.1212	H86	0.0212	0.5681	-0.1742
C31	0.3926	0.1870	0.4435	H87	0.0851	0.6247	-0.0863
C32	0.2482	0.2192	0.3790	H88	-0.0003	0.2113	0.3972
C33	0.1850	0.2609	0.3119	H89	0.2528	0.5466	0.1402
C34	0.3395	0.2220	0.3762	H90	0.1580	0.6514	0.1725
C35	0.1915	0.2339	-0.0878	H91	0.3253	0.5947	-0.1972
C36	0.2131	0.1749	0.4516	H92	0.3197	-0.2538	0.0275
C37	0.1374	0.5280	0.0550	H93	0.3937	-0.0865	0.0040
C38	0.1447	0.2421	0.1065	H94	0.3249	-0.0591	0.0839
C39	0.2678	0.1409	0.5195	H95	0.3767	0.8481	-0.2754
C40	0.0410	0.3593	-0.0898	H96	0.2667	0.9209	-0.2913
C41	0.2593	-0.0327	-0.0318	H97	0.3183	0.9202	-0.1940
C42	0.1523	0.3701	0.1769	H98	0.3388	0.5477	-0.3381
C43	0.1572	0.4920	-0.1737	H99	0.2541	0.4208	-0.3000
C44	0.1203	0.7566	-0.2584	H100	0.2273	0.6084	-0.3576
C45	0.3559	0.1483	0.5161	H101	0.2047	0.7544	-0.1523
C46	0.0730	0.5239	-0.1311				
C47	0.0706	0.2135	0.3909				
C48	0.1814	0.5399	0.1402				
C49	0.2788	0.6660	-0.2381				
C50	0.4909	0.1922	0.4387				
C51	0.3294	-0.1139	0.0239				
F52	0.5219	0.0514	0.4093				
F53	0.5340	0.2113	0.5073				
F54	0.5176	0.3178	0.3953				
C55	0.3112	0.8512	-0.2507				
C56	0.2765	0.5513	-0.3130				

表 3
關於實例 2b，型式 DC-1 之原子座標

原 子	X	Y	Z	原 子	X	Y	Z
O1	0.3874	0.5713	0.1042	H41	-0.1294	0.3465	0.2606
N2	0.6277	0.6481	0.1041	H42	-0.2461	0.1574	0.1324
C3	0.3731	0.6931	0.1987	H43	-0.1481	0.1749	0.0586
O4	0.3088	0.7902	0.1889	H44	0.1951	0.4379	0.0994
N5	0.5234	0.6709	0.1945	H45	0.2635	0.5336	0.1473

200823203

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C6	0.0370	0.3707	0.1487	H46	0.4541	0.5194	0.2668
N7	0.9171	0.7535	0.0862	H47	0.4188	0.4033	0.2278
C8	0.5884	0.7673	0.1246	H48	0.5887	0.4873	0.1799
N9	0.2197	0.5147	0.1799	H49	0.6714	0.5483	0.2272
C10	0.6819	0.8733	0.1041	H50	0.5969	0.8538	0.1868
C11	0.0994	0.4380	0.1852	H51	0.8120	0.7421	0.2149
C12	0.5232	0.5593	0.0958	H52	0.8245	0.6564	0.1665
C13	0.0339	0.3042	0.0748	H53	0.4689	0.7873	0.1195
C14	0.0966	0.3752	0.1068	H54	0.7443	0.6307	0.0952
N15	0.0413	0.4260	0.2242	H55	0.6606	0.8737	0.0699
C16	-0.0879	0.2935	0.1577	H56	0.6450	0.9598	0.1181
N17	-0.1495	0.2843	0.1988	H57	0.9128	0.9427	0.1024
C18	0.6213	0.7635	0.1729	H58	0.9994	0.8349	0.1664
C19	0.2969	0.5749	0.2162	H59	0.8434	0.9363	0.1746
C20	0.8547	0.8596	0.1114	H60	1.1241	0.6556	0.0774
C21	-0.0807	0.3504	0.2284	H61	1.1465	0.8155	0.0889
C22	0.8829	0.8492	0.1601	H62	1.0949	0.7111	0.1303
C23	0.0961	0.3041	0.0303	H63	0.9541	0.8697	-0.0162
C24	0.7904	0.7443	0.1815	H64	0.9409	0.9581	0.0316
C25	-0.1519	0.2227	0.1243	H65	1.0997	0.8600	0.0230
C26	0.5854	0.4415	0.0762	H66	0.9136	0.6679	-0.0189
C27	0.4325	0.5005	0.2333	H67	1.0529	0.6293	0.0199
F28	0.2100	0.3820	0.0251	H68	0.8640	0.5745	0.0257
C29	0.5694	0.5442	0.2072	H69	0.7752	0.7851	0.0338
C30	0.8956	0.7650	0.0399	H70	0.7087	0.4513	0.0715
F31	-0.0040	0.3354	0.0005	H71	0.5635	0.3648	0.0972
C32	-0.0935	0.2269	0.0831	H72	0.5326	0.4265	0.0453
F33	0.1425	0.1946	0.0181	H73	0.2091	0.6032	0.2400
C34	1.0774	0.7297	0.0973	H75	-0.7132	-0.0216	0.1657
C35	0.9360	0.6480	0.0149				
C36	0.9736	0.8757	0.0185				
CL37	-0.6723	0.0636	0.0976				
CL38	-0.6200	0.1776	0.1776				
C39	-0.7292	0.0689	0.1511				
CL40	-0.8261	0.1021	0.1984				
CL41	-0.5719	0.1649	0.1533				

表 4
關於實例 2c，型式 THOO-1 之原子座標

原 子	X	Y	Z	原 子	X	Y	Z
N1	0.6241	0.6511	0.1036	H44	0.8469	0.6491	-0.0084
N2	0.5165	0.6586	0.1938	H45	1.0426	0.6769	-0.0009
N3	0.0409	0.4138	0.2209	H46	0.9420	0.5884	0.0369
N4	0.9119	0.7577	0.0893	H47	0.9710	0.8879	-0.0108
N5	0.2188	0.5080	0.1767	H48	0.9644	0.9636	0.0393
N6	-0.1428	0.2821	0.1910	H49	1.1113	0.8600	0.0288
F7	0.2088	0.4068	0.0184	H50	1.1138	0.6612	0.0823
F8	0.1464	0.2269	0.0085	H51	1.1368	0.8124	0.0977
F9	-0.0051	0.3616	-0.0061	H52	1.0715	0.7062	0.1357
O10	0.3873	0.5694	0.1019	H53	0.8967	0.9395	0.1069
O11	0.2971	0.7711	0.1928	H54	0.8364	0.9249	0.1799
C12	-0.0831	0.2960	0.1506	H55	0.9892	0.8264	0.1696
C13	0.0371	0.3738	0.1430	H56	0.6557	0.8698	0.0727
C14	0.5812	0.7621	0.1256	H57	0.6337	0.9476	0.1221
C15	0.0986	0.4345	0.1815	H58	0.7936	0.7360	0.2193
C16	-0.0886	0.2415	0.0746	H59	0.8150	0.6527	0.1711
C17	0.6739	0.8655	0.1071	H60	0.5860	0.8385	0.1901
C18	0.0331	0.3225	0.0673	H61	0.4619	0.7796	0.1196
C19	0.6111	0.7539	0.1748	H62	0.7430	0.6376	0.0952
C20	0.7789	0.7380	0.1846	H63	0.5034	0.3895	0.0665
C21	0.0953	0.3862	0.1014	H64	0.6466	0.4797	0.0433
C22	-0.1446	0.2303	0.1158	H65	0.6742	0.4155	0.0950
C23	0.8438	0.8556	0.1148	H66	0.5931	0.4838	0.1746
C24	0.3673	0.6754	0.2001	H67	0.6760	0.5373	0.2229
C25	-0.0810	0.3420	0.2233	H68	0.4199	0.3911	0.2235
C26	0.8681	0.8418	0.1645	H69	0.4543	0.4982	0.2644
C27	0.5709	0.5348	0.2038	H70	0.2110	0.5756	0.2404
C28	0.8975	0.7762	0.0422	H71	0.2578	0.5312	0.1447
C29	0.2923	0.5573	0.2150	H72	-0.1392	0.3344	0.2555
C30	0.4345	0.4867	0.2295	H73	0.1922	0.4468	0.0960
C31	0.0958	0.3306	0.0236	H74	-0.2394	0.1689	0.1216
C32	0.9346	0.6664	0.0161	H75	-0.1341	0.1904	0.0479
C33	0.9942	0.8828	0.0245	H76	0.7798	0.8064	0.0354
C34	1.0667	0.7324	0.1019	H77	-0.5859	0.2979	0.1468
C35	0.5239	0.5633	0.0937	H78	-0.6934	0.1865	0.0883

原 子	X	Y	Z	原 子	X	Y	Z
C36	0.5916	0.4548	0.0733	H79	-0.5532	0.0802	0.1023
O37	-0.4684	0.1388	0.1701	H80	-0.7442	-0.0491	0.1228
O38	-0.4289	0.2122	0.2075	H81	-0.8828	0.0626	0.1139
O39	-0.7214	0.1782	0.1852	H82	-0.7168	0.0010	0.1956
C40	-0.6079	0.2004	0.1513	H83	-0.8983	0.0662	0.1893
C41	-0.7805	0.0664	0.1760	H84	-0.3123	0.2450	0.2037
C42	-0.6561	0.1265	0.1151				
C43	-0.7758	0.0381	0.1281				

表 5
關於實例 2d，型式 E-1 之原子座標

原 子	X	Y	Z	原 子	X	Y	Z
N1	0.5556	0.6575	0.1971	H40	0.2903	0.5250	0.1486
N2	0.9580	0.7945	0.0952	H41	0.7902	0.6695	0.0980
N3	0.0504	0.4000	0.2167	H42	0.6121	0.8376	0.1960
N4	0.2466	0.4969	0.1788	H43	0.4802	0.7853	0.1289
N5	0.6640	0.6706	0.1083	H44	-0.1345	0.3091	0.2471
O6	0.4235	0.5727	0.1071	H45	0.2219	0.4518	0.0971
O7	0.3141	0.7585	0.2020	H46	0.8518	0.7434	0.2205
C8	0.0563	0.3683	0.1425	H47	0.8769	0.6703	0.1722
C9	0.3945	0.6665	0.2051	H48	-0.2356	0.1657	0.1154
N10	-0.1464	0.2693	0.1855	H49	0.2468	0.5491	0.2421
C11	0.1179	0.4244	0.1805	H50	-0.1137	0.1969	0.0471
C12	-0.0757	0.2900	0.1475	H51	0.9339	0.9678	0.1186
C13	0.5699	0.5796	0.0976	H52	0.6715	0.8931	0.0836
C14	0.6460	0.7574	0.1795	H53	0.6450	0.9623	0.1326
C15	0.6096	0.7741	0.1332	H54	0.5054	0.4773	0.2603
C16	-0.0804	0.3256	0.2169	H55	0.4724	0.3825	0.2172
C17	0.1256	0.3867	0.1021	H56	0.8706	0.9373	0.1867
C18	0.8278	0.7497	0.1874	H57	1.0434	0.8510	0.1741
C19	-0.1350	0.2278	0.1118	H58	0.6429	0.4941	0.1737
C20	0.3307	0.5423	0.2161	H59	0.7309	0.5392	0.2214
C21	-0.0669	0.2438	0.0739	H60	0.5606	0.4154	0.0654
C22	0.8827	0.8818	0.1241	H61	0.6932	0.5215	0.0431
C23	0.6945	0.8866	0.1168	H62	0.7497	0.4462	0.0892
C24	0.4824	0.4737	0.2271	H63	1.1678	0.6903	0.0868
C25	0.0642	0.3239	0.0689	H64	1.2002	0.8299	0.1107

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C26	0.9139	0.8598	0.1701	H65	1.1111	0.7125	0.1393
C27	0.6193	0.5376	0.2034	H66	0.8527	0.8919	0.0459
C28	0.1332	0.3426	0.0264	H67	0.9828	0.7726	-0.0103
C29	0.6490	0.4838	0.0720	H68	1.0893	0.6894	0.0276
F30	0.1426	0.2490	0.0048	H69	0.8751	0.6798	0.0245
F31	0.2603	0.4035	0.0246	H70	1.1045	0.9693	0.0155
C32	1.1203	0.7545	0.1087	H71	1.0868	1.0079	0.0687
C33	0.9653	0.8421	0.0525	H72	1.2197	0.8923	0.0534
C34	0.9802	0.7362	0.0215	H73	-0.3356	0.1901	0.1827
C35	1.1042	0.9365	0.0471	H74	-0.6100	0.2427	0.1853
F36	0.0282	0.4017	0.0020	H75	-0.5435	0.1919	0.1361
O37	-0.4308	0.1231	0.1846	H76	-0.8101	0.1237	0.1519
C38	-0.5696	0.1669	0.1671	H77	-0.6709	0.0043	0.1485
C39	-0.7016	0.0870	0.1643	H78	-0.7374	0.0551	0.1977

表 6
關於實例 2e，型式 A-1 之原子座標

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
O1	0.3737	0.5677	0.1038	H34	-0.1640	0.1792	0.0657
N2	0.6127	0.6388	0.1027	H16	0.1740	0.4180	0.1027
O3	0.3132	0.7830	0.1897	H32	-0.2563	0.1746	0.1343
C4	0.5064	0.5520	0.0949	H24	-0.1168	0.3282	0.2594
N5	0.2190	0.5059	0.1814	H5	0.2557	0.5241	0.1532
C6	0.1016	0.4290	0.1870	H28A	0.4510	0.5073	0.2614
N7	0.9018	0.7409	0.0835	H28B	0.4099	0.3978	0.2297
N8	0.5246	0.6588	0.1932	H30A	0.5706	0.4800	0.1779
C9	0.3746	0.6827	0.1988	H30B	0.6614	0.5265	0.2179
N10	0.0495	0.4145	0.2272	H15	0.2312	0.5873	0.2385
C11	0.5829	0.7591	0.1239	H17	0.5966	0.8294	0.1852
C12	0.0312	0.3644	0.1517	H2	0.7132	0.6191	0.0935
C13	-0.0936	0.2901	0.1617	H18A	0.6668	0.4348	0.0693
N14	-0.1492	0.2774	0.2023	H18B	0.5096	0.4227	0.0469
C15	0.3004	0.5650	0.2162	H18C	0.5363	0.3599	0.0916
C16	0.0858	0.3691	0.1092	H22A	0.8097	0.7261	0.2084
C17	0.6197	0.7499	0.1719	H22B	0.8144	0.6500	0.1655
C18	0.5600	0.4313	0.0739	H11	0.4780	0.7781	0.1200
C19	0.6747	0.8657	0.1038	H19A	0.6550	0.8673	0.0737

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
F20	0.1808	0.3831	0.0261	H19B	0.6472	0.9456	0.1161
C21	0.0143	0.3015	0.0775	H27A	0.8511	0.9136	0.1702
C22	0.7871	0.7290	0.1785	H27B	0.9840	0.8202	0.1605
C23	0.8454	0.8483	0.1091	H23	0.8972	0.9223	0.0991
C24	-0.0739	0.3401	0.2315	H33A	1.0920	0.6435	0.0741
F25	0.1345	0.1856	0.0238	H33B	1.0747	0.6924	0.1211
C26	0.0743	0.2971	0.0335	H33C	1.1211	0.7863	0.0846
C27	0.8780	0.8348	0.1570	H31	0.7694	0.7749	0.0364
C28	0.4326	0.4864	0.2320	H37A	0.9230	0.8700	-0.0130
F29	-0.0287	0.3175	0.0040	H37B	1.0541	0.8649	0.0205
C30	0.5653	0.5283	0.2038	H37C	0.9089	0.9442	0.0302
C31	0.8750	0.7554	0.0374	H36A	0.8874	0.6527	-0.0172
C32	-0.1674	0.2229	0.1280	H36B	0.8419	0.5709	0.0225
C33	1.0612	0.7135	0.0915	H36C	1.0100	0.6124	0.0161
C34	-0.1156	0.2277	0.0877	H40A	-0.7132	0.1528	0.2120
C35	-0.6607	0.1145	0.1509	H40B	-0.7533	0.0132	0.1994
C36	0.9067	0.6372	0.0125	H40C	-0.8560	0.1249	0.1840
C37	0.9468	0.8688	0.0169	H38A	-0.7948	0.0004	0.1242
C38	-0.7123	0.0511	0.1141	H38B	-0.6331	-0.0032	0.1041
O39	-0.5629	0.1869	0.1523	H38C	-0.7461	0.1041	0.0912
C40	-0.7542	0.0996	0.1900				

表 7
關於實例 2f，型式 N-2 之原子座標

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C1	-0.1614	0.2577	0.0383	F7	0.6225	0.2634	0.5011
C2	0.0133	0.3873	0.0895	F8	0.7150	0.2806	0.6609
C3	-0.0055	0.3310	-0.0010	F9	0.5345	0.2749	0.6173
C4	-0.0893	0.3603	-0.1048	F10	0.6186	0.2737	0.7242
C5	-0.0096	0.1977	-0.0307	F11	0.7090	0.2767	0.6039
C6	0.1226	0.1850	-0.0004	F12	0.5230	0.2690	0.5624
C7	-0.0693	0.1244	-0.0205	H10A	-0.0413	0.1190	0.1459
C8	0.1708	0.1498	0.1106	H10B	-0.0615	0.0409	0.0911
C9	0.1075	0.0771	0.1147	H11	0.0996	0.2283	0.1837
C10	-0.0234	0.0881	0.0905	H12	0.3217	-0.0767	0.3481
C11	0.2617	0.0045	0.2339	H13A	0.1891	-0.0144	0.4538
C12	0.2925	-0.0262	0.3476	H13B	0.1378	-0.0726	0.3618

200823203

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C13	0.1771	-0.0254	0.3775	H14A	0.0237	0.0225	0.2848
C14	0.1062	0.0350	0.3075	H14B	0.1156	0.0818	0.3457
C15	0.2367	0.2052	0.2942	H16A	0.1608	0.2374	0.4116
C16	0.2078	0.2604	0.3702	H16B	0.1652	0.3007	0.3293
C17	0.5499	-0.0989	0.6085	H16C	0.2789	0.2786	0.4183
C18	0.4630	-0.0041	0.5011	H17	0.5477	-0.1488	0.6244
C19	0.5492	0.0453	0.5666	H1A	-0.1774	0.3007	0.0757
C20	0.6362	0.0119	0.6505	H1B	-0.1761	0.2143	0.0756
C21	0.5475	0.1213	0.5540	H1C	-0.2111	0.2575	-0.0344
C22	0.7226	0.0568	0.7150	H21	0.4899	0.1433	0.4990
C23	0.7201	0.1309	0.7026	H22	0.7832	0.0354	0.7676
C24	0.6306	0.1640	0.6225	H23	0.7779	0.1599	0.7473
C25	0.6233	0.2457	0.6114	H26A	0.3405	0.0047	-0.3327
C26	0.3178	0.0508	-0.3076	H26B	0.3247	0.0893	-0.3570
C27	0.3677	0.1429	-0.1554	H26C	0.2382	0.0477	-0.3035
C28	0.2847	-0.0135	-0.1112	H27A	0.2885	0.1420	-0.1496
C29	0.3985	0.0680	-0.1941	H27B	0.3753	0.1801	-0.2063
C30	0.4839	-0.0499	-0.1192	H27C	0.4198	0.1537	-0.0857
C31	0.4689	-0.1207	-0.0596	H28A	0.2347	0.0287	-0.1160
C32	0.6120	-0.0241	-0.0769	H28B	0.2875	-0.0400	-0.0457
C33	0.6492	-0.0164	0.0464	H28C	0.2545	-0.0451	-0.1725
C34	0.6335	-0.0892	0.1001	H29	0.4782	0.0723	-0.2025
C35	0.5063	-0.1148	0.0626	H2A	-0.0589	0.3951	0.1087
C36	0.6313	0.0922	0.1569	H2B	0.0389	0.4330	0.0656
C37	0.5494	0.1489	0.1804	H2C	0.0717	0.3696	0.1516
C38	0.7946	-0.0826	0.2650	H3	0.0704	0.3241	-0.0167
C39	0.6078	-0.0715	0.2941	H30	0.4704	-0.0619	-0.1962
C40	0.6937	-0.0843	0.4027	H31A	0.3871	-0.1351	-0.0819
C41	0.8124	-0.0650	0.3838	H31B	0.5139	-0.1595	-0.0817
C42	0.8969	0.0402	0.4994	H32A	0.6629	-0.0594	-0.0989
C43	0.9918	0.0223	0.6769	H32B	0.6212	0.0230	-0.1096
C44	0.9164	0.1178	0.5156	H33	0.7326	-0.0036	0.0683
C45	1.0010	0.2152	0.6420	H34	0.6810	-0.1261	0.0750
C46	0.9795	0.1403	0.6212	H35A	0.4983	-0.1624	0.0944
C47	0.9601	0.2664	0.5640	H35B	0.4564	-0.0799	0.0866
C48	0.8959	0.2447	0.4599	H37A	0.5607	0.1528	0.2573
C49	0.8756	0.1715	0.4360	H37B	0.4700	0.1346	0.1467

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C50	0.8489	0.3015	0.3761	H37C	0.5650	0.1957	0.1521
N1	1.0171	0.0906	0.7037	H39A	0.5425	-0.1055	0.2823
N2	0.6368	-0.0622	0.6704	H39B	0.5781	-0.0214	0.2880
N3	0.9331	-0.0075	0.5810	H40A	0.6920	-0.1353	0.4251
N4	0.4627	-0.0749	0.5246	H40B	0.6765	-0.0527	0.4577
N5	0.8420	0.0126	0.4015	H41	0.8743	-0.0960	0.4288
N6	0.6777	-0.0849	0.2178	H43	1.0183	-0.0115	0.7327
N7	0.5849	0.0426	0.0803	H45	1.0440	0.2303	0.7105
N8	0.4025	0.0106	-0.1105	H47	0.9746	0.3161	0.5795
N9	0.3818	0.0211	0.4149	H49	0.8344	0.1575	0.3664
N10	0.1561	0.0378	0.2158	H4A	-0.1020	0.3231	-0.1600
N11	0.1599	0.2000	0.1967	H4B	-0.0560	0.4033	-0.1288
N12	-0.0389	0.2585	0.0355	H4C	-0.1627	0.3731	-0.0908
O1	0.8718	-0.0902	0.2185	H5	0.8235	0.0422	0.3470
O2	0.7359	0.0910	0.2072	H5A	-0.0340	0.2128	-0.1069
O3	0.3220	0.0019	0.1698	H6A	0.1414	0.1536	-0.0548
O4	0.3257	0.1671	0.3217	H6B	0.1615	0.2319	-0.0017
F1	0.7539	0.2815	0.3030	H7	0.5113	0.0460	0.0488
F2	0.9209	0.3190	0.3146	H7A	-0.1528	0.1327	-0.0337
F3	0.8233	0.3648	0.4151	H7B	-0.0576	0.0910	-0.0759
F4	0.8500	0.2791	0.2840	H8	0.2540	0.1393	0.1202
F5	0.9132	0.3571	0.3931	H9	0.3825	0.0671	0.3986
F6	0.7377	0.3127	0.3710	H9A	0.1212	0.0462	0.0565

表 8
關於實例 2g，型式 AN-3 之原子座標

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	0.3835	0.0757	0.0375	H21	-0.1570	0.4019	0.0806
N2	0.7286	-0.0185	0.1260	H6	0.2566	0.2184	0.1457
N3	0.2667	0.0953	-0.1106	H15	-0.1768	0.3372	-0.0677
O4	0.4406	0.1041	0.2348	H20	0.1322	0.1240	-0.2309
C6	0.1693	0.2426	0.1013	H1	0.3709	0.0824	0.1036
N7	0.6875	0.0647	0.3206	H17	0.4819	-0.0292	-0.0463
C8	0.0362	0.2388	-0.0548	H28A	0.7603	0.0328	-0.0600
O9	0.5030	-0.1317	0.1098	H28B	0.6637	0.1325	-0.0383
C10	0.5797	-0.0561	0.0855	H24A	0.7555	0.1274	0.1175
N11	0.9744	0.0244	0.4480	H24B	0.9167	0.0696	0.0774

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
C12	0.0569	0.3162	0.1260	H19	0.8001	-0.1313	0.2000
C5	0.1605	0.2026	0.0109	H22A	1.0680	-0.0427	0.1790
C13	0.2745	0.1240	-0.0211	H22B	1.0006	0.0401	0.2458
N14	0.0255	0.2060	-0.1450	H29A	1.0737	-0.1556	0.3001
C15	-0.0858	0.3132	-0.0252	H29B	1.1889	-0.0637	0.3299
C16	0.5624	0.1278	0.2890	H27	1.0060	-0.1224	0.4487
C17	0.5237	0.0103	0.0054	H23A	0.6964	-0.0882	0.4334
C18	1.1544	0.0668	0.4534	H23B	0.7596	-0.1700	0.3643
C19	0.8045	-0.0612	0.2107	H25	0.5708	-0.0620	0.2829
C20	0.1422	0.1402	-0.1658	H7	0.7807	0.0874	0.3623
C21	-0.0752	0.3517	0.0617	H34A	0.6865	0.2365	0.3642
C22	0.9970	-0.0294	0.2320	H34B	0.4795	0.2484	0.3581
C23	0.7649	-0.1008	0.3793	H34C	0.5937	0.2759	0.2722
C24	0.7898	0.0709	0.0816	H36A	0.7774	-0.0065	0.5345
C25	0.6909	-0.0417	0.2964	H36B	0.8886	0.0871	0.5638
C26	0.6097	0.2153	0.6473	H36C	0.9671	-0.0190	0.5809
C27	0.9604	-0.0758	0.4035	H18	1.1968	0.0630	0.3910
C28	0.6935	0.0679	-0.0147	H35A	1.4009	0.0440	0.5102
C29	1.0708	-0.0864	0.3149	H35B	1.3030	-0.0555	0.4859
F30	0.1149	0.3018	0.2839	H35C	1.2530	0.0042	0.5751
C31	1.1447	0.1747	0.4843	H31A	1.2617	0.2028	0.4883
C32	0.0681	0.3603	0.2194	H31B	1.0911	0.1790	0.5441
F33	-0.0775	0.3987	0.2482	H31C	1.0736	0.2106	0.4391
C34	0.5829	0.2314	0.3240	H37A	0.5614	0.1191	0.7457
C35	1.2896	0.0095	0.5118	H37B	0.5364	0.2293	0.7767
C36	0.8948	0.0210	0.5396	H37C	0.7279	0.1858	0.7670
C37	0.6085	0.1849	0.7418				
N38	0.6123	0.2421	0.5722				
F39	0.1781	0.4283	0.2274				

表 9
關於實例 2h，型式 H4-1, HCl 之原子座標

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N1	-0.1488	0.2098	-0.0343	H42	0.3077	0.3275	0.1257
O2	0.3490	0.4972	0.0272	H43	0.1538	0.2201	0.0743
N3	0.2326	0.3477	0.0060	H44	0.5279	0.4347	0.1149
N4	0.2975	0.2676	0.0466	H45	0.7124	0.4674	0.0613

200823203

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
N5	0.0807	0.4627	0.0181	H46	0.4192	0.2973	0.0255
N6	0.5197	0.3793	0.0531	H47	0.2578	0.0900	0.0153
F7	-0.0010	0.2280	0.0989	H48	0.1288	0.1011	0.0254
O8	0.1939	0.6851	0.0181	H49	0.0936	0.1554	-0.0028
C9	0.2189	0.4432	-0.0048	H50	0.2571	0.2098	-0.0092
C10	0.3038	0.3881	0.0205	H51	0.3036	0.5397	-0.0022
N11	0.5990	0.4425	0.0823	H52	0.2392	0.5114	-0.0309
C12	0.0927	0.4487	-0.0003	H53	0.2974	0.4009	-0.0274
C13	-0.0342	0.3317	-0.0074	H54	0.0792	0.2199	-0.0265
C14	0.3955	0.3262	0.0584	H55	0.1025	0.3114	-0.0456
C15	0.4700	0.3861	0.0880	H56	-0.0076	0.4161	-0.0330
C16	0.3630	0.3248	0.0764	H57	-0.0551	0.2416	-0.0013
C17	0.1395	0.5810	0.0261	H58	-0.1201	0.3469	-0.0044
C18	0.3194	0.2774	0.0280	H59	0.0964	0.5331	-0.0071
C19	-0.1511	0.2151	-0.0542	H60	0.1837	0.6722	0.0512
C20	0.1983	0.2123	0.0011	H61	0.0338	0.5217	0.0502
C21	0.0952	0.3112	-0.0319	H62	0.1844	0.5224	0.0503
C22	-0.0230	0.3271	-0.0270	H63	-0.2772	0.1614	-0.0127
C23	0.2130	0.2691	0.1003	H64	-0.2760	0.2805	-0.0267
C24	0.2222	0.4228	-0.0243	H65	-0.3579	0.1133	-0.0329
C25	0.2358	0.2673	0.0829	H66	-0.0504	0.2577	-0.0592
C26	0.4468	0.3881	0.1058	H67	-0.1794	0.3278	-0.0737
C27	0.3218	0.3305	0.1117	H68	-0.3053	0.2578	-0.0581
C28	0.1344	0.5769	0.0455	H69	-0.1526	0.3966	-0.0528
C29	-0.2730	0.1906	-0.0263	H70	-0.2410	0.0701	-0.0746
F30	0.0717	0.2300	0.1235	H71	-0.1946	0.0132	-0.0562
C31	0.2191	0.1567	0.0180	H72	-0.3347	0.0316	-0.0554
C32	0.6135	0.4326	0.0655	H73	-0.1530	0.1183	-0.0305
F33	0.0240	0.0760	0.1070	H74	0.0220	0.3750	0.0260
C34	0.0782	0.2012	0.1072	H75	0.1982	0.2109	0.0512
C35	-0.2346	0.0735	-0.0609	H76	0.2980	0.8016	0.0030
C36	-0.1999	0.3066	-0.0603	H77	0.4177	0.8365	-0.0131
CL37	0.0168	0.2311	0.0469	H78	-0.2680	0.2326	0.0385
O38	-0.1364	0.0296	0.0183	H79	-0.2444	0.1328	0.0235
O39	0.3598	0.8724	-0.0063	H80	-0.2485	0.2185	0.0683
O40	-0.2980	0.1857	0.0261	H81	-0.1126	0.2683	0.0544
O41	-0.1879	0.2915	0.0585	H82	-0.0947	0.0714	0.0059

原子	X	Y	Z	原子	X	Y	Z
				H83	-0.0825	0.1005	0.0284

表 10

關於實例 2a、b、d、e、f、g 及 h 之特性粉末 x-射線繞射吸收峰位置(度 $2\theta \pm 0.1$)@ RT，以高品質圖樣為基礎，以繞射計(Cu K α)收集，使用旋轉毛細管，其中 2θ 以 NIST 其他適當標準作校準。

實例 2a	實例 2b	實例 2d	實例 2e	實例 2f	實例 2g	實例 2h
8.1	10.0	5.5	10.1	7.2	6.3	6.9
11.7	11.4	9.6	11.3	8.7	9.0	8.7
13.0	11.9	11.4	11.9	9.7	11.7	9.8
13.9	14.3	14.5	13.3	12.5	15.0	10.3
16.6	15.6	15.8	14.2	12.8	17.6	11.8
17.0	16.5	16.6	15.6	13.3	18.6	13.5
17.6	19.1	18.4	16.8	16.0	19.7	15.0
21.1	19.4	19.2	19.0	16.6	20.7	18.8
23.2	20.2	20.0	19.5	18.2	21.4	21.4
23.9	21.2	23.6	20.4	18.8	23.8	22.9

比較藥理學特性

將實例 1 與 WO2005021500 (相當於美國專利案號 7,163,937，歸屬於本案申請人) 中所發現化合物之藥理學特性作比較之檢測與數據，係於下文提出。

人類末梢血液單核細胞結合("CCR2 結合")

亦參閱：Yoshimura 等人, *J. Immunol.* 1990, 145, 292。人類 CCR2 結合檢測係以人類末梢血液單核細胞(hPBMC)，使用 ^{125}I -人類 MCP-1 作為示蹤劑配位體而建立。hPBMC 係使用具有 Ficoll-Hypaque (Mediatech Cellgro) 之標準擬案，單離自人類 leukopak (Biological Specialty 公司)。將經單離之 hPBMC 洗滌，並

在結合緩衝劑 (RPMI-1640, 0.1% BSA, 20 mM Hepes, pH 7.4) 中，稀釋至 1×10^7 / 毫升。將 ^{125}I -MCP-1 (NEN/Perk Elmer) 在結合緩衝劑中稀釋至 0.45 nM。將化合物於結合緩衝劑中，在結合檢測中所使用最後濃度之 3-倍下稀釋。結合檢測係使用 96-井濾板 (Millipore) 進行。總 ^{125}I -MCP-1 結合係按下述評估：於總體積為 150 微升之各反應物中，添加 5×10^5 個細胞、0.15 nM ^{125}I -MCP-1 及化合物，以致使最後濃度範圍為 0 至 100 nM。使板在室溫下培養 30 分鐘，接著使用真空歧管過濾 (Millipore)，以 RPMI-1640, 0.1% BSA, 0.4M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.4 三次洗滌。於洗滌後，使板在室溫下風乾 60 分鐘。接著添加 25 微升 Microscint 20 至各井中。將板密封，並於 Trilux 上計數 1 分鐘。非專一性結合係於 300 nM 冷 MCP-1 (PeproTech 公司) 存在下測定。專一 ^{125}I -MCP-1 係以全部與非專一性結合間之差異計算。所有條件均重複測試。IC₅₀ 係被定義為降低專一性結合達 50% 所需要競爭化合物之濃度。

hERG 通量

使安定地表現 hERG 通道之 HEK293 細胞於培養器上，在經補充 10% Sigma 牛胎兒血清、非必須胺基酸、2 mM L-麩醯胺及 500 微克 / 毫升 G418 之 Dulbecco 氏變性 Eagle 氏培養基中生長 (37°C , 5% CO₂)。使用細胞解離緩衝劑，以自燒瓶萃取細胞，然後將其在每井 (20 微升) 2×10^4 個細胞之密度下，於 10% 血清培養基中，覆蓋至 384-井 Corning 聚-D-離胺酸塗覆之黑色 / 透明板中，並在 37°C 下，於 5% CO₂ 培養器中培養 15-24 小時，直到獲得細胞之匯合單層為止。

BTC-AM 染料 (Molecular Probes, Eugene, OR) 之 2 mM 儲備液係在 100% DMSO 中製成，然後在檢測當天，以 1:1 添加至 DMSO 中之 10% (w/v) 普洛尼克酸內。接著，將染料在 hERG 外部 EP 緩衝劑 (140 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.3 及 10 mM 葡萄糖；所有緩衝劑成份均得自 Sigma 化學公司) 中稀釋。將此 BTC 染料混合物 (30 微升) 添加至細胞中，並產生 2.5 μM 之最後裝填濃度。使細胞在 21°C 下培養 45 分鐘。

將待測化合物以 60 微升稀釋至 10 mM DMSO。然後在 1:2 比例下，於 DMSO 中，在 384-井板之直行 1-10 與 11-20 內，連續性地稀釋此等化合物。預備檢測板係經由從 DMSO 連續性地經稀釋板點取 2.5 微升而產生，其係在 Velocity 11 BioCel 上製成。含水板係藉由添加 48 微升 EP 緩衝劑而產生，然後在 FLIPR 上讀取檢測之前稀釋 30-45 分鐘。於染料裝填後，將稀化合物水溶液添加至三個複製板 (10 微升) 之細胞中，產生 80 μM 至 0.156 nM 之十點濃度範圍。在檢測中之最後 DMSO 濃度為 1%。預備檢測含水板係經製備，並在 Cybio 液體處理器上稀釋。

經裝填染料之細胞係在 FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上讀取，其係使用氬雷射之 488 毫微米線激發染料。發射係使用 540 ± 30 毫微米帶通濾波器過濾。hERG 通道係藉由添加含有 66 mM K₂SO₄ 與 1.3 mM Tl₂SO₄ (Sigma/Aldrich) 之 20 微升 / 井 EP 緩衝劑刺激而開啟。對於各板，係每秒收集數據，歷經 12 秒期間，此時添加含 Tl⁺ 之刺激緩衝劑。每秒進行數據

收集，歷經 48 秒，然後每三秒持續進行另外 2 分鐘。

檢測之動態範圍係測定自空白試驗與總體試驗井。總體試驗井(直行 21 與 22)係界定板(沒有待測化合物存在)之最大 hERG 活化作用，而空白試驗井(直行 23 與 24)係界定 100% hERG 抑制。空白試驗井係含有 400 nM 之標準 hERG 抑制劑多菲提得(dofetilide)(Ficker 等人, 1998)或 E-4031 之任一種。首先將各試樣井中之原始數據點針對細胞/訊息偏差、負對照組(空白試驗)背景，使用線上 FLIPR 軟體作修正，並正規化至正對照組(總體試驗)。然後，關於 hERG Tl^+ 通量數據之待測化合物濃度回應曲線，係使用 Excel Fit (ID Business Solutions 有限公司, Surrey, UK)，以單一位置計算術方程式($Y = A + ((B-A)/1 + ((C/X)^D))$)，其中 $A = \text{最大抑制}$)吻合。分析數據，其方式是將對 Tl^+ 通量之螢光上最高變化幅度，對待測化合物之特定條件作吻合。化合物之功效(IC_{50} 值)係計算自三份複製井之平均值。

鈉通道，位置 2 結合檢測

亦參閱：W. A. Catterall 等人 *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 8922。

標準結合緩衝劑含有 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 130 mM 氯化膽鹼, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 5.5 mM 葡萄糖, 40 微克/毫升 LqT。結合反應係藉由添加突觸體(製自 Wistar 大白鼠腦部)至含有標準結合緩衝劑中之 5 nM $[^3\text{H}]$ -蝦膜毒素及在所要濃度下欲被測試之化合物之反應混合物中而起始。然後將試樣混合，並在 37°C 下培養 60 分鐘。藉由添加含有 50 mM HEPES, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2

及 1 毫克 / 毫升牛血清白蛋白之冰冷洗滌緩衝劑使反應停止。立即收集突觸體至玻璃纖維濾器上，並以洗滌緩衝劑洗滌 3 次。殘留在濾器上之 [³H]- 蝦膜毒素之放射活性，係使用液體閃爍分光計計數。

平行人工膜滲透性檢測 (PAMPA)

平行人工膜滲透性檢測 (PAMPA) 係包括被稱為胃腸道 (GIT) 脂質之特殊調配卵磷脂為基料之脂質組合。此 GIT 脂質係用以在類似 Caco-2 檢測中所使用之夾層板組裝中形成膜。當藉由已知會被動地吸收在人類中之標準化合物度量時，GIT 脂質係接近地類似活體內細胞膜組合物與性能。PAMPA 係被廣泛地作為發現化合物滲透性篩檢之活體外模式使用。化合物經過 PAMPA 膜之通過速率，係用以測定滲透係數 (Pc)，其可能與化合物之活體內被動滲透性有關聯。

特定化合物之滲透係數 (Pc) 係在具有頂端及底與外側 pH 為 7.4 之 pH 依賴性環境中檢驗。所有實驗均在三份複製測定中進行。

將化合物 (在 100% DMSO 中之 10 mM 儲備液) 於 pH 7.4 供體井緩衝劑 (pION 目錄 #110151) 中以 1 : 100 稀釋，提供 1% DMSO 中之 100 μM 檢測溶液。將經稀釋於供體井緩衝劑中之化合物轉移至 Whatman 單濾器板，並在分配 200 微升至檢測板 (pION 目錄 #110163) 之供體井之前過濾。PAMPA 膜係經由以吸量管吸取 4 微升脂質溶液 (pION 目錄 #110169) 至濾板 (VWR 目錄 #13503) 上而形成。然後，將該膜以在 pH 7.4 下之 200 微升受體井緩衝劑 (pION 目錄 #110139) 覆蓋。合併 PAMPA 檢測板

(供體側與受體側)，並使其在室溫下培養4小時。接著將板拆開，並充填分光光度計板(VWR 目錄 #655801) (150微升/井)。供體、受體、參考物及空白試驗板係在 SpectraMax UV 板讀取器中讀取。數據係藉由 pION 軟體捕獲，其係分析光譜且產生 P_c 值。

CCR2 趨化性

人類 CCR2 趨化性檢測係使用人類單核血球細胞系 THP-1 進行。首先將 THP-1 細胞在 37°C 下，於不含酚紅、不含 BSA 之 RPMI-1640 (pH 7.4) 中，以螢光染料鈣黃綠素-AM 標識，歷經 30 分鐘，伴隨著每 15 分鐘溫和混合。然後，洗滌經標識之細胞，並於 1×10^5 /毫升下，再懸浮於趨化性緩衝劑(不含酚紅之 RPMI-1640, 0.1% BSA, pH 7.4) 中。將待測化合物在趨化性緩衝劑中稀釋，以致使最後檢測濃度範圍為 0.01 nM 至 $1 \mu\text{M}$ 。將配位體 MCP-1 (PeproTech 公司) 在趨化性緩衝劑中稀釋至 20 nM。為進行此檢測，係將等體積之待測化合物稀釋液與等體積之經標識 THP-1 細胞混合(混合物 1)，並將等體積之待測化合物稀釋液與等體積之稀 MCP-1 配位體混合(混合物 2)。使兩種混合物獨立地在 37°C 下培養 10 分鐘，接著溫和混合。然後，MCP-1 所引致之趨化性係在趨化性板(Becton Dickinson) 中，藉由放置 50 微升混合物 1 於頂部室中，及 225 微升混合物 2 於底部室中進行度量。將板以蓋子覆蓋，並在 37°C 下培養 30 分鐘。30 分鐘後，該板係在 Cytofluor 上讀取。所有條件均重複測試。關於信號對噪聲測定，係將單獨 50 微升經標識之 THP-1 細胞 (5×10^4 /井) 置於頂部室中，並將單獨

225 微升配位體 MCP-1 置於底部室中(最後濃度為 10 nM)。藉由待測化合物之分級濃度所達成之抑制，係以不含化合物之 MCP-1 對照組之百分比計算。IC₅₀ 係被定義為達到細胞趨化性之 50% 抑制作用所需要待測化合物之濃度。

hERG 貼片夾持

全細胞貼片夾持係在安定地表現無性繁殖 hERG 鉀通道 α 亞單位之 HEK-293 細胞中，用以直接地度量 hERG 電流。化合物係在室溫下，於具有 pH 7.4 之緩衝水溶液中測試。施加重複性試驗脈衝 (0.05 Hz)，從保持電位 -80 mV 至 +20 mV，歷經 2 秒，而尾電流係在試驗脈衝之後，藉由形成電壓階層至 -65 mV 而被誘出。來自化合物之作用係藉由度量尖峰尾電流之抑制計算而得。

鈉通道貼片夾持

全細胞貼片夾持係在表現人類心臟鈉通道 SCN5A 之 HEK-293 細胞中，用以直接地度量向內鈉電流。化合物係在不含蛋白質之緩衝水溶液中測試。關於測定穩定狀態抑制，鈉電流係使用下述電壓擬案每 5 秒誘出：將細胞保持在 -90 mV 之電位下，並逐步至 -20 mV，歷經 60 毫秒。在試驗脈衝至 -20 mV 期間，藉由度量峰電流之抑制，計算其作用。抑制之速率依存性係藉由在 1 Hz 與 4 Hz 頻率下之刺激進行評估。

在大白鼠中之單一劑量藥物動力學

將雄性史泊格多利 (Sprague-Dawley) 大白鼠 (250-300 克) 用於藥物動力學研究。在經口服藥之前，使大白鼠斷食過夜，

而於服藥後 4 小時餵食。從頸靜脈收集血液試樣 (~0.3 毫升) 至含 K₂EDTA 之管件中，然後在 4°C 下離心 (1500-2000x 克)，以獲得血漿。在口服生物利用率研究中，使 2 組動物 (每組 N=2-3) 接受待測化合物，無論是經由頸靜脈，以靜脈內 (IV) 灌注 (歷經 10 分鐘)，或藉由口腔灌食法。序列血液試樣係在服藥後，於 0.17 (僅針對 IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8 及 24 小時下獲得。將經由在 4°C 下離心 (1500-2000x 克) 所獲得之血漿試樣，在 -20°C 下儲存，直到藉由 LC/MS/MS 分析為止。

在猴子中之單一劑量藥物動力學

各種待測化合物之藥物動力學係在公獮猴屬猴子中，於交叉設計中評估。在經口服藥之前，使猴子斷食過夜，而於服藥後 4 小時餵食。使一組 1-3 隻動物 (3 至 5 公斤) 經由股靜脈藉 IV 灌注 (歷經 10 分鐘) 與藉由口腔灌食法接受化合物，伴隨著治療間之 1 週沖失。在服藥後，於 0.17 (僅 IV), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8 及 24 小時下，從股動脈收集序列血液試樣 (~0.3 毫升)，並在 4°C 下離心 (1500-2000x 克)，以獲得血漿。將試樣在 -20°C 下儲存，直到藉由 LC/MS/MS 分析為止。

關於藥物動力學檢測之數據分析

藥物動力學參數係藉由血漿濃度對時間數據之非區域分析 (KINETICATM 軟體，4.2 版，InnaPhase 公司，Philadelphia, PA) 獲得。尖峰濃度 (C_{max}) 與 C_{max} 之間係直接記錄自實驗觀察。從時間零至最後取樣時間之曲線下方面積 (AUC(0-T))，係使用線性與對數梯形總和之組合計算而得。總血漿清除率 (CLTp)、分佈之穩定狀態體積 (Vss)、表觀脫除半生期 (T_{1/2})

及平均滯留時間(MRT)係於靜脈內投藥後估計。T_{1/2}之估計係使用具有可計量濃度之最少3個時間點施行。絕對口服生物利用率(F)係以口服與IV劑量後之劑量正規化AUC值之比例估計。

當在上述檢測中度量時，發現下文關於各化合物之數據。

表 11. 比較活體外數據

化合物	CCR2 結合 IC ₅₀ (nM)	hERG 通量 IC ₅₀ (nM)	Na ⁺ 通道 結合 (% 抑制)	PAMPA 滲透性 (毫微米/秒)
實例 12as, WO2005021500	0.27 (1)	2,800	不可取得	不可取得
實例 12aj WO2005021500	0.43 ± 0.06 (2)	770	不可取得	不可取得
實例 2k WO2005021500	0.88 ± 0.60 (23)	51,000	97%, 10,000 nM	529 ± 157 (9)
實例 12bd WO2005021500	1.15 ± 0.07 (2)	>80,000	54%, 10,000 nM	392
實例 8a WO2005021500	1.83 ± 0.80 (12)	>80,000	3%, 10,000 nM 33%, 30,000 nM	94 ± 58 (10)
實例 8e, WO2005021500	2.20 ± 0.03 (2)	>80,000	6%, 10,000 nM	2 ± 2 (2)
實例 9c, WO2005021500	0.96 ± 0.26 (19)	>80,000	48%, 10,000 nM 75%, 30,000 nM	145 ± 71 (8)
實例 1 本發明	1.14 ± 0.69 (18)	>80,000	0%, 10,000 nM ; 21%, 30,000 nM	443 ± 114 (8)

表 12a. 其他比較活體外數據

化合物	CCR2 趨化性 IC ₅₀ (nM)	hERG 貼片夾持 (% 抑制)	Na ⁺ 通道貼片夾 持(% 抑制)
實例 2k 美國專利 7,163,937	0.24 ± 0.16 (12)	83%, 10,000 nM	52%, 10,000 nM 90%, 30,000 nM
實例 8a WO2005021500	2.63 ± 1.24 (4)	4%, 10,000 nM	22%, 10,000 nM 49%, 30,000 nM
實例 9c, WO2005021500	0.21	4%, 10,000 nM	19%, 10,000 nM 39%, 30,000 nM

實例 1, 本發明	0.67 ± 0.42 (22)	33%, 10,000 nM 61%, 30,000 nM	17%, 10,000 nM 19%, 30,000 nM
-----------	----------------------	----------------------------------	----------------------------------

表 12b. 在大白鼠中之比較活體內藥物動力學數據

化合物	劑量 IV/PO (毫克/公斤)	Cl (毫升/ 分鐘/公斤)	F%	口服 AUC (nM*h)
實例 2k WO2005021500	2.5 / 25	40	68	9294
實例 8a WO2005021500	6 / 72	42	1.4	690
實例 9c, WO2005021500	4 / 43	54	14	1855
實例 1, 本發明	2 / 10	43	51	3794

表 12c. 在猴子中之比較活體內藥物動力學數據

化合物	劑量 IV/PO (毫克/公斤)	Cl (毫升/ 分鐘/公斤)	F%	口服 AUC (nM*h)
實例 2k WO2005021500	1 / 1.4	25	46	862
實例 8a WO2005021500	1 / 11	14	9.4	1896
實例 9c, WO2005021500	1 / 10	12	26	6763
實例 1, 本發明	1 / 1.3	23	47	836

利用性

實例之代表性化合物係使用熟諳此藝者已知之檢測，經証實為趨化因子受體活性之調節劑。在此段落中，吾人係描述此等檢測及給予其文獻參考資料。更多檢測係被描述於本文前述標題為"比較藥理學特性"之段落中。由於在此等 MCP-1 拮抗作用之檢測中顯現活性，故預期實例之化合物可用於治療與趨化因子及其同源受體有關聯之人類疾病。當於特定檢測中度量時，於此等檢測中活性之定義為在濃度上展現 IC_{50} 為 $30 \mu\text{M}$ 或較低之化合物。

MCP-1 結合至人類 PBMC 之拮抗作用

(Yoshimura 等人, *J. Immunol.* 1990, 145, 292)

於實例中所述之至少一種化合物，在此處所述之 MCP-1 結合至人類 PBMC (人類末梢血液單核細胞) 之拮抗作用中，係具有活性。

將微孔濾器板 (#MABVN1250) 以 100 微升結合緩衝劑 (0.5% 牛血清白蛋白；20 mM HEPES 緩衝劑及 5 mM 氯化鎂在 RPMI 1640 培養基中)，在室溫下處理三十分鐘。為度量結合作用，將 50 微升結合緩衝劑，使用或未使用已知濃度之化合物，與 50 微升¹²⁵-I 標識之人類 MCP-1 (以獲得最後濃度為 150 pM 放射配位體) 及含有 5×10^5 個細胞之 50 微升結合緩衝劑合併。用於此種結合檢測之細胞，可包括藉由 Ficoll-Hypaque 梯度離心所單離之人類末梢血液單核細胞、人類單細胞 (Weiner 等人, *J. Immunol. Methods.* 1980, 36, 89) 或表現內源受體之 THP-1 細胞系。將化合物、細胞及放射配位體之混合物在室溫下培養三十分鐘。將板置於真空歧管上，施加真空，及將板以含有 0.5 M NaCl 之結合緩衝劑洗滌三次。將塑膠邊緣自板移除，使板風乾，將井穿孔及計數。結合作用之抑制百分比，係使用任何競爭化合物不存在下所獲得之總計數，及藉由添加 100 nM MCP-1 替代待測化合物所測得之背景結合，計算而得。

MCP-1 所引致鈣流入量之拮抗作用

(Sullivan 等人, *Methods Mot. Biol.*, 114, 125-133 (1999))

於實例中所述之至少一種化合物，在此處所述之 MCP-1-

所引致鈣流入量檢測之拮抗作用中，係具有活性。

鈣移動係使用螢光 Ca^{2+} 指示劑染料Fluo-3度量。使細胞在 8×10^5 個細胞/毫升下，於含有0.1%牛血清白蛋白、20 mM HEPES緩衝劑、5 mM葡萄糖、1%牛胎兒血清、4 μM Fluo-3 AM及2.5 mM羧苯礦胺之磷酸鹽緩衝之鹽水中，在37°C下培養60分鐘。用於此種鈣檢測之細胞，可包括如由Weiner等人，J. Immunol. Methods, 36, 89-97 (1980)所述經單離之人類單細胞或表現內源CCR2受體之細胞系，譬如THP-1與單Mac-6。然後，將此等細胞在含有0.1%牛血清白蛋白、20 mM HEPES、5 mM葡萄糖及2.5 mM羧苯礦胺之磷酸鹽緩衝之鹽水中洗滌三次。使細胞再懸浮於含有0.5%牛血清白蛋白、20 mM HEPES及2.5 mM羧苯礦胺之磷酸鹽緩衝之鹽水中，於最後濃度 $2-4 \times 10^6$ 個細胞/毫升下。將細胞覆蓋於96-井黑色壁微板(100微升/井)中，並使板在200 x g下離心5分鐘。將不同濃度之化合物添加至井(50微升/井)中，並於5分鐘後，添加50微升/井之MCP-1，以獲得最後濃度為10 nM。利用螢光成像板讀取器偵測鈣移動。以氬雷射(488 nM)使細胞單層激發，並度量細胞結合之螢光達3分鐘(對前90秒為每秒鐘，而對後90秒為每10秒鐘)。數據係以任意螢光單位產生，而對各井之螢光改變，係以最高-最低差別測得。化合物依存之抑制，係相對於單獨MCP-1之回應計算而得。

MCP-1-所引致人類PBMC趨化性之拮抗作用

(Bacon等人, Brit. J. Pharmacol. 1988, 95, 966)

於實例中所述之至少一種化合物，在此處所述之MCP-1-

所引致人類 PBMC 趨化性檢測之拮抗作用中，係具有活性。

將 Neuroprobe MBA96-96-井 趨化室、Polyfiltronics MPC 96 井板及 Neuroprobe 不含聚乙烯基四氫吡咯酮之聚碳酸酯 PFD5 8-微米濾器，在 37°C 培養器中溫熱。使剛經由標準聚蔗糖密度分離方法單離之人類末梢血液單核細胞 (PBMC) (Boyum 等人, *Scand. J. Clin. Lab Invest. Suppl.* 1968, 97, 31) 於 1×10^7 c/ 毫升下，懸浮於 DMEM 中，並在 37°C 下溫熱。亦將人類 MCP-1 之 60 nM 溶液在 37°C 下溫熱。待測化合物之稀釋液係在 DMEM 中所需要濃度之 2x 下構成。將 PBMC 懸浮液與 60 nm MCP-1 溶液，以 1 : 1 混合在具有預先溫熱 DMEM 之聚丙烯管中，使用或未使用待測化合物之稀釋液。使此等混合物在 37°C 管件溫熱器中溫熱。為引發檢測，將 MCP-1/ 化合物混合物添加至 Polyfiltronics MPC 96 井板之井中，該板已被置於 Neuroprobe 趨化室之底部中。對各井大約體積為 400 微升，且於分配後應為正彎月面。8 微米濾器係溫和地置於 96 井板之頂部，使橡膠墊片連接至上方室之底部，並將該室組裝在一起。將 200 微升體積之細胞懸浮液/ 化合物混合物添加至上方室之適當井中。將上方室以板封閉器覆蓋，並將組裝好之單元置於 37°C 培養器中 45 分鐘。於培養後，移除板封閉器，並吸出所有殘留細胞懸浮液。將此室拆開，並溫和地移除濾器。在將濾器保持於 90 度角下時，使用磷酸鹽緩衝鹽水之溫和液流，洗離未潛移之細胞，並將濾器頂部以橡膠刮板之尖端擦拭。此洗滌係再重複兩次。使濾器風乾，然後完全浸沒在 Wright Geimsa 著色料中 45 秒。藉由浸泡在蒸餾水中 7 分

鐘，洗滌濾器，然後在剛蒸餾之水中再洗滌15秒。使濾器再一次風乾。於濾器上之經潛移細胞，係藉由目視顯微鏡術定量。

哺乳動物趨化因子受體係提供用於干擾或促進哺乳動物(譬如人類)中免疫細胞功能之標的。會抑制或促進趨化因子受體功能之化合物，係特別可用於調節免疫細胞功能，以提供治療目的。因此，本發明係針對可用於預防及/或治療極多種炎性、傳染性及免疫調節病症與疾病之化合物，該病症與疾病包括氣喘與過敏性疾病，被致病微生物(其藉由定義係包括病毒)感染，以及自身免疫病理學疾病，譬如風濕性關節炎與動脈粥瘤硬化。

例如，會抑制哺乳動物趨化因子受體(例如人類趨化因子受體)之一或多種功能之本發明化合物，可被投予，以抑制(意即降低或防止)發炎或傳染病。結果，一或多種炎性過程，譬如白血球潛移、黏連、趨化性、胞裂外排(例如酵素、組織胺之胞裂外排)或炎性介體釋出，均被抑制。

同樣地，會促進哺乳動物趨化因子受體(例如人類趨化因子)之一或多種功能之本發明化合物，係被投予以刺激(誘發或增強)免疫或炎性回應，譬如白血球遊出、黏連、趨化性、胞裂外排(例如酵素、組織胺之胞裂外排)或炎性介體釋出，而造成炎性過程之有利刺激。例如，可添補嗜伊紅體，以對抗寄生感染。此外，前述炎性、過敏性及自身免疫疾病之治療，亦可被涵蓋於本發明之化合物中，其會促進哺乳動物趨化因子受體之一或多種功能，若吾人意欲傳

輸足量化合物，經過引致趨化因子受體內部化作用，或以會造成細胞潛移之方向錯誤之方式傳輸化合物，以造成細胞上之受體表現之損失時。

除了靈長類動物譬如人類之外，多種其他哺乳動物可根據本發明之方法進行治療。例如，哺乳動物，包括但不限於乳牛、綿羊、山羊、馬、狗、貓、天竺鼠、大白鼠，或其他牛、羊、馬、犬、貓科動物、齧齒動物或老鼠物種，均可治療。但是，此方法亦可實施在其他物種上，譬如鳥類物種。在上述方法中治療之病患，係為想要在其中調節趨化因子受體活性之雄性或雌性哺乳動物。於本文中使用之"調節"係意欲涵蓋拮抗作用、催動作用、部份拮抗作用及/或部份催動作用。

CCR5 結合與功能性檢測

細胞衍生與細胞培養物：安定地表現內源CC趨化因子受體5 (CCR5)之HT1080細胞匯集庫，係使用由Harrington、Sherf及Rundlett所概述之方法發展(參閱美國專利US 6,361,972與US 6,410,266)。最高表現之無性繁殖系係使用重複性流動細胞計數法單離，接著為次代無性繁殖。然後，將此等細胞在 3×10^5 個細胞/井下，於6-井培養皿中培養，並以含有嵌合HA-標記之G蛋白質Gqi5之DNA載體轉染(分子裝置；得自酵素之15微升Ex-Gen中之5微克線性化載體DNA係用於該轉移感染)。於轉移感染後兩天，將井合併，並覆蓋至P100板中。於覆蓋後七天，選取菌落，擴張，並藉由Western氏沾吸分析Gqi5含量。具有Gqi5(得自轉移感染)與CCR5(內

源)之高度表現之無性繁殖系(稱為 3559.1.6)係經選擇，並使用於下文所述之實驗。將 HT1080 細胞(無性繁殖系 3559.1.6)以經補充 10% 經滲析牛胎兒血清、2% 青霉素/鏈霉素/麴醯胺及 500 微克/毫升潮霉素 B(最後濃度)之 α -MEM，在 37°C 與 5% CO₂下，於潮濕氣層中培養。

細胞膜製劑：使含有 1×10^8 個 HT1080 細胞(無性繁殖系 3559.1.6)之細胞丸粒再懸浮於 5 毫升冰冷細胞膜製備緩衝劑 (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) 中，並於冰上，在高速下，於 Polytron 均化器上均化 20 秒。將勻漿以另外 25 毫升細胞膜製備緩衝劑稀釋，並離心 12 分鐘 (48,000x 克，於 4°C 下)。於如前述再均化之前，使細胞丸粒再懸浮於 5 毫升細胞膜製備緩衝劑中。將勻漿以 5 毫升細胞膜製備緩衝劑稀釋，並檢測 CCR5 蛋白質濃度。

結合檢測：將得自上述細胞膜製劑之剛製成勻漿在結合緩衝劑 (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA；於檢測前，添加一份完全蛋白酶抑制劑片劑) 中稀釋，以達到最後蛋白質濃度為 10 微克/井(得自 Corning 公司之固體白色 96-井板)。將此細胞膜製劑與 WGA-SPA 珠粒 (Amerhsam；經預先浸泡於結合緩衝劑中) 混合，以獲得濃度為 200 微克/井。然後，將細胞膜/SPA 珠粒混合物 (100 微升/井) 添加至板中，該板已以 2 微升含有不同濃度待測物件之 DMSO 預加斑點(對負對照組為純 DMSO；對待測物件，為不同濃度之本發明實例；500 nM MIP-1 β 作為正對照組)。結合檢測係經由添加 50 微升 [¹²⁵I]-MIP-1 β (Perkin Elmer；將物質在結合緩衝劑中稀釋，

以致使 50 微升 / 井之添加係獲得最後濃度為 0.1 nM [^{125}I]-MIP-1 β) 引發。將板密封，並在 Packard TopCount 上計數之前，使其在室溫下靜置 4-6 小時。關於待測物件之百分比結合係經計算，使用負與正對照組以界定各實驗之限幅。

螢光計成像板讀取器 (FLIPR)-為基礎之功能性檢測：將 HT1080 細胞 (無性繁殖系 3559.1.6) 在 10,000 個細胞 / 井 (30 微升) 下覆蓋於 384-井板 (黑色 / 透明底部 Biocoat PDL, Beckton Dickinson) 中，並裝填 30 微升 / 井之 Fluro-4 AM 融光染料 (經由溶解 1 毫克 Fluro-4 AM 於 440 微升 DMSO 中，並在以 10 毫升 Hanks 緩衝劑進一步稀釋之前，以 100 微升普洛尼克 (pluronic) 溶液稀釋而製成)。將細胞於洗滌三次之前，在 37°C 與 5% CO₂ 下培養 30 分鐘，並懸浮於檢測緩衝液 (20 mM HEPES, 1.2 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2.5 毫米羧苯磺胺 (probenecid), 0.5% BSA, 1x Hanks) 中。將待測物件在 DMSO 中連續性地稀釋，然後於添加至細胞 (10 微升 / 井) 中之前，以檢測緩衝液 1: 10 稀釋。使用 FLIPR，讀取板之通量誘發 (意即催動劑活性) (10-70 秒)。接著將細胞以催動劑溶液 (30 微升 / 井；經由在 100 微升 檢測緩衝液中，稀釋 30 微升之 100 微莫耳濃度 MIP-1 β 而製成；此擬案係在此檢測中傳輸最後濃度為 5 nM MIP-1 β) 進一步裝填，而板係使用 FLIPR 讀取一分鐘。待測物件相對於 0.4% DMSO/ 緩衝劑負對照組之拮抗劑活性係經測定。

可以趨化因子受體功能抑制劑治療之人類或其他物種之疾病或症狀，包括但不限於：炎性或過敏性疾病與症狀，包括呼吸過敏性疾病，譬如氣喘、過敏性鼻炎、過敏性肺

病、過敏性肺炎、嗜伊紅蜂窩纖炎(例如 Well 氏徵候簇)、嗜伊紅肺炎(例如 Loeffler 氏徵候簇、慢性嗜伊紅肺炎)、嗜伊紅筋膜炎(例如 Shulman 氏徵候簇)、延遲型過敏性、組織間隙肺臟疾病(ILD)(例如自發性肺纖維變性或與 ILD 有關聯之風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、關節黏連脊椎炎、系統硬化、Sjogren 氏徵候簇、多肌炎或皮肌炎)；全身過敏或過敏性回應、藥物過敏反應(例如對青霉素、頭孢菌素類)、由於攝食受污染色氨酸所致之嗜伊紅血球過多-肌痛徵候簇、昆蟲蟄傷過敏反應；自身免疫疾病，譬如風濕性關節炎、牛皮癬關節炎、多發性硬化、全身性紅斑狼瘡、重症肌無力、幼年開始型糖尿病；絲球體性腎炎、自身免疫橋本氏病、Behcet 氏疾病；移植排斥(例如在移植時)，包括同種移植排斥或移植物-對-宿主疾病；炎性腸疾病，譬如克隆氏病與潰瘍性結腸炎；脊椎關節病；硬皮病；牛皮癬(包括 T-細胞所媒介之牛皮癬)，與炎性皮膚病，譬如皮炎、濕疹、異位性皮炎、過敏性接觸性皮膚炎、蕁麻疹；脈管炎(例如壞死性、皮膚及過敏性脈管炎)；嗜伊紅肌炎、嗜伊紅筋膜炎；伴隨著皮膚或器官之白血球浸入之癌症。其中不想要之炎性回應欲被抑制之其他疾病或症狀，可經治療，其包括但不限於脈管炎、易受傷害斑、靜脈新血管內膜增生再灌注損傷、滲析-移植物新血管內膜增生、動脈-靜脈旁路血管內膜增生、動脈粥瘤硬化、某些血液學惡性病症、細胞活素所引致之毒性(例如敗血性休克、內毒素休克)、多肌炎、皮肌炎。人類或其他物種中可以趨化因子受體功能

抑制劑治療之傳染性疾病或症狀，包括但不限於 HIV。

可以趨化因子受體功能之抑制劑治療之人類或其他物種之疾病或症狀，包括但不限於：免疫壓抑，譬如在具有免疫不全徵候簇之個體中之免疫壓抑，譬如 AIDS 或其他病毒感染，進行放射療法、化學療法、關於自身免疫疾病之療法或藥物療法(例如皮質類固醇療法)之個體，以上療法會造成免疫壓抑；由於先天性缺乏受體功能或其他原因所致之免疫壓抑；及感染疾病，譬如寄生疾病，包括但不限於蠕蟲感染，譬如線蟲(圓形蟲)；(鞭蟲病、蟯蟲病、蛔蟲病、鉤蟲、類圓線蟲病、旋毛蟲病、絲蟲病)；吸蟲(血吸蟲)(血吸蟲病、分枝睪蟲病)、鰓蟲(帶蟲)(胞蟲病、肥胖鰓蟲病、囊蟲病)；內臟蠕蟲、內臟游走性幼蟲(例如弓蛔蟲屬)、嗜伊紅胃腸炎(例如異尖屬、Phocanema 屬)、皮膚游走性幼蟲(巴西鉤蟲、犬鉤蟲)。因此，本發明化合物可用於預防與治療極多種炎性、感染性及免疫調節病症與疾病。

此外，若吾人意欲傳輸足量化合物，經過引致趨化因子受體內部化作用，或以會造成細胞潛移之方向錯誤之方式傳輸化合物，以造成細胞上之受體表現之損失時，前述炎性、過敏性及自身免疫疾病之治療，亦可被涵蓋於趨化因子受體功能之促進劑中。

於另一方面，本發明可用以評估 G 蛋白質偶合受體之推斷專一催動劑或拮抗劑。本發明係針對利用此等化合物在關於會調節趨化因子受體活性之化合物之篩選檢測之製備與實施上。再者，本發明化合物可用於確立或測定其他化

合物對趨化因子受體之結合位置，例如在一檢測中藉由競爭性抑制或作為參考物，以將其已知活性與具有未知活性之化合物作比較。當發展出新檢測或擬案時，根據本發明之化合物可用以測試其有效性。明確言之，此種化合物可被提供於市售套件中，例如供使用於涉及前述疾病之醫藥研究上。本發明化合物亦可用於評估趨化因子受體之推斷專一調節劑。此外，吾人可利用本發明之化合物，以檢驗不被認為是趨化因子受體之G蛋白質偶合受體之專一性，無論是藉由充作不會結合化合物之實例，或作為在可幫助界定交互作用特定位置之受體上具有活性之化合物之結構變型。

於本文中所揭示之化合物可用以治療或預防病症，選自風濕性關節炎、骨關節炎、敗血性休克、動脈粥瘤硬化、動脈瘤、發熱、心血管作用、血液流動性休克、敗血病徵候簇、絕血再灌注後之傷害、瀦疾、克隆氏病、炎性腸疾病、分枝桿菌感染、腦膜炎、牛皮癬、鬱血性心衰竭、纖維變性疾病、惡病質、移植植物排斥、自身免疫疾病、皮膚炎性疾病、多發性硬化、輻射傷害、氣過多肺胞傷害、HIV、HIV癡呆症、非胰島素依賴性糖尿病、氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮炎、自發性肺纖維變性、大泡型類天疱瘡、蠕蟲寄生感染、過敏性結腸炎、濕疹、結合膜炎、移植、家族性嗜伊紅血球過多、嗜伊紅蜂窩纖炎、嗜伊紅肺炎、嗜伊紅筋膜炎、嗜伊紅胃腸炎、藥物引致之嗜伊紅血球過多、膽囊纖維變性、Churg-Strauss徵候簇、淋巴瘤、霍奇金(Hodgkin)

氏疾病、結腸癌、Felty 氏徵候簇、肉狀瘤病、葡萄膜炎、阿耳滋海默氏、絲球體性腎炎與系統性紅斑狼瘡、食管鱗狀細胞癌、神經病原性疼痛及肥胖。

於另一方面，該化合物可用以治療或預防炎性病症，選自風濕性關節炎、骨關節炎、動脈粥瘤硬化、動脈瘤、發熱、心血管作用、克隆氏病、炎性腸疾病、牛皮癬、鬱血性心衰竭、多發性硬化、自身免疫疾病、皮膚炎性疾病。

於另一方面，該化合物係用以治療或預防炎性病症，選自風濕性關節炎、骨關節炎、動脈粥瘤硬化、克隆氏病、炎性腸疾病及多發性硬化。

於另一方面，在本文中所揭示之實例可用於治療多種癌症，包括但不限於下述：

癌瘤，包括以下之癌瘤，膀胱(包括加速與轉移性膀胱癌)、乳房、結腸(包括結腸直腸癌)、腎臟、肝臟、肺臟(包括小與非小細胞肺癌及肺臟腺癌)、卵巢、前列腺、睪丸、尿生殖道、淋巴系統、直腸、喉、胰臟(包括外分泌胰癌)、食道、胃、膽囊、子宮頸、甲狀腺及皮膚(包括鱗狀細胞癌)；

淋巴樣血統之造血腫瘤，包括白血病、急性淋巴球白血病、急性淋巴胚細胞白血病、B-細胞淋巴瘤、T-細胞淋巴瘤、霍奇金(Hodgkin)氏淋巴瘤、非霍奇金(Hodgkin)氏淋巴瘤、有毛細胞淋巴瘤、組織胞淋巴瘤及Burketts淋巴瘤；

髓樣血統之造血腫瘤，包括急性與慢性骨髓性白血病、脊髓發育不良徵候簇、髓樣白血病及前骨髓細胞白血病；中樞與末梢神經系統之腫瘤，包括星細胞瘤、神經胚細

胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤；

間葉來源之腫瘤，包括纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及骨肉瘤；
以及

其他腫瘤，包括黑色素瘤、著色性乾皮病、角質棘皮瘤、
生殖細胞瘤、甲狀腺濾胞癌及畸胎癌。

於另一項具體實施例中，本文中所揭示者為治療癌症之方法，其中癌症係選自乳癌、肝癌、前列腺癌及黑色素瘤。此外，於本文中所揭示之化合物可用於治療卵巢癌與多發性骨髓瘤。

本發明係提供用於治療多種非癌性增生疾病之方法。

合併治療以預防與治療炎性、傳染性及免疫調節病症與疾病，包括氣喘與過敏性疾病，以及自身免疫病理學疾病，譬如風濕性關節炎與動脈粥瘤硬化，及上文所指出之病理學疾病，係藉由本發明化合物與其他已知供此種利用之化合物之組合作說明。例如，在發炎之治療或預防上，本發明化合物可併用消炎或止痛劑，譬如阿片製劑催動劑、脂肪氧化酶抑制劑、環氧化酶-2抑制劑、間白血球活素抑制劑（譬如間白血球活素-1抑制劑）、腫瘤壞死因子抑制劑、NMDA 拮抗劑、氧化氮之抑制劑或氧化氮合成之抑制劑、非類固醇消炎劑、磷酸二酯酶抑制劑或細胞活素抑制劑，例如併用以下化合物，譬如乙醯胺酚 (acetaminophen)、阿斯匹靈、可待因、芬塔諾 (fentanyl)、異丁苯丙酸 (ibuprofen)、吲哚美薩辛 (indomethacin)、酮洛拉克 (ketorolac)、嗎啡、那丙新 (naproxen)、非那西汀 (phenacetin)、吡oxicam (piroxicam)、類固

醇止痛劑、礦非塔尼 (sufentanyl)、山林達克 (sunlindac)、干擾素 α 等。同樣地，本發明化合物可伴隨以下藥物一起投藥，疼痛舒解劑；強化劑，譬如咖啡鹼、H₂-拮抗劑、聚二甲矽氧烷、氫氧化鋁或鎂；解除充血劑，譬如苯腎上腺素、苯丙醇胺、偽麻黃鹼、氨基美塔唑啉 (oxymetazoline)、麻黃鹼、萘唑啉 (naphazoline)、丁苄唑啉、氫化去氧麻黃鹼或左旋脫氫-麻黃鹼；及鎮咳藥，譬如可待因、二氫可待因酮、咳米芬 (caramiphen)、卡貝他戌烷 (carbetapentane) 或右旋美索芬 (dextromethorphan)；利尿劑；及鎮靜或非鎮靜抗組織胺藥。同樣地，於本文中所揭示之化合物可併用其他藥物，此藥物係用於治療/預防/抑制或改善本發明化合物對其有用之疾病或症狀。此種其他藥物可藉由其常用途徑及量，與本發明化合物同時或相繼地投藥。當化合物與一或多種其他藥物同時使用時，可使用除了本發明化合物以外含有此種其他藥物之醫藥組合物。因此，該醫藥組合物，係包括除了本發明揭示內容之化合物以外，亦含有一或多種其他活性成份者。

可與本發明化合物併用之其他活性成份之實例，無論是個別或在相同醫藥組合物中投藥，係包括但不限於：(a) 整合素拮抗劑，譬如供選擇素 ICAM 與 VLA-4 使用者；(b) 類固醇類，譬如貝可美塞松、甲基氫化潑尼松、 β -美塞松、潑尼松、地塞米松及氫基可體松；(c) 免疫抑制劑，譬如環孢素、塔可利馬斯 (tacrolimus)、雷帕霉素及其他 FK-506 型免疫抑制劑；(d) 抗組織胺類 (H₁-組織胺拮抗劑)，譬如溴吩尼拉

明 (bromopheniramine)、氯吩尼拉明 (chlorpheniramine)、地氯吩咐尼拉明 (dexchlorpheniramine)、三普利定 (triprolidine)、克列馬斯汀 (clemastine)、苯海拉明 (diphenhydramine)、二苯基吡拉林 (diphenylpyraline)、吡甲胺 (tripelennamine)、羟嗪 (hydroxyzine)、甲二拉啡 (methdilazine)、異丙嗪 (promethazine)、異丁啡 (trimeprazine)、氮塔丁 (azatadine)、西普洛庚汀 (cyproheptadine)、安他唑啉、吩咐尼拉明新安替根、阿斯特米唑 (astemizole)、特菲那定 (terfenadine)、羅拉他汀 (loratadin)、西替利啡 (cetirizine)、非克索吩咐拿定 (fexofenadine)、脫乙氧羧基羅拉他汀等；(e) 非類固醇抗氣喘劑，譬如 b₂-催動劑 (間羥特丁腎上腺素、間丙特瑞醇 (metaproterenol)、芬忒醇、新異丙腎上腺素、阿布特拉 (albuteral)、必托特醇 (bitolterol) 及吡丁特醇 (pirbuterol))、茶鹼、色甘酸鈉、阿托品、溴化依普拉挫品 (ipratropium bromide)、白三烯素拮抗劑 (雜呋路卡斯特 (zafirlukast)、蒙帖路卡斯特 (montelukast)、普朗路卡斯特 (pranlukast)、衣拉路卡斯特 (iralukast)、波畢路卡斯特 (pobilukast)、SKB-102,203)、白三烯素生物合成抑制劑 (吉留通 (zileuton)、BAY-1005)；(f) 非類固醇消炎劑 (NSAID)，譬如丙酸衍生物 (阿米諾丙吩咐、苯薩丙吩咐 (benzaprofen)、布可洛西酸、卡丙吩咐、聯苯丁酮酸、菲諾丙吩咐 (fenoprofen)、弗丙吩咐 (fluprofen)、氟雙丙吩咐、異丁苯丙酸 (ibuprofen)、吲哚丙吩咐 (indoprofen)、酮基丙吩咐 (ketoprofen)、米羅丙吩咐 (miroprofen)、那丙新 (naproxen)、噁普羅辛 (oxaprozin)、吡丙吩咐、普南丙吩咐 (pranoprofen)、蘇丙吩咐 (suprofen)、提普若吩咐克酸 (tiaprofenic acid) 及提奧丙吩咐)，醋酸衍生物 (吲哚美薩辛

(indomethacin)、阿謝美塔辛(acemetacin)、阿可洛吩咐拿克(alclofenac)、克利達拿克(clidanac)、二可吩咐拿克(diclofenac)、吩咐可吩咐拿克、氯苯噻唑乙酸、吩咐提查克(fentiazac)、氟若吩咐拿克、對異丁基苯乙酸、異克西百克(isoxepac)、嘅皮拿克(oxpinac)、沙林達克(sulindac)、提品拿克、四苯醯吡咯乙酸(tolmetin)、紀多美塔辛及周美皮克(zomepirac))，滅酸衍生物(氟滅酸、甲氯滅酸、甲滅酸、尼滅酸及甲苯滅酸)，聯苯基羧酸衍生物(二氟苯柳酸與氟吩咐尼索(flufenisal))，氧胺類(oxicams)(異氧胺(isoxicam)、吡氧胺(pioxicam)、蘇氧胺(sudoxicam)及天氧胺(tenoxicam))，柳酸酯類(乙醯柳酸、硫酸沙咁(sulfasalazine))，及吡唑嗪類(炎爽痛、芋間戊二烯酮、戊烯保泰松、莫非布塔宗(mofebutazone)、氨基苯基保泰松、苯基保泰松)；(g)環氧化酶-2(COX-2)抑制劑；(h)磷酸二酯酶型IV(PDE-IV)抑制劑；(i)趨化因子受體之其他拮抗劑；(j)膽固醇降低劑，譬如HMG-COA還原酶抑制劑(洛伐制菌素(lovastatin)、辛伐制菌素(simvastatin)及普拉伐制菌素(pravastatin)、弗伐制菌素(fluvastatin)、阿托伐制菌素(atorvastatin)及其他制菌素)，多價螯合劑(消膽胺與可列斯替保(colestipol))，尼可同(nicotinic)酸，非諾纖酸衍生物(傑非布洛吉(gemfibrozil)、可洛纖(clofibrate)、非諾纖酸酯(fenofibrate)及苯雜纖酸酯(benzafibrate))，及普洛布可(probucol)；(k)抗糖尿病劑，譬如胰島素、磺醯基脲類、雙縮脲(二甲雙胍)、 α -配醣酶抑制劑(阿卡糖(acarbose))及葛塔宗(glitazone)類(卓葛塔宗(troglitazone)與皮歐葛塔宗(pioglitazone))；(l)干擾素製劑(干擾素 α -2a、干擾

素-2B、干擾素 α -N3、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、干擾素 γ -1b); (m) 抗病毒化合物，譬如依發伯恩姿 (efavirenz)、聶伯拉平 (nevirapine)、因地那伯 (indinavir)、建西可洛伯 (ganciclovir)、拉米五定 (lamivudine)、發西可若伯 (famciclovir) 及佳西塔賓 (zalcitabine); (o) 其他化合物，譬如 5-氨基柳酸及其前體藥物，抗代謝物，譬如硝基脒唑硫嘌呤與 6-巯基嘌呤，及細胞毒性癌症化學治療劑。本發明化合物對第二種活性成份之重量比，可以改變，且係依各成份之有效劑量而定。

通常，係使用每一種之有效劑量。因此，例如，當本發明化合物與 NSAID 併用時，本發明化合物對 NSAID 之重量比，一般範圍係為約 1000: 1 至約 1: 1000，或者，從約 200: 1 至約 1: 200。本發明化合物與其他活性成份之組合，通常亦在前述範圍內，但在各情況中，應使用各活性成份之有效劑量。

在治療癌症上，化學治療劑及/或其他治療法(例如放射療法)之組合經常是有利的。第二種(或第三種)藥劑可具有與主要治療劑相同或不同之作用機制。採用細胞毒性藥物組合可為特別有用，其中被投予之兩種或多種藥物係以不同方式或在細胞循環之不同階段中發生作用，及/或其中兩種或多種藥物具有重疊毒性或副作用，及/或其中被合併之藥物在治療藉由病患所明示之特定疾病狀態上各具有經証實之功效。

因此，於本文中所揭示之化合物(或於本文中所揭示之其他化學式)可併用其他抗癌與細胞毒劑及可用於治療癌症

或其他增生疾病之治療法一起投藥。本文中之發明進一步包括本文中之化合物(或於本文中所揭示之其他化學式)於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於治療癌症，及/或其包括本文化合物與說明書一起之包裝，該說明書係指示化合物可併用其他抗癌或細胞毒劑及用於治療癌症之治療法。本發明係進一步包括化合物與一或多種其他藥劑之組合，呈套件形式，例如其中其係被包裝在一起，或置於欲被作為套件一起銷售之個別包裝中，或其中其係被包裝以被一起調配。

第二種(或多種)抗癌劑可選自下列之任一種或多種：

烷基化劑(包括氮芥末類、烷基礦酸鹽、亞硝基脲類、一氮參園衍生物及三氮烯類)；抗血管生成劑(包括間質金屬蛋白酶抑制劑)；抗代謝物(包括腺苷脫胺酶抑制劑、葉酸拮抗劑、嘌呤類似物及嘧啶類似物)；抗生素或抗體(包括單株抗體、CTLA-4 抗體、蔥環素)；芳香酶抑制劑；

細胞循環回應改變劑；酵素；法呢基蛋白質轉移酶抑制劑；

激素與抗激素劑及類固醇(包括合成類似物、類皮質糖、雌激素/抗雌激素劑[例如SERM]、雄激素/抗雄激素劑、黃體製劑、黃體酮受體催動劑及促黃體生成激素釋出[LHRH]催動劑與拮抗劑)；似胰島素生長因子(IGF)/似胰島素生長因子受體(IGFR)系統調節劑(包括IGFR1抑制劑)；整合素發出訊息抑制劑；激酶抑制劑(包括多激酶抑制劑及/或Src激酶或Src abl抑制劑、環素依賴性激酶[CDK]抑制劑、

panHer、Her-1 及 Her-2 抗體，VEGF 抑制劑，包括抗-VEGF 抗體，EGFR 抑制劑、有絲分裂原活化蛋白質 [MAP] 抑制劑、MEK 抑制劑、極光體激酶抑制劑、PDGF 抑制劑及其他酪胺酸激酶抑制劑或絲胺酸 / 蘇胺酸激酶抑制劑；

微管瓦解劑，譬如也天西定 (ecteinascidin) 或其類似物及衍生物；微管安定化劑，譬如紅豆杉烷類與天然生成之艾波希酮 (epothilone) 及其合成與半合成類似物；

微管結合、去安定化劑 (包括長春花植物鹼)；及
拓樸異構酶抑制劑；異戊烯基蛋白質轉移酶抑制劑；
鉑配位錯合物；訊息轉導抑制劑；及其他作為抗癌使用之藥劑，以及細胞毒劑，譬如生物回應改變劑、生長因子及免疫調節劑。

此外，本發明化合物可其他治療劑一起調配或共同投藥，該其他治療劑係經選擇，針對其在尋求解決與前述症狀有關聯副作用上之特定實用性。例如，本發明化合物可與數種藥劑一起調配，以預防惡心、過敏性及胃刺激，譬如止吐藥，及 H₁ 與 H₂ 抗組胺藥。

上述其他治療劑，當與本發明化合物合併採用時，可例如以醫師之桌上參考資料 (Physicians' Desk Reference) (PDR) 中所指示之量使用，或如一般熟諳此藝者以其他方式所測得者。

此等化合物係以治療上有效量投予哺乳動物。所謂 "治療上有效量"，係意謂本發明揭示內容之化合物當單獨或併用另一種治療劑對哺乳動物投藥時，有效預防或改善疾病狀態或疾病進展之量。

劑量與配方

本揭示內容之化合物可以口服劑量形式投藥，譬如片劑、膠囊(其每一個均包含持續釋出或按時釋出配方)、丸劑、粉末、顆粒、酏劑、酊劑、懸浮液、糖漿及乳化液。其亦可以靜脈內(大丸劑或灌注)、腹膜腔內、皮下或肌內形式投藥，全部均使用一般熟諳醫藥技藝者所習知之劑量形式。其可單獨投藥，但一般係與醫藥載劑一起投藥，根據所選定之投藥途徑及標準醫藥實務作選擇。

本發明化合物之劑量服用法，當然係依已知因素而改變，譬如特定藥劑之藥效特性及其投藥模式與途徑；接受者之物種、年齡、性別、健康狀況、醫療症狀及體重；病徵之性質與程度；共同治療之種類；治療頻率；投藥途徑，病患之腎與肝功能，及所要之作用。醫師或獸醫可決定及開立所需要藥物之有效量，以預防、抗衡或遏制病症之發展。

以下述作為一般指引，各活性成份之每日口服劑量，當用於所指示之作用時，其範圍係在約0.001至1000毫克/公斤體重之間，或在每天約0.01至100毫克/公斤體重之間，或者，在約1.0至20毫克/公斤/天之間。靜脈內方式之劑量，在恒定速率灌注期間，係從約1至約10毫克/公斤/分鐘。本發明化合物可以單一日服劑量投藥，或總日服劑量可以每日二、三或四次之分離劑量投藥。於一項具體實施例中，活性成份之每日口服劑量係在3與600毫克之間，無論是每日投藥一次，或以分離劑量每日投藥兩次。或者，活性成份

可以 10-20 毫克之劑量投予，每日投藥兩次，或以 40 至 100 毫克，每日投藥一次。或者，活性成份可一天兩次投予 12.5 毫克之劑量，或一天一次 75 毫克。或者，活性成份可以 3, 10, 30, 100, 300 及 600 毫克之劑量投予，一天投予無論是一次或兩次。

本發明化合物可以鼻內形式，經由局部使用適當鼻內媒劑，或經由經皮途徑，使用經皮之皮膚貼藥投藥。當以經皮傳輸系統形式投藥時，劑量投藥在整個劑量服用法中，當然是連續的，而非間歇性的。

此等化合物典型上係在與適當醫藥稀釋劑、賦形劑或載劑(於本文中總稱為醫藥載劑)混合下投藥，其係適當地針對所意欲之投藥形式作選擇，意即口服片劑、膠囊、酏劑、糖漿等，並與習用醫藥實務一致。

例如，對於呈片劑或膠囊形式之口服投藥而言，活性藥物成份可與口服、無毒性、藥學上可接受之惰性載劑合併，譬如乳糖、澱粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、磷酸二鈣、硫酸鈣、甘露醇、花楸醇等；對於呈液體形式之口服投藥而言，口服藥物成份可與任何口服、無毒性藥學上可接受之惰性載劑合併，譬如乙醇、甘油、水等。再者，當想要或必要時，亦可將適當黏合劑、潤滑劑、崩解劑及著色劑併入混合物中。適當黏合劑包括澱粉、明膠，天然糖類，譬如葡萄糖或 β -乳糖、玉米增甜劑，天然與合成膠質，譬如阿拉伯膠、西黃蓍樹膠或海藻酸鈉，羧甲基纖維素、聚乙二醇、蠟類等。在此等劑量形式中使用之潤

滑劑，包括油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、醋酸鈉、氯化鈉等。崩解劑係包括但不限於澱粉、甲基纖維素、瓊脂、膨土、三仙膠等。

本發明化合物亦可以脂質體傳輸系統形式投藥，譬如小單層狀泡囊、大單層狀泡囊及多層狀泡囊。脂質體可製自多種磷脂類，譬如膽固醇、硬脂基胺或磷脂醯膽鹼。

本發明化合物亦可與作為可成為標的藥物載體之可溶性聚合體偶合。此種聚合體可包括聚乙烯基四氫吡咯酮、哌喃共聚物、多羥基丙基甲基丙烯醯胺-酚、多羥基乙基天門冬胺醯胺酚或被棕櫚醯基殘基取代之聚氧化乙烯-聚離氨酸。再者，本發明化合物可偶合至可用於達成藥物受控釋出之生物可降解聚合體種類，例如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸與聚乙醇酸之共聚物、聚 ϵ -己內酯、聚羥丁酸、聚原酸酯、聚縮醛、聚二氫哌喃、聚氰基醯化物及水凝膠之經交聯或兩性嵌段共聚物。

適用於投藥之劑量形式(醫藥組合物)，每劑量單位可含有約1毫克至約100毫克活性成份。在此等醫藥組合物中，活性成份通常係以約0.5-95重量%之量存在，以組合物之總重量為基準。

明膠膠囊可含有活性成份與粉末狀載劑，譬如乳糖、澱粉、纖維素衍生物、硬脂酸鎂、硬脂酸等。可使用類似稀釋劑，以製造壓縮片劑。片劑與膠囊可被製成持續釋出產物，以提供藥物之連續釋出，歷經數小時期間。壓縮片劑可經糖塗覆或薄膜塗覆，以掩蓋任何令人不愉快之味道及

保護片劑隔離大氣，或經腸溶性物質塗覆，以在胃腸道中選擇性崩解。

供口服投藥之液體劑量形式，可含有著色與矯味劑，以增加病人接納性。

一般而言，水、適當油、鹽水、含水右旋糖(葡萄糖)及相關糖溶液，以及二醇類，譬如丙二醇或聚乙二醇，係為非經腸溶液用之適當載劑。供非經腸投藥用之溶液，可含有活性成份之水溶性鹽，適當安定劑，及若必要時使用之緩衝物質。抗氧化劑，譬如亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉或抗壞血酸，無論是單獨或合併，係為適當安定劑。亦使用者為檸檬酸及其鹽類，以及EDTA鈉。此外，非經腸溶液可含有防腐劑，譬如氯化芐烷氧銨、對羥基苯甲酸甲酯或丙酯及氯丁醇。

適當醫藥載劑係描述於*Remington氏醫藥科學*，Mack出版公司中，其係為此項領域中之標準參考書。

供本發明化合物投藥用之代表性有用醫藥劑量形式，可說明如下：

膠囊

大數目之單位膠囊可經由充填標準兩片式硬明膠膠囊而製成，各具有100毫克粉末狀活性成份、150毫克乳糖、50毫克纖維素及6毫克硬脂酸鎂。

軟明膠膠囊

可製備活性成份在可消化油譬如大豆油、棉籽油或橄欖油中之混合物，並利用正位移泵注入明膠中，以形成含有

100 毫克活性成份之軟明膠膠囊。此等膠囊應經洗滌並乾燥。

片劑

片劑可藉習用程序製成，因此劑量單位為 100 毫克活性成份、0.2 毫克膠態二氧化矽、5 毫克硬脂酸鎂、275 毫克微晶性纖維素、11 毫克澱粉及 98.8 毫克乳糖。可塗敷適當塗層，以增加可口性或延遲吸收。

可注射液

適合藉注射投藥之非經腸組合物可經由將 1.5 重量% 活性成份在 10 體積% 之丙二醇與水中攪拌而製成。溶液應以氯化鈉形成等滲性，及經滅菌。

懸浮液

可製備含水懸浮液以供口服投藥，因此各 5 毫升含有 100 毫克細分活性成份、200 毫克羧甲基纖維素鈉、5 毫克苯甲酸鈉、1.0 克花楸醇溶液(美國藥典)及 0.025 毫升香草醛。

在本發明化合物與例如其他抗凝血劑合併之情況中，日服劑量可為每千克病人體重約 0.1 至 100 毫克式 I 化合物，與約 1 至 7.5 毫克第二種抗凝血劑。對片劑劑量形式而言，本發明化合物一般可以每劑量單位約 5 至 10 毫克之量存在，而第二種抗凝血劑之量為每劑量單位約 1 至 5 毫克。

在兩種或多種前述第二種治療劑與實例之化合物一起投藥之情況中，通常各成份在一典型日服劑量與典型劑量形式中之量，相對於當該藥劑單獨投藥時之常用劑量，鑑於治療劑在組合投藥時之加成或增效作用，可被降低。

特別是當以單一劑量單位提供時，在所合併之活性成份之間，存有化學交互作用之可能性。因此，當實例之化合物與第二種治療劑合併在單一劑量單位中時，其係經調配，以致雖然將活性成份合併在單一劑量單位中，但活性成份間之物理接觸係被降至最低(意即減少)。例如，可將一種活性成份以腸溶性物質塗覆。藉由腸溶性塗覆其中一種活性成份，則不僅能夠使所合併活性成份間之接觸降至最低，而且能夠控制其中一種此等成份在胃腸道中釋出，以致使其中一種此等成份不會在胃中釋出，而是在腸中釋出。其中一種活性成份亦可塗覆一種物質，其會在整個胃腸道中達成持續釋出，且亦用以使所合併活性成份間之物理接觸降至最低。再者，此持續釋出成份可另外經腸溶性物質塗覆，以致使此成份之釋出僅發生於腸中。又另一種途徑係涉及組合產物之調配，其中係將一種成份塗覆持續及/或腸溶性釋出之聚合體，而另一種成份亦塗覆聚合體，譬如低黏度級羟丙甲基纖維素(HPMC)或如此項技藝中已知之其他適當物質，以進一步分隔活性成份。此聚合體塗層係用以形成對於與另一種成份交互作用之額外障壁。

使本發明組合產物成份間之接觸降至最低之此等以及其他方式，無論是以單一劑量形式投藥或以個別形式但同時藉由相同方式投藥，一旦明瞭本發明揭示內容後，均將為熟諳此藝者所立即明瞭的。

此外，於本文中所揭示之某些化合物可作為其他化合物之新陳代謝產物使用。因此，於一項具體實施例中，化合

物可無論是作為實質上純化合物使用，然後其亦可被併入醫藥組合物中，或可作為新陳代謝產物使用，其係於該化合物之前體藥物投藥後產生。於一項具體實施例中，化合物可經由使用於治療如本文中所述之病症，而作為新陳代謝產物使用。

於本文中使用之"實質上純"係意欲包括具有純度大於約90重量百分比之化合物，包括約90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99及100百分比。

以下述作為一項實例，於本文中所揭示之化合物可在具有純度大於約90百分比(重量比)下為實質上純，其中小於約10百分比之其餘物質包括化合物之其他新陳代謝產物，化合物之前體藥物，及/或由於其製備而發生之反應物及/或處理不純物。

顯然地，本發明之許多修正與變異，在明白上文陳述內容之後均為可能。因此，應明瞭的是，在隨文所附請求項之範疇內，本發明可按本文中所詳述，以其他方式實施。

活體內檢測與功效

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺(亦被稱為"實例1")係在下述活體內檢測中評估，如下文所述。

段落1. 在獮猴屬猴子中之皮內(ID) MCP-1 激發模式 方法

MCP-1之皮內注射會造成單核細胞之浸潤至注射位置。此模式最初係經發展，以評估CCR2拮抗劑對於單核細胞之浸

潤至以人類 MCP-1 所注射皮膚組織中之抑制作用。

如下文所述，使各猴子每日一次服用實例 1 或其媒劑對照物 (0.5% [w/v] 羥甲基纖維素)，歷經三天。於第 3 天服藥後，立即使所有動物接受至少 2 次 10 微克 (50 微升 / 注射) 人類 MCP-1 (R&D 系統) 之皮內注射，及至少 2 次其 DPBS 對照組 (50 微升 / 注射) 之皮內注射，在背側胸部上之個別位置處。所有位置之真皮切片檢查均在 MCP-1 (或 DPBS) 激發後大約 18 小時獲得。使切片檢查進行半定量組織學評估。皮膚試樣之代表性切片係藉由光學顯微鏡檢查法檢驗，注意微小損傷與細胞浸潤，並將其發生率以表列出。

在研究 1 中，係將實例 1 在 0, 6.5, 13 或 26 毫克 / 公斤之劑量下，以經口方式投予 3 隻獼猴屬猴子之組群 (每性別每組 1 或 2 隻)。在研究 2 中，純真動物係在 0-, 10- 或 30- 毫克 / 公斤劑量下，於 2 或 4 隻動物之組群 (對媒劑服藥組群，為 1 隻 / 性別；對實例 1- 服藥組群，為 2 隻 / 性別) 中，用以評估實例 1。

關於兩項研究，除了切片檢查分析以外，係收集血液，並評估全血液計數與細胞差別。亦評估血漿試樣之化合物濃度與血清試樣之系統炎性介體含量。

結果

在第一項研究中，MCP-1 所引致之單核細胞添補至經媒劑處理對照動物之皮膚係為 2.7 ± 0.3 (在 0 至 4 之規模下，表 13)。在 26 毫克 / 公斤下，實例 1 會抑制浸潤 (56%)。13 與 6.5 毫克 / 公斤之兩種較低劑量係達成較低程度之抑制。該化合物亦會抑制其他細胞類型之浸潤，譬如嗜伊紅細胞與嗜中性白

血球。化合物在 18 小時下之血漿濃度，及其與抑制程度及 Cyno 趨化性 IC90 值之關係，係摘錄於表 13 中。

使用兩種方法以在活體外趨化性檢測中測定實例 1 之抑制功效。第一種係採用猴子 PBMC，而第二種係使用以 Cyno CCR2 安定地轉染之 L1.2 細胞。已發現前者為高度地可變 (IC₅₀ = 5.5 ± 10 nM)，第二種係獲得較高平均值，但較一致 (IC₅₀ = 11.4 ± 8 nM)。以此第二個數值為基準，26 毫克/公斤劑量會在服藥後 18 小時下，造成自由血漿濃度為 2X 趨化性 IC90 (表 13)。

表 13

在獼猴屬猴子中實例 1 對於單核細胞及其他細胞類型回應
MCP-1 激發之浸潤之作用之摘述

劑量 (毫克/ 公斤)	自由 血漿濃度 (nM)	CTX IC90 ^a 倍數	CTX IC90 ^b 倍數	MNC 評分 (抑制%)	PMN 評分	Eos 評分	總細胞 評分
0	0	0	0	2.7 ± 0.3 (0%)	0.8 ± 0.3	1.83 ± 0.3	5.3 ± 0.6
6.5	53	1.8	0.5	2.2 ± 0.6 (19%)	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.8	4.3 ± 1.6
13	101	3.4	0.9	2.2 ± 0.3 (19%)	0.7 ± 0.3	1.2 ± 0.6	4.0 ± 0.5
26	238	7.9	2.2	1.2 ± 0.6 (56%)	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0	1.8 ± 0.8

^a 獼猴屬 PBMC 為基礎之趨化性

^b 使用安定地表現獼猴屬 CCR2 之 L1.2 細胞之趨化性

第二項研究係在純真猴子中進行。與第一項研究作比較，實例 1 係在 30 毫克/公斤 (高劑量) 下，抑制單核細胞浸潤達較大程度 (91%)，而在 10 毫克/公斤下獲得 87% 之抑制 (表 14)。

表 14

在獼猴屬猴子中實例 1 對於單核細胞及其他細胞類型回應

MCP-1 激發之浸潤之作用之摘述

劑量 (毫克/ 公斤)	自由 血漿濃度 (nM)	CTX IC90 ^a 倍數	CTX IC90 ^b 倍數	MNC 評分 (inh%)	PMN 評分	Eos 評分	總細胞 評分
0	0	0	0	1.5(0%)	1.3	0.4	3.2
10	34	1.1	0.37	0.2±0.2 (87%)	0	0.3±0.1	0.5±0.2
30	83	2.8	0.91	0.1±0.3 (91%)	0.1±0.3	0.6±0.7	0.8±0.8

^a 獼猴屬 PBMC 為基礎之趨化性檢測

^b 使用安定地表現獼猴屬 CCR2 之 L1.2 細胞之趨化性檢測

在兩項研究中，血清炎性介體上變化之評估，係顯示在實例 1-經治療組中，相對於媒劑對照組，於 MCP-1 含量上之增加 (~3 倍)。此外，全血液計數 (CBC) 分析顯示在實例 1-經治療組中，相對於媒劑對照組，於嗜中性白血球上之增加 (~3 倍)。

進行 hCCR2 KI 老鼠研究，以在使用細胞差別計數為基礎與流動細胞計數為基礎之操作法之疏基乙酸酯 (TG) 腹膜炎模式中，評估實例 1 對單細胞 / 巨噬細胞浸潤之作用。

段落 2. 人類 CCR2 加入 (hCCR2 KI) 老鼠之特徵鑑定方法

hCCR2 KI 老鼠係經由以人類 CCR2 編碼順序置換老鼠 CCR2 基因，以基因方式設計。老鼠係得自 California San Francisco 大學之 Gladstone 心血管疾病研究所。

標準 PCR (基因專一與定量) 方法係用以區別野生型 (老

鼠CCR2基因)與標的對偶基因(人類CCR2基因)，並以耳部或尾部試樣，測定人類CCR2基因複本數目與老鼠CCR2基因複本數目。亦進行經單離自血液白血球之總RNA之RT-PCR分析，以測定人類與老鼠CCR2 mRNA之表現程度。流動細胞計數分析係用以測定人類或老鼠CCR2蛋白質於血液單細胞上之表面表現。在TG-所引致之腹膜炎模式中，單細胞/巨噬細胞蓄積於腹膜腔中之FACS分析(參閱段落3)，係用以測定人類CCR2在此等老鼠中之功能性。

結果

hCCR2 KI老鼠係經由以人類CCR2編碼順序置換老鼠CCR2基因，以基因方式設計。在使用此等動物於實例1之活體內評估之前，係進行此等老鼠之兩種基因型與表現型特徵鑑定。耳部或尾部試樣之PCR為基礎之基因型研究(基因專一與定量)，係偵測出人類CCR2基因之兩份複本與不同量之PCR產物，這指出老鼠CCR2基因之0至2份複本之存在。使用從此等KI老鼠之血液白血球所單離之全部細胞RNA，相對定量RT-PCR分析係偵測出人類CCR2 mRNA與最低限度含量之PCR產物，使用經設計以偵測老鼠CCR2 mRNA之引物組。當在CCR2 KI老鼠，人類CCR2，而非老鼠CCR2中，使用流動細胞計數分析以偵測蛋白質表現時，表面蛋白質係經由個別以專一抗-人類CCR2與抗-老鼠CCR2抗體使全血液細胞單離物染色而被檢出。

hCCR2-選擇性拮抗劑會在此等hCCR2 KI老鼠中，但不在野生型老鼠中，阻斷單細胞浸潤，當血漿穩定狀態含量涵蓋

人類 CCR2 趨化性之 IC₉₀，但低於為抑制老鼠 CCR2 趨化性所需要之含量時。再者，於模擬 hCCR2 KI 環境(老鼠 MCP-1/人類 CCR2)之活體外檢測中，實例 1 會抑制老鼠 MCP-1 結合至表現 hPBMC 之人類 CCR2 ($IC_{50} = 2.2 \pm 1.2 \text{ nM}$)，及 5THP-1 細胞之老鼠 MCP-1-所引致/人類 CCR2 所媒介之趨化性 ($IC_{50} = 0.6 \pm 0.3 \text{ nM}$)。

段落 3. 在 hCCR2 KI 老鼠中之 48-小時疏基乙酸酯(TG)-所引致之腹膜炎模式

(方法

將 hCCR2 KI 老鼠 (C57BL/6-SVJ129) 以腹膜腔內方式注射 1 毫升疏基乙酸酯 (TG) (Hardy Diagnostics)。對於各研究，係使用每組八隻雄性老鼠。在 TG 注射前 1 小時，以口服方式服用實例 1。所使用之媒介為水中之 0.01N HCl。TG 注射後四十八小時，腹膜灌洗係藉由注射 5 毫升 PBS/10 mM EDTA/10% BSA 至腹膜腔中進行。

關於 48-小時 TG 腹膜炎研究，係一天兩次服用實例 1，其中第一次服用係在 TG 注射前一小時。總腹膜細胞計數係在經單離之細胞上，藉由細胞計數器獲得。進行細胞旋轉以測定差別白血球計數。將細胞以 Wright-Giemsa 染料 (Sigma-Aldrich) 染色 3 分鐘，然後以去離子水沖洗 5 分鐘。差別計數係以每試樣所計數之總共 200 個細胞為基準計算而得。於各研究結束時，自後眶竇收集血液於 EDTA 中，以測定藥物濃度。

關於流動細胞計數分析，係將腹膜滲出物細胞 (1×10^6) 以

FACS 緩衝劑 (PBS/0.5% BSA) 洗滌一次，並再懸浮於 FACS 緩衝劑中。使細胞在冰上以 Fc-阻斷抗體 (BD Pharmingen) 培養 15 分鐘，接著添加下列抗體 (BD Pharmingen): PE 共軛抗 -F4/80、FITC 共軛抗 -Ly6c 及 Alexa 647 共軛抗 -hCCR2。在冰上 45 分鐘後，使細胞在冰上藉由 BD Cytofix 固定，歷經 15 分鐘，以 FACS 緩衝劑洗滌兩次，並再懸浮於 200 微升 FACS 緩衝劑中。對於各試樣獲得細胞事件 (40,000)，且數據係使用 FloJo 軟體 (TreeStar) 分析。設定 FSC/SSC 閘門，以包含所有單細胞 (低 SSC，較高 FSC)，同時將粒性細胞排除於分析之外。然後，將此選通之個體群分析 Ly6C (FITC)、F4/80 (PE) 表現。腹膜單細胞 / 巨噬細胞數目係以下述方式測定，將藉由細胞計數器所獲得之總腹膜細胞計數，與藉由得自流動細胞計數之 $F4/80^+$ 細胞所確認單細胞 / 巨噬細胞之百分比相乘。平均值間差異之統計意義係使用配對二尾式 t 試驗法分析，具有被設定在 P 值低於 0.05 下之意義。

結果

實例 1 係在 hCCR2 KI 老鼠 TG 腹膜炎模式中評估，以測定其在抑制單細胞 / 巨噬細胞浸潤上之 EC₅₀。老鼠係被投予疏基乙酸酯，且在 1, 5 或 25 毫克 / 公斤下每天兩次 (BID) 經口服用實例 1。TG 治療後四十八小時，獲得腹膜灌洗物，以供細胞浸潤分析。實例 1 顯示藉由細胞計數器所獲得總腹膜白血球數目之劑量依賴性降低 (圖 15)。以藉由灌洗物試樣形態學評估之差別白血球計數為基準，實例 1 係証實單細胞 / 巨噬細胞流入量之劑量依賴性抑制。1, 5, 25 毫克 / 公斤之劑

量係個別獲得 20%, 62% 及 69% 之抑制。統計學上有意義之抑制係在 5 與 25 毫克 / 公斤下達成 (圖 15)。在兩項個別研究中，關於抑制單細胞 / 巨噬細胞浸潤之平均 EC50 係被估計為 $3.0 \pm 0.9 \text{ nM}$ 。

經添補之單細胞 / 巨噬細胞浸潤物亦藉由流動細胞計數法定量。為區別經添補之單細胞 / 巨噬細胞對留置之巨噬細胞與粒性細胞，故 F4/80 與 Ly6C 單細胞 / 巨噬細胞表面標記物之染色，係用以界定經添補之單細胞 / 巨噬細胞。藉此方法發現單細胞 / 巨噬細胞浸潤上之類似劑量依賴性抑制，其中全部三種劑量均顯示統計學上有意義之抑制 (圖 16)。1, 5, 25 毫克 / 公斤之劑量係個別獲得 38%, 71% 及 86% 之抑制。在兩項個別研究中，關於抑制單細胞 / 巨噬細胞浸潤，藉此分析之平均 EC50 係被估計為 $2.2 \pm 0.5 \text{ nM}$ 。

為在 48 小時疏基乙酸酯腹膜炎模式中，使用 hCCR2 加入之老鼠，藉由實例 1 評估受體佔領之活體內含量，故度量實例 1 與老鼠 CCR2 配位體 MCP-1 兩者之血漿含量。對於此評估要注意的是，僅 CCR2 及其主要配位體 MCP-1 被納入考量。於競爭性抑制劑存在下，配位體之受體佔領係藉由 Gaddum 方程式界定：

$$\frac{[RL]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

由於實例 1 為 MCP-1 結合至 CCR2 之競爭性抑制劑，故老鼠 MCP-1/CCR2 受體複合物與實例 1/CCR2 受體複合物兩者之量可使用老鼠 MCP-1 與蛋白質 - 未結合實例 1 兩者在血漿中之

血清含量測得。老鼠 MCP-1 結合至 hCCR2 之 K_d 為 0.91 ± 0.08 nM ($n=8$)，其係在冷競爭配位體結合實驗中，使用 ^{125}I -人類 MCP-1 測得。實例 1 結合至 hCCR2 之平均 K_i 為 1.2 nM。老鼠 MCP-1/CCR2 受體複合物之分率係使用上述方程式之形式測定。為測定實例 1/CCR2 複合物之分率，該方程式係被再定義為：

$$\frac{[\text{RI}]}{[\text{R}]} = \frac{1}{1 + (\text{K}_i / [\text{I}]) (1 + [\text{L}] / \text{K}_d)}$$

最後，不含 CCR2 之量係測定自：

$$[\text{CCR2}]_{\text{總計}} = [\text{CCR2}]_{\text{不含}} + [\text{老鼠 MCP-1/CCR2}] + [\text{實例 1/CCR2}]$$

如表 15 中所示，在 48 小時下單細胞/巨噬細胞浸潤至腹膜中之抑制百分比，係反映出實例 1/CCR2 受體複合物之百分比（實例 1 所佔據之 CCR2）。

表 15

在 48-小時 TG 腹膜炎模式中，活體內受體佔領在 hCCR2 KI

老鼠之血液中之測定

劑量 (毫克/ 公斤)	血漿中 老鼠 MCP-1 之 濃度(nM)	血漿中 自由態 實例 1 之 濃度(nM) (IC90 CCR2 結合 倍數)	% 老鼠 MCP-1 結 合之CCR2	實例 1- 結合 CCR2 之 %	% 自由態 CCR2	單細胞/ 巨噬細胞 浸潤之% 抑制 ^a
25	0.041	24(1.4)	0.2	95.0	4.8	86
5	0.043	4(0.2)	1.1	76.1	22.8	71
1	0.027	1(0.05)	1.6	44.7	53.7	38
0(媒劑)	0.03	0	3.2	0	96.8	0

^a 總單細胞/巨噬細胞之 FACS 為基礎之分析

段落 4. 慢性功效研究

方法

為研究實例 1 對 EAE (實驗自身免疫腦脊髓炎) 之作用，故使用多發性硬化之模式，每組 10 隻老鼠。於第 0 天，使 hCCR2 KI 老鼠以總共 200 微升在不完全 Freund 氏佐劑 (IFA) (Sigma-Aldrich) 中之 300 微克髓磷脂寡樹突膠質細胞糖蛋白 (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis)，以 1：1 與 300 微克結核分枝桿菌 (H37Ra) (Becton-Dickinson) 混合，以皮下方式免疫。於第 0 天 (免疫作用後兩小時) 與第 2 天，將老鼠以腹膜腔內方式注射 100 微升之 400 毫微克百日咳毒素。於第 10 天開始臨床記分，在整個研究中每週持續三次，且以 0-5 之尺度為基礎：0，沒有疾病跡象；0.5，部份尾部虛弱；1，下垂尾或搖擺步態與尾部緊張性；1.5，搖擺步態與尾部虛弱；2，搖擺步態與下垂尾 (失調)；2.5 (失調與部份肢體癱瘓)；3，一個肢體完全癱瘓；3.5，一個肢體之完全癱瘓與第二個肢體之部份癱瘓；4，兩個肢體之完全癱瘓；4.5，垂死；5，死亡。在 55 毫克 / 公斤下口服實例 1 (每天兩次) 係於第 1 天起始。

結果

在所進行三項研究之兩項中，實例 1 係顯著地降低臨床評分 ($p < 0.05$) (圖 17)。對於實例 1，在 ^{125}I -老鼠 MCP-1 結合至 hCCR2-表現細胞、hPBMC (模擬 hCCR2 KI 環境) 上，IC₅₀ 為 2.2 nM。以此 IC₅₀ 值為基準，55 毫克 / 公斤劑量會造成自由血漿峰谷濃度為結合 IC₉₀ 之~2-倍。於第 22 天，脊髓之組織學評估，在以實例 1 對媒劑所治療老鼠之間，並未証實總炎性細

胞浸潤上之顯著差異。顯著嗜中性白血球浸潤係被發現於以化合物治療之老鼠中。

【圖式簡單說明】

圖 1 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 2 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 N-2 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 3 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 E-1 (單-乙醇化物) 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 4 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，HCl 鹽，型式 H4-1 (四水合物) 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 5 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 A-1 (單-丙酮溶劑合物) 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 6 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 DC-1 (單-二氯甲烷溶劑合物) 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 7 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 AN-3 (單-乙腈溶劑合物) 之實驗與模擬粉末圖樣。

圖 8 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 之示差掃描卡計法分析。

圖 9 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 之熱重分析。

圖 10 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 N-2 之示差掃描卡計法分析。

圖 11 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 N-2 之熱重分析。

圖 12 係揭示 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態鹼，型式 N-2 之水份吸著等溫線。

圖 13 係揭示 (1R,3R,4S)-3-乙醯胺基-4-((S)-3-(芋氨酸基胺基)-2-酮基四氫吡咯-1-基)環己基胺基甲酸第三-丁酯之 X-射線晶體結構。

圖 14 在 hCCR2 KI 老鼠中之 48 小時 TG 腹膜炎模式：單細胞 / 巨噬細胞浸潤至腹膜腔中之實例 1 抑制 (差別細胞計數)。

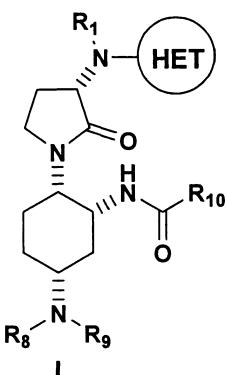
200823203

圖 15 在 hCCR2 KI 老鼠中之 48 小時 TG 腹膜炎模式：單細胞 /
巨噬細胞浸潤至腹膜腔中之實例 1 抑制 (FACS 分析)。

圖 16 在 hCCR2 KI 老鼠中之 EAE：實例 1 治療之臨床評分。

五、中文發明摘要：

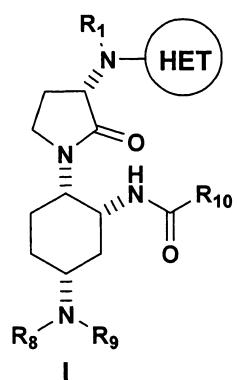
本發明係提供 MCP-1 受體活性之新穎拮抗劑或部份催動劑 / 拮抗劑：N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，或其藥學上可接受之鹽、溶劑合物或前體藥物，具有所要藥理學特性之令人意外組合。亦提供本發明之結晶型。含有彼等之醫藥組合物，及使用彼等作為藥劑以治療炎性疾病、過敏性、自身免疫、代謝、癌症及/或心血管疾病之方法，亦為本發明之目的。本揭示內容亦提供製備式(I)化合物之方法，該化合物包括 N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)氨基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基氨基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺：



其中 R^1 , R^8 , R^9 , R^{10} 及 HET 均如本文中所述。本文亦提供一些化合物，其係為此方法之有用中間物。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a novel antagonist or partial agonists/antagonists of MCP-1 receptor activity: N-((1R,2S,5R)-5-(isopropyl(methyl)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug, thereof, having an unexpected combination of desirable pharmacological characteristics. Crystalline forms of the present invention are also provided. Pharmaceutical compositions containing the same and methods of using the same as agents for the treatment of inflammatory diseases, allergic, autoimmune, metabolic, cancer and/or cardiovascular diseases is also an objective of this invention. The present disclosure also provides a process for preparing compounds of Formula (I), including N-((1R,2S,5R)-5-(isopropyl(methyl)amino)-2-((S)-2-oxo-3-(6-(trifluoromethyl)quinazolin-4-ylamino)pyrrolidin-1-yl)cyclohexyl)acetamide:



wherein R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰, and HET are as described herein. Compounds that are useful intermediates of the process are also provided herein.

十、申請專利範圍：

1. 一種化合物，N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，或其藥學上可接受之鹽。
2. 如請求項1之化合物，其係為N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)喹唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺或其藥學上可接受鹽之結晶型。
3. 如請求項2之化合物，其中結晶型包括N-2型式。
4. 如請求項3之化合物，其中結晶型之特徵為實質上等於下列之單位晶胞參數：

晶胞尺寸：

$$a = 11.8427(3)$$

$$b = 18.1503(7)$$

$$c = 12.7923(4)$$

$$\alpha = 90$$

$$\beta = 105.362(2)$$

$$\gamma = 90$$

空間群 P2₁

分子/單位晶胞2

其中該晶體係在約+22°C之溫度下。

5. 如請求項3之化合物，其中結晶型之特徵為包含三個或更多個2θ值(CuKαλ = 1.541 Å)之粉末x-射線繞射圖樣，該2θ值係選自7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2及18.8，在約22°C之溫度下。

6. 如請求項5之化合物，其中結晶型之進一步特徵為包含四個或多個 2θ 值($\text{CuK}\alpha\lambda = 1.541 \text{\AA}$)之粉末x-射線繞射圖樣，該 2θ 值選自包括7.2, 8.7, 9.7, 12.5, 12.8, 13.3, 16.0, 16.6, 18.2及18.8，在約 22°C 之溫度下。
7. 如請求項3之化合物，其中結晶型之特徵為實質上如列示於表7中之部份原子座標。
8. 如請求項3之化合物，其中結晶型係具有實質上根據圖2之粉末x射線繞射圖樣。
9. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之化合物與藥學上可接受之載劑或稀釋劑。
10. 一種如請求項1之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於治療哺乳動物中之疾病，其中疾病係選自糖尿病、肥胖、代謝徵候簇、中風、神經病原性疼痛、絕血性心肌病、牛皮癬、高血壓、硬皮病、骨關節炎、動脈瘤、發熱、心血管疾病、克隆氏病、鬱血性心衰竭、自身免疫疾病、HIV感染、與HIV有關聯之癡呆症、牛皮癬、自發性肺纖維變性、移植物動脈硬化、物理上或化學上引致之腦部創傷、炎性腸疾病、肺胞炎、結腸炎、系統性紅斑狼瘡、毒腎血清腎炎、絲球體性腎炎、氣喘、多發性硬化、動脈粥瘤硬化、脈管炎、易受傷害斑、風濕性關節炎、再狹窄、靜脈新血管內膜增生、滲析-移植物新血管內膜增生、動脈-靜脈旁路血管內膜增生、器官移植、慢性同種移植腎病及癌症。
11. 如請求項10之用途，其中疾病係選自糖尿病、肥胖、克隆

氏病、系統性紅斑狼瘡、絲球體性腎炎、多發性硬化、動脈粥瘤硬化、再狹窄及器官移植。

12. 如請求項11之用途，其中疾病係選自多發性硬化、動脈粥瘤硬化、克隆氏病及糖尿病。

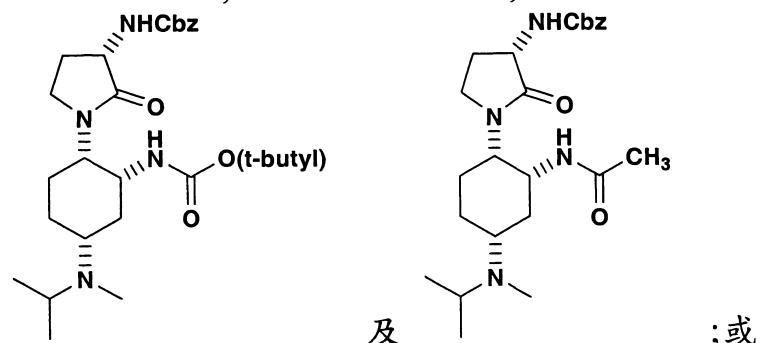
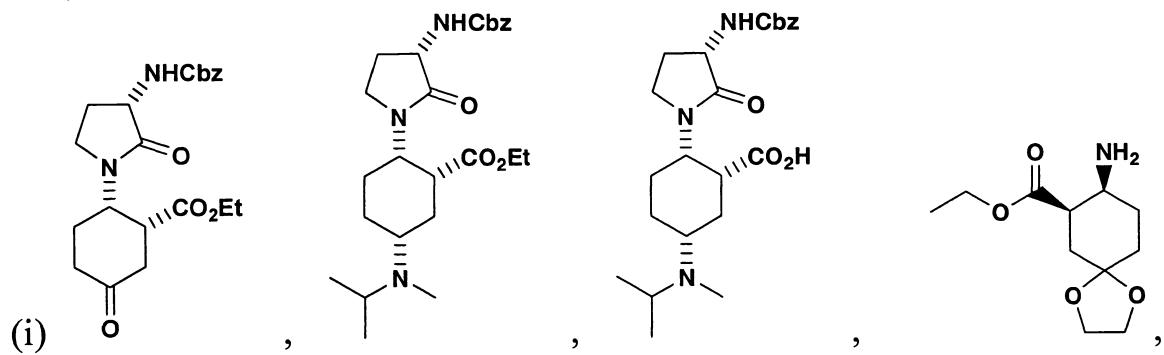
13. 如請求項12之用途，其中疾病為糖尿病。

14. 如請求項12之用途，其中疾病為動脈粥瘤硬化。

15. 如請求項12之用途，其中疾病為克隆氏病。

16. 如請求項12之用途，其中疾病為多發性硬化。

(i) 17. 一種化合物，其係選自



及 ; 或

(ii) 其(i)之鹽。

十一、圖式：

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 (實例 2a) 之實驗與模擬粉末圖樣

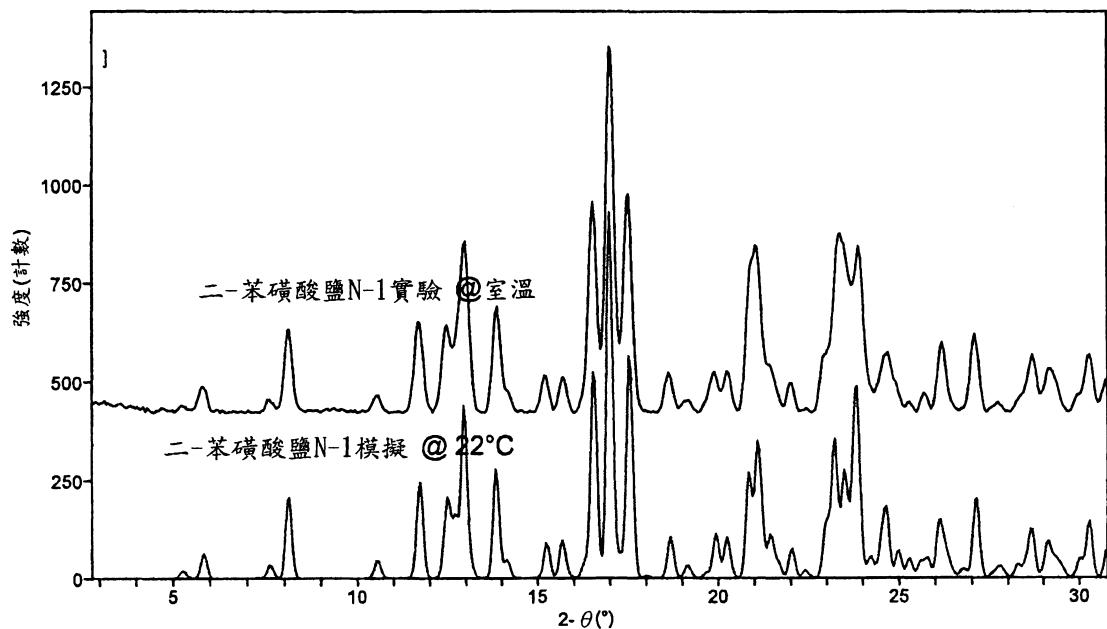


圖 1

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，自由態
鹼，型式 N-2 (實例 2f) 之實驗與模擬粉末圖樣

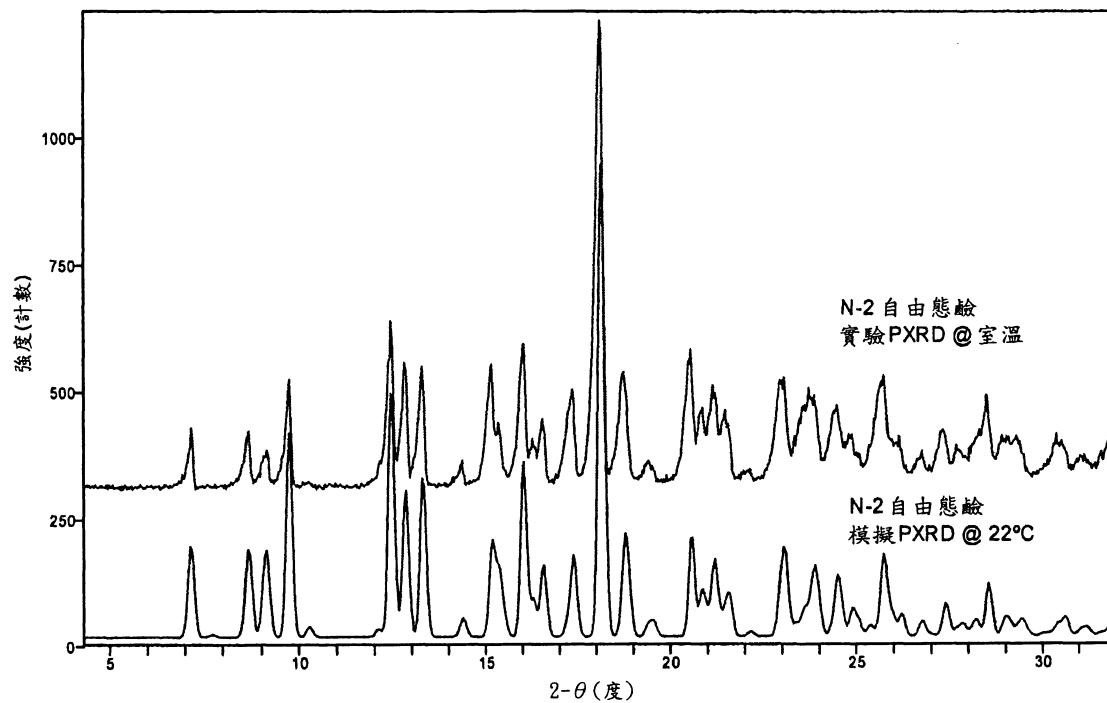


圖 2

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，自由態鹼，型式E-1(單-乙醇化物)(實例2d)之實驗與模擬粉末圖樣

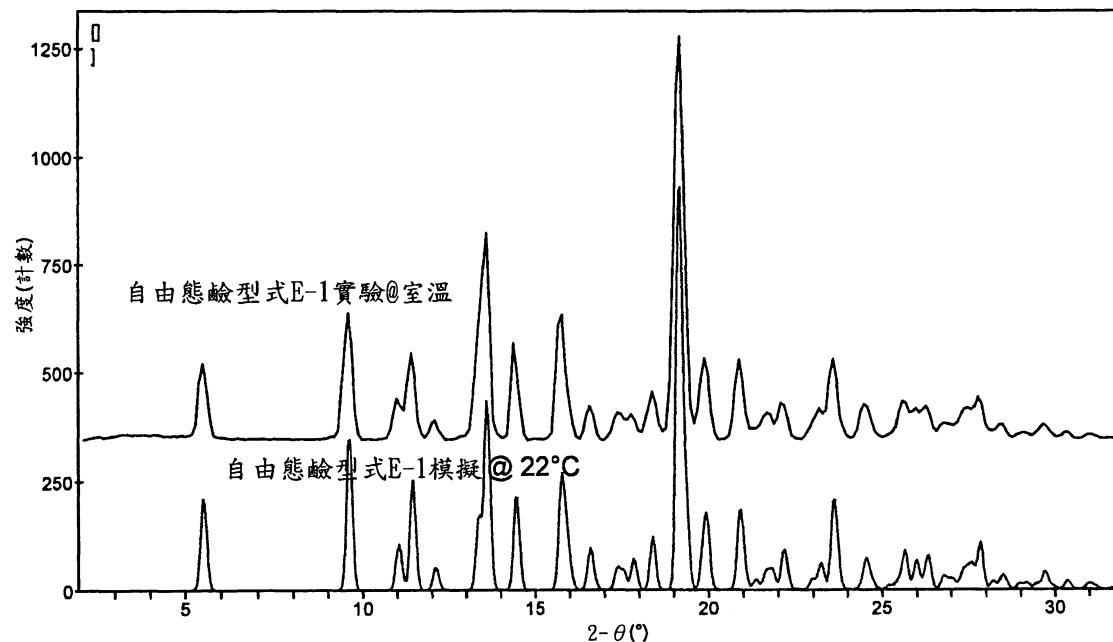


圖 3

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，HCl鹽，
型式 H4-1 (四水合物)(實例 2h)之實驗與模擬粉末圖樣

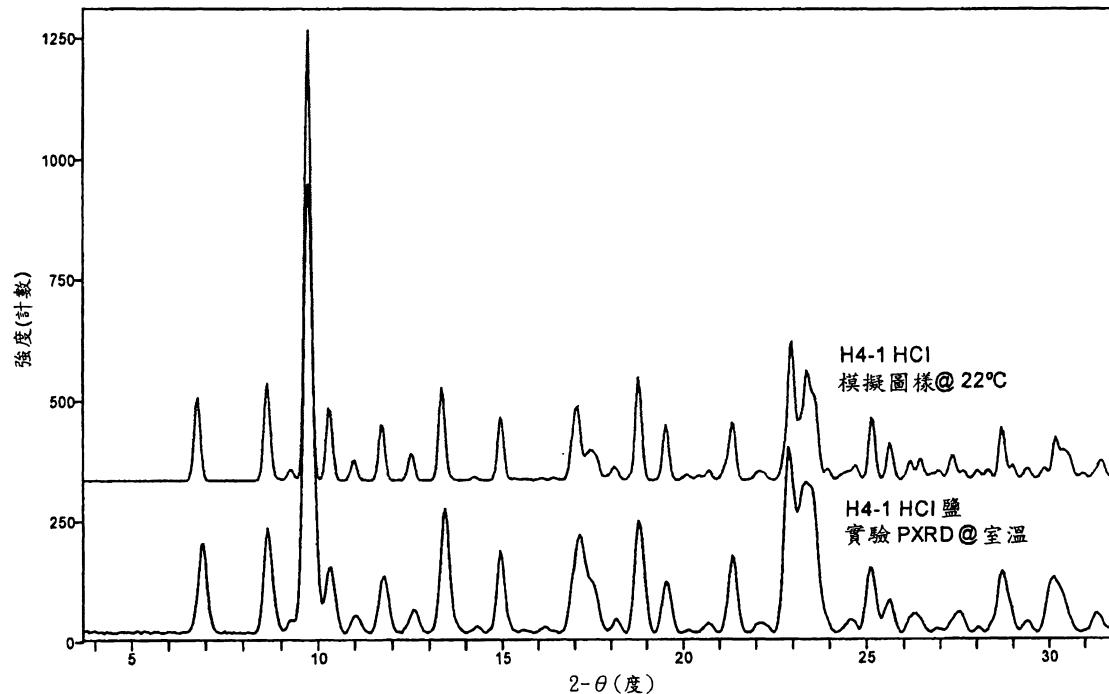


圖 4

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，
自由態鹼，型式 A-1 (單-丙酮溶劑合物)(實例 2e) 之實驗與
模擬粉末圖樣

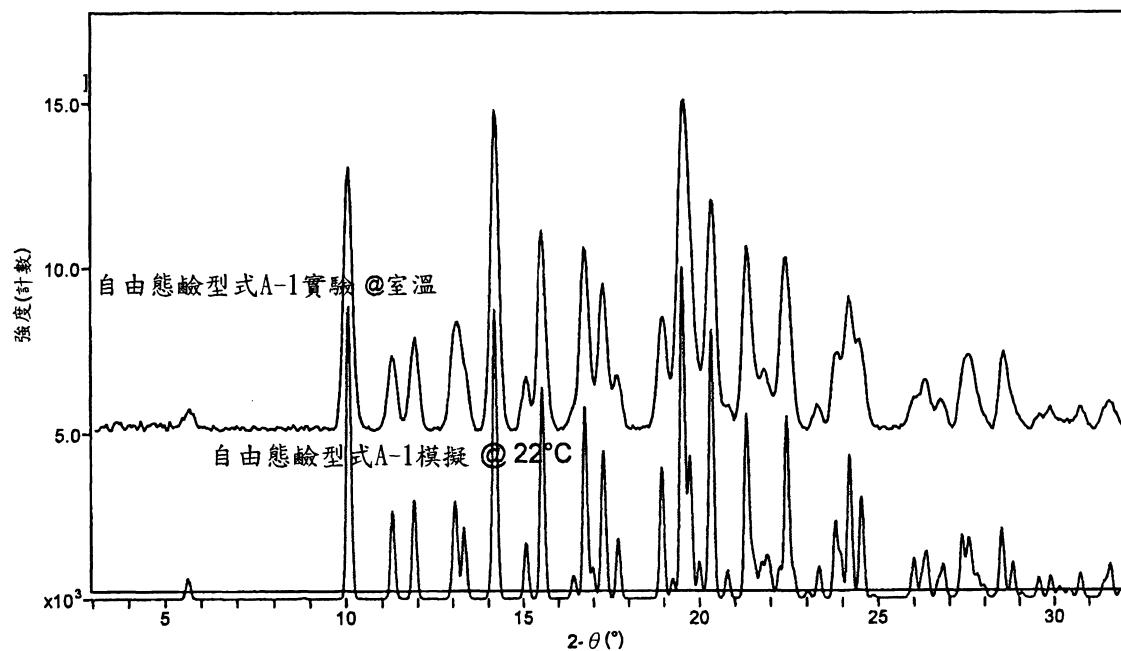


圖 5

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，自由態
鹼，型式DC-1(單-二氯甲烷溶劑合物)(實例2b)之實驗與模
擬粉末圖樣

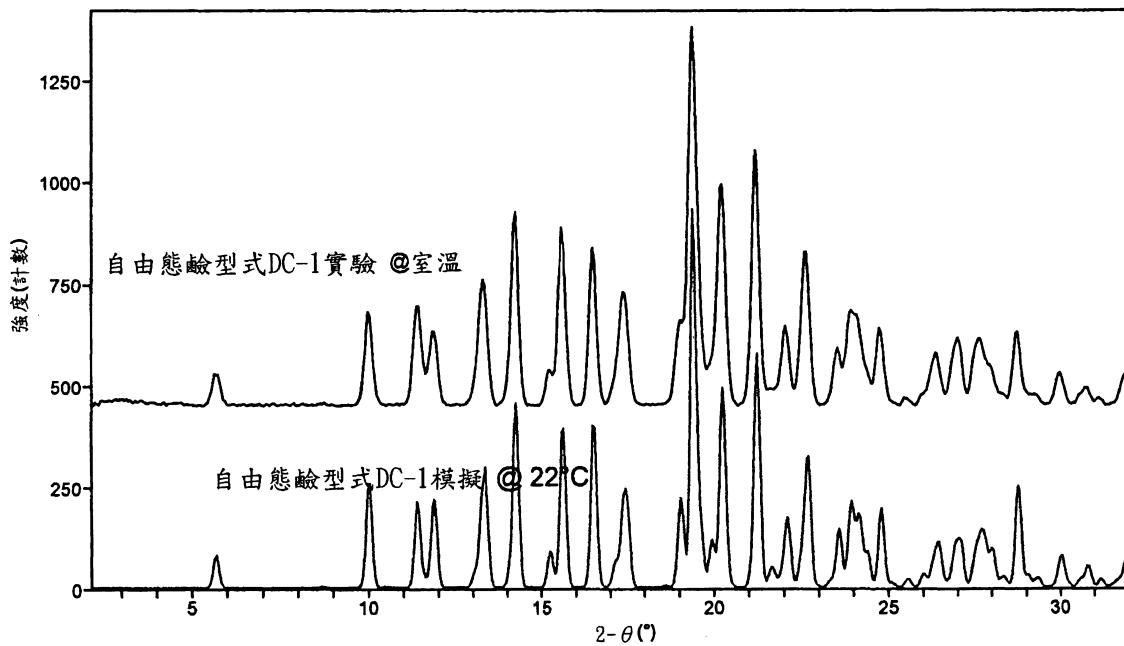


圖 6

200823203

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，
自由態鹼，型式 AN-3 (單-乙腈溶劑合物)(實例 2g)之實驗與
模擬粉末圖樣

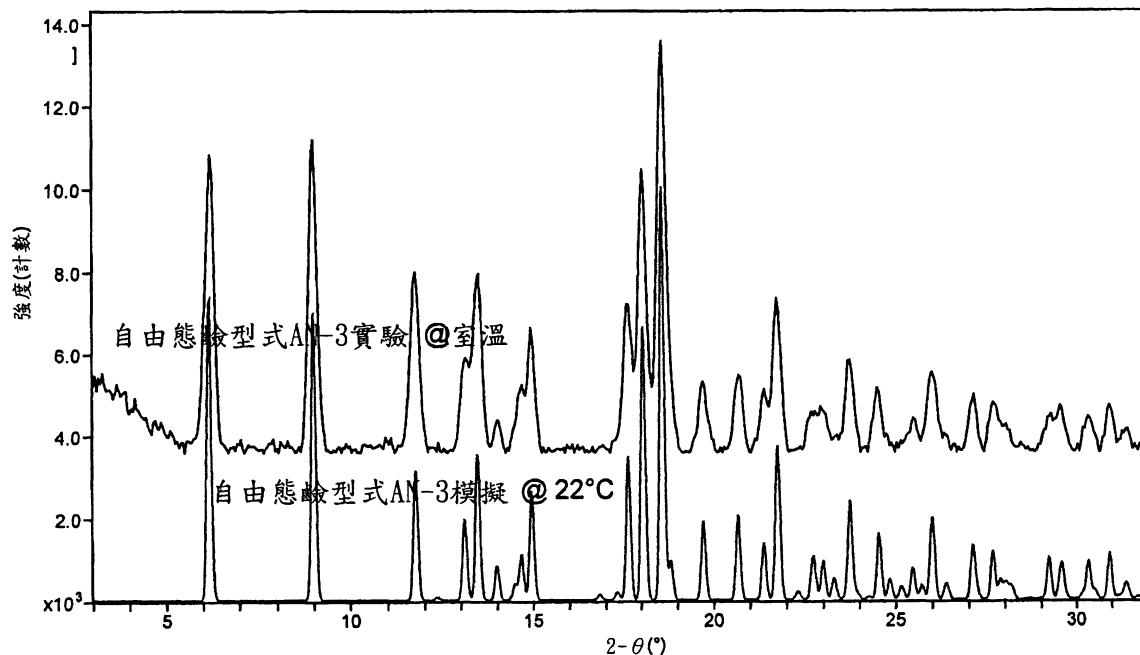


圖 7

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 (實例 2a) 之 DSC

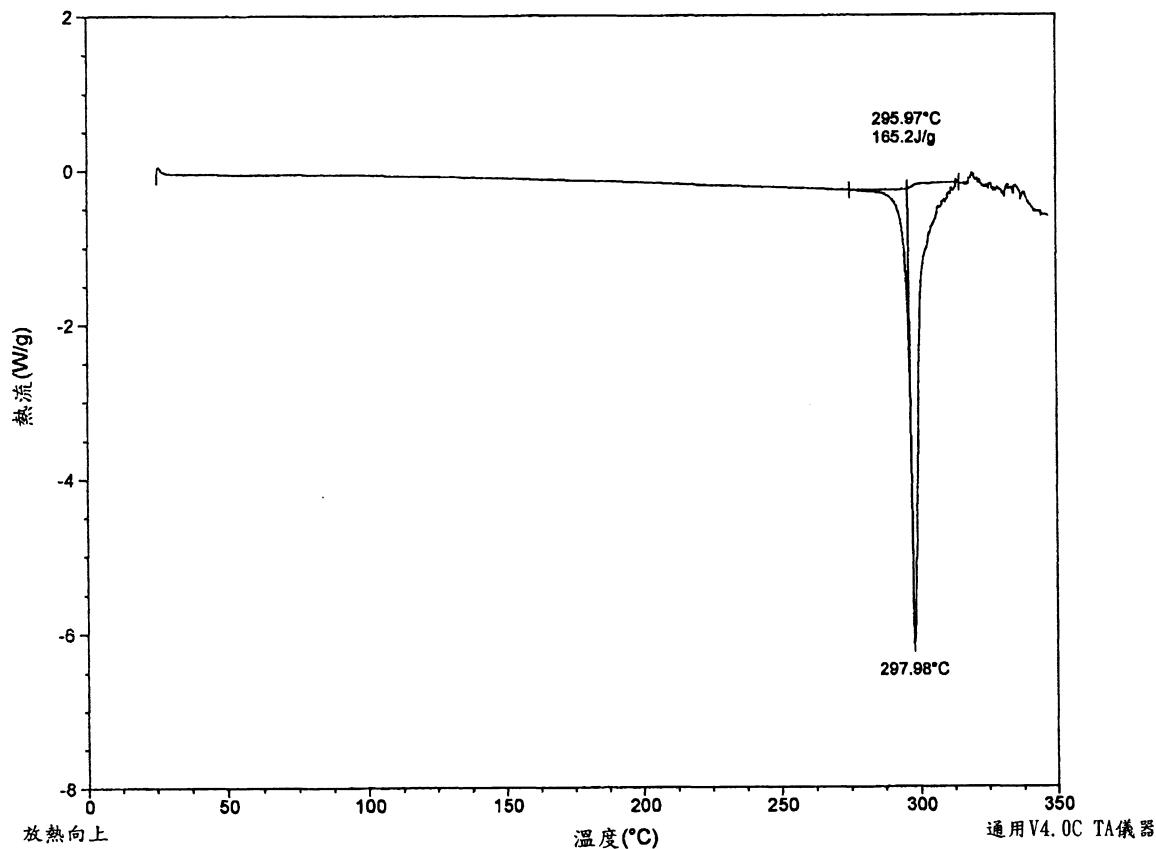


圖 8

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，二-苯磺酸鹽，型式 N-1 (實例 2a) 之 TGA

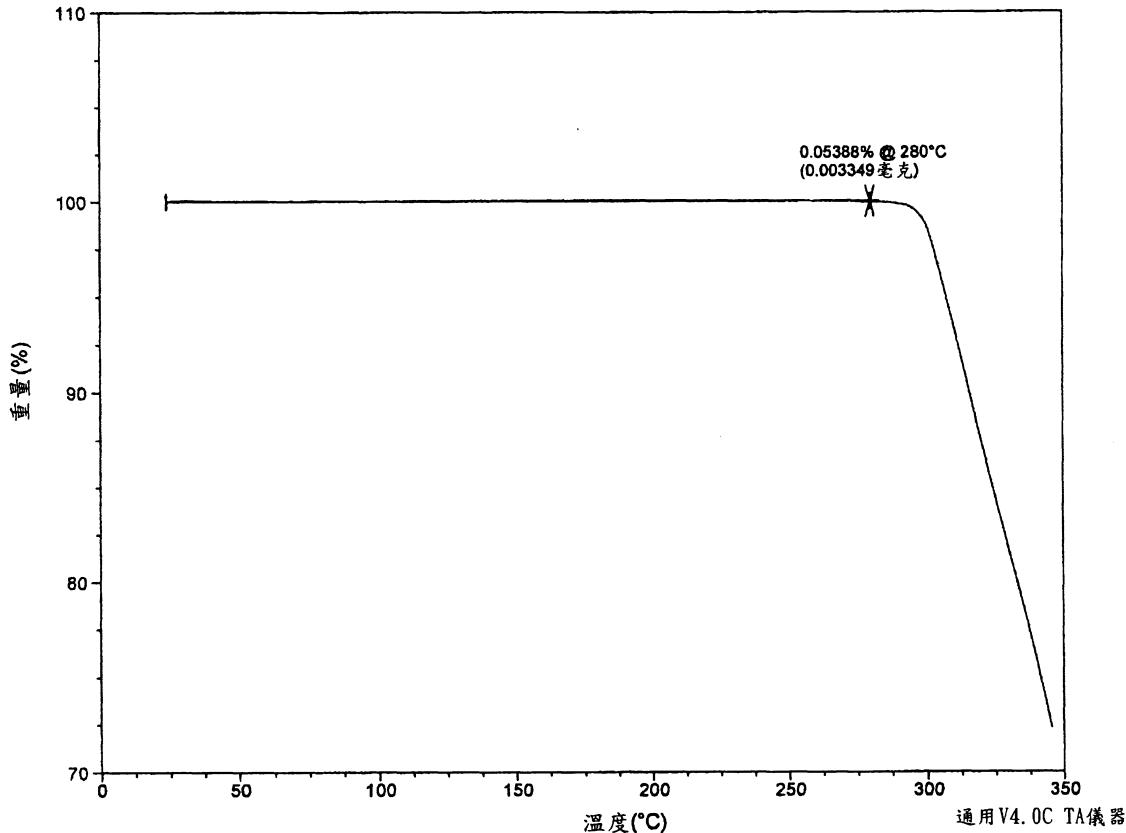


圖 9

200823203

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，自由態
鹼，型式 N-2 (實例 2f) 之 DSC

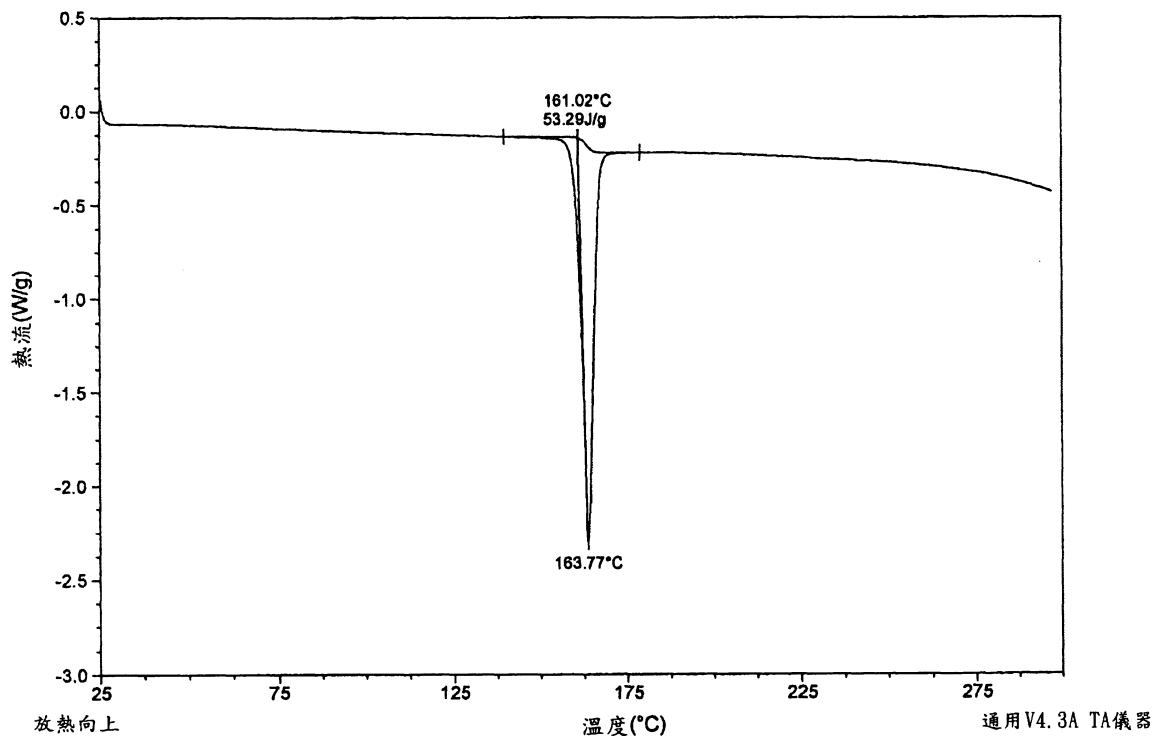


圖 10

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(6-(三氟甲基)噁唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基)乙醯胺，自由態

驗，型式 N-2（實例 2f）之 TGA

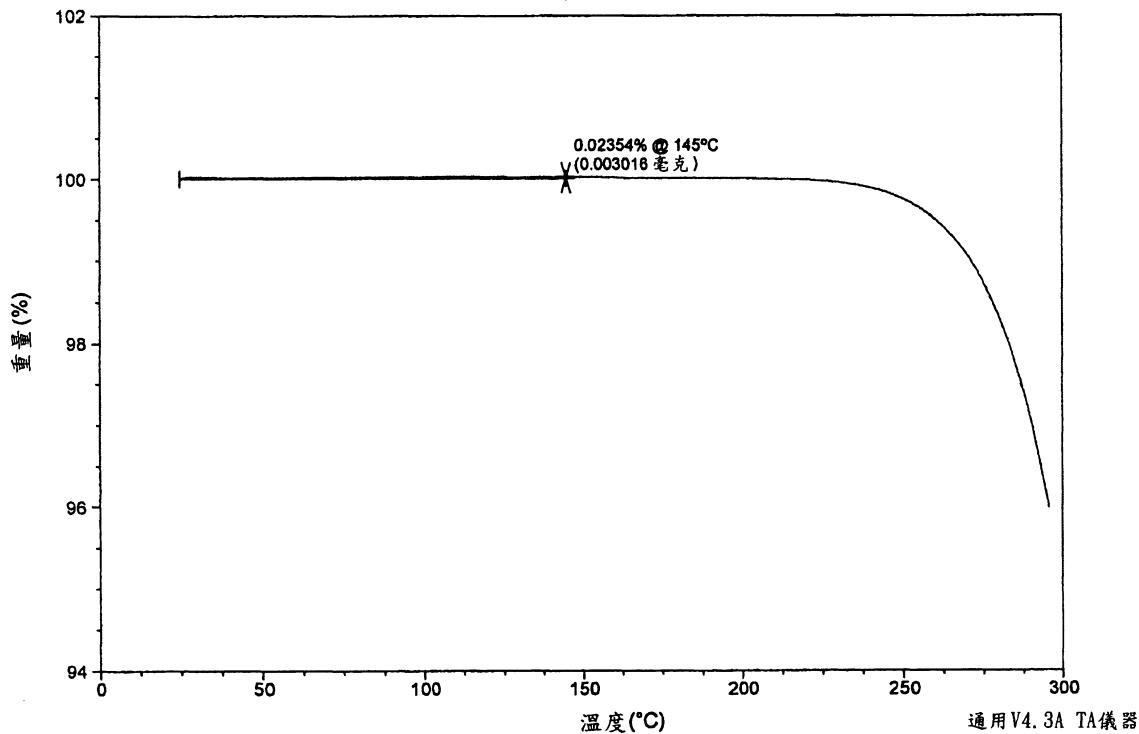


圖 11

N-((1R,2S,5R)-5-(異丙基(甲基)胺基)-2-((S)-2-酮基-3-(三氟甲基)噠唑啉-4-基胺基)四氫吡咯-1-基)環己基乙醯胺，自由態
鹼，型式 N-2 (實例 2f) 之水份吸著等溫線

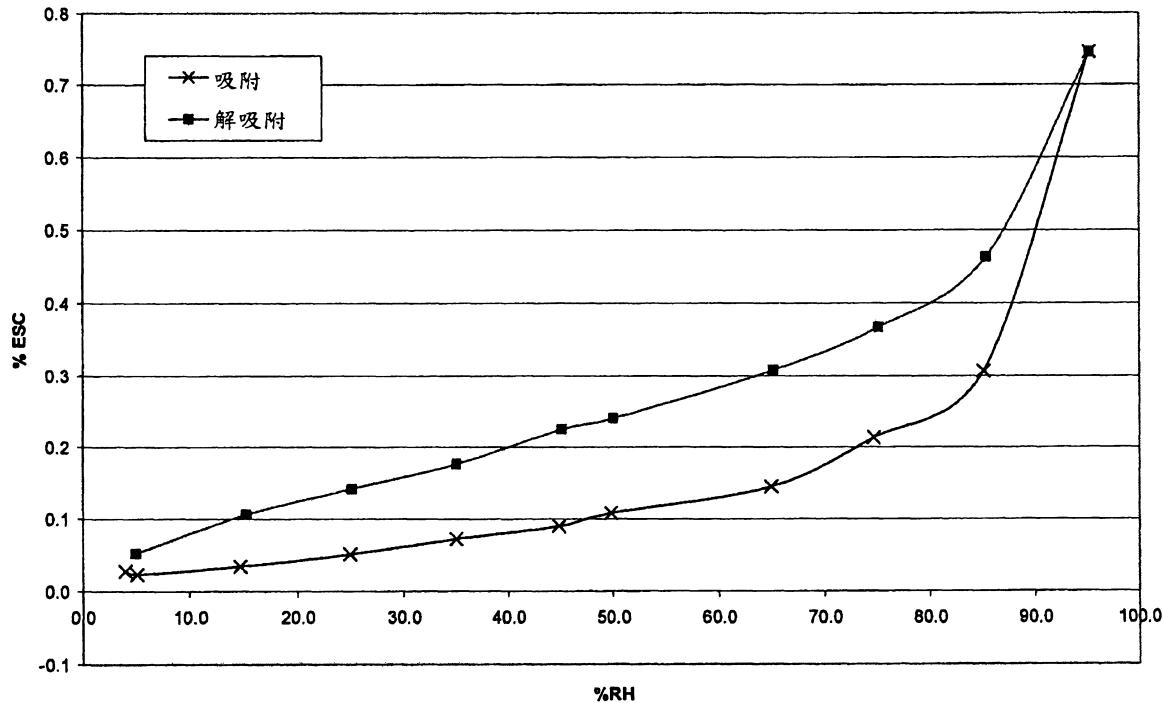


圖 12

(1R,3R,4S)-3-乙醯胺基-4-((S)-3-(苄氧羰基胺基)-2-酮基四氢吡咯-1-基)環己基胺甲酸第三-丁酯之X-射線晶體結構

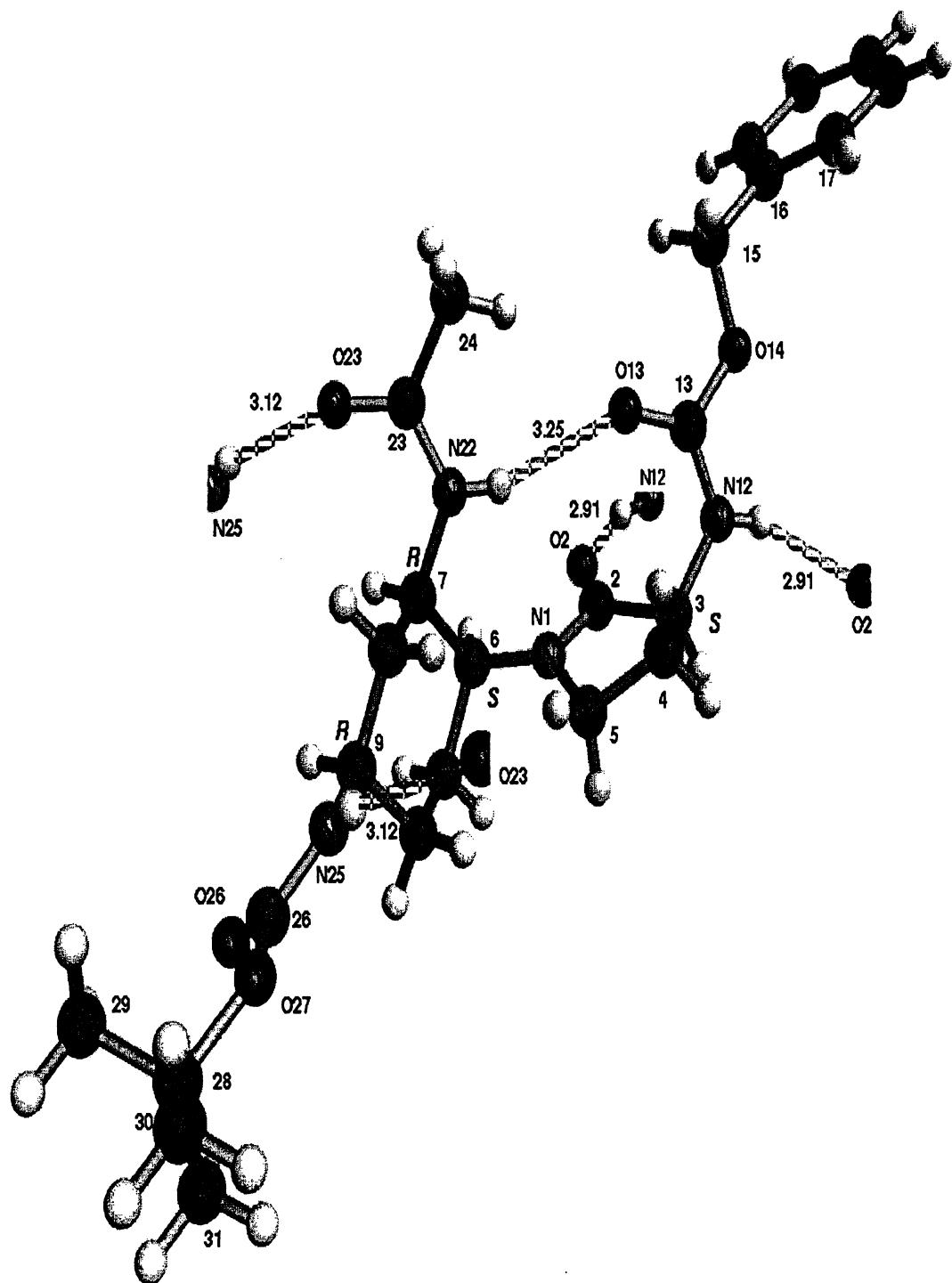


圖 13

在 hCCR2 KI 老鼠中之 48 小時 TG 腹膜炎模式：單細胞 / 巨噬

細胞浸潤至腹膜腔中之實例 1 抑制 (差別細胞計數)

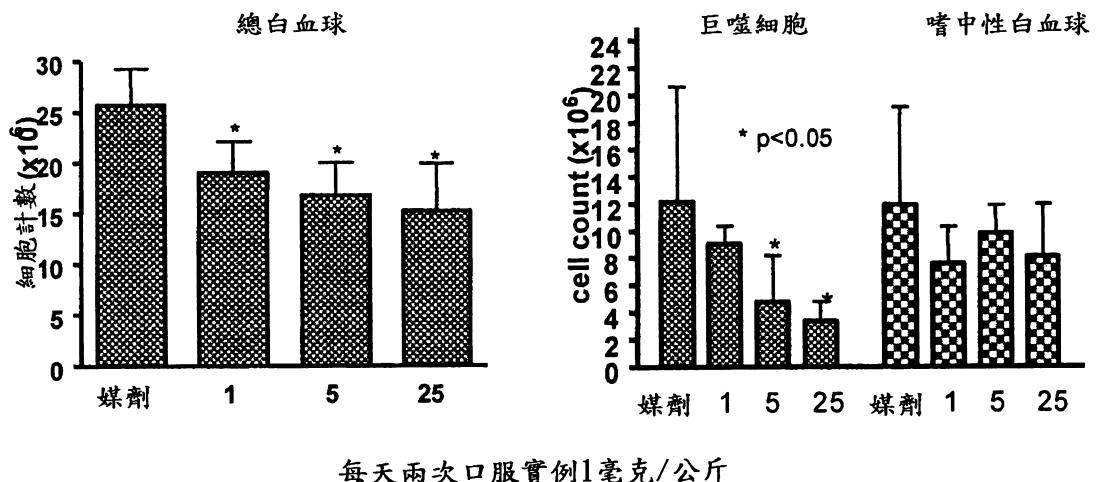


圖 14

在 hCCR2 KI 老鼠中之 48 小時 TG 腹膜炎模式：單細胞 / 巨噬
 細胞浸潤至腹膜腔中之實例 1 抑制 (FACS 分析)

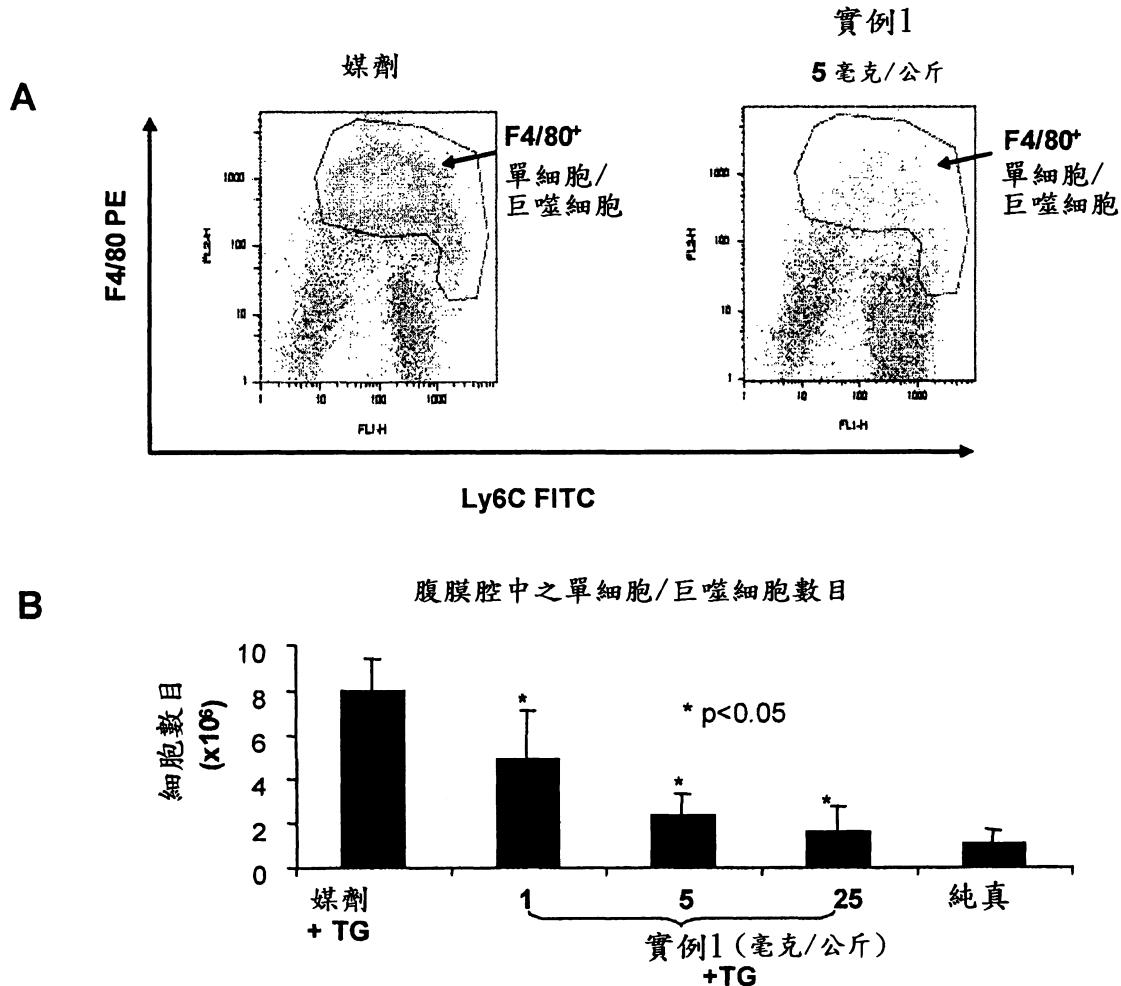


圖 15

在 hCCR2 KI 老鼠中之 EAE：實例 1 治療之臨床評分

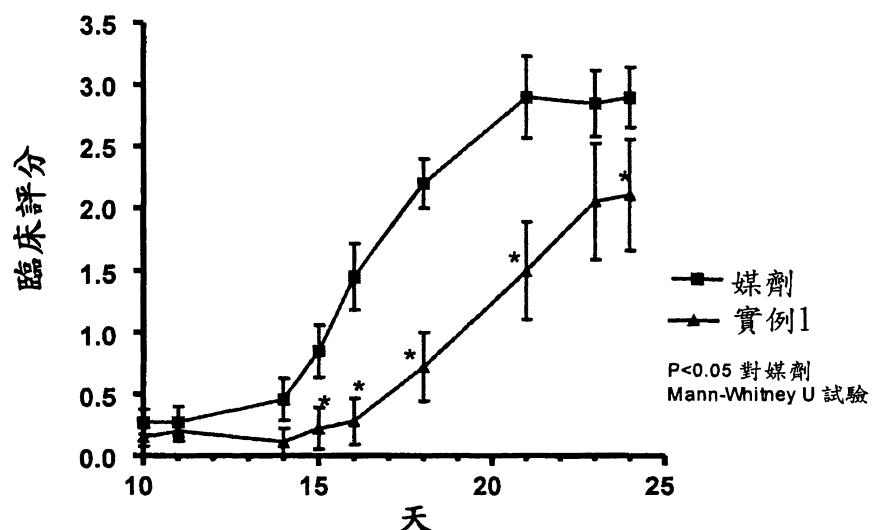


圖 16

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（無）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

