



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201623277 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：104109378

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 24 日

(51)Int. Cl.：

C07D401/06 (2006.01)

A61K31/4725 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2014/03/26

日本

2014-064590

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

日本

(72)發明人：奧田崇男 OKUDA, TAKAO (JP)；野澤榮典 NOZAWA, EISUKE (JP)；鵜川徹
UGAWA, TOHRU (JP)；溝口亮 MIZOGUCHI, RYO (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 46 頁

(54)名稱

醯胺化合物

AMIDE COMPOUND

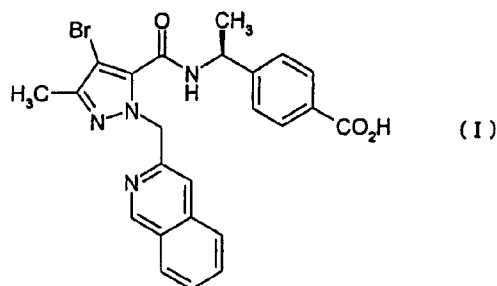
(57)摘要

本發明提供一種作為醫藥組成物，例如慢性腎衰竭(renal failure)及/或糖尿病性腎病之治療用之醫藥組成物之有效成分而有用之化合物。

本發明人等針對具有 EP4 受體拮抗作用之化合物積極檢討，發現醯胺化合物或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，而完成本發明。醯胺化合物或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，可使用作為 EP4 所參與之各種疾病，例如慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防及/或治療用醫藥組成物之有效成分。

特徵化學式：

式(I)



201623277

發明摘要

※申請案號：104109378

C07D401/06 (2006.01)

※申請日：104 年 03 月 24 日

※IPC 分類：

A61K31/475 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

醯胺化合物

Amide compound

【中文】

本發明提供一種作為醫藥組成物，例如慢性腎衰竭（renal failure）及/或糖尿病性腎病之治療用之醫藥組成物之有效成分而有用之化合物。

本發明人等針對具有 EP4 受體拮抗作用之化合物積極檢討，發現醯胺化合物或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，而完成本發明。醯胺化合物或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，可使用作為 EP4 所參與之各種疾病，例如慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防及/或治療用醫藥組成物之有效成分。

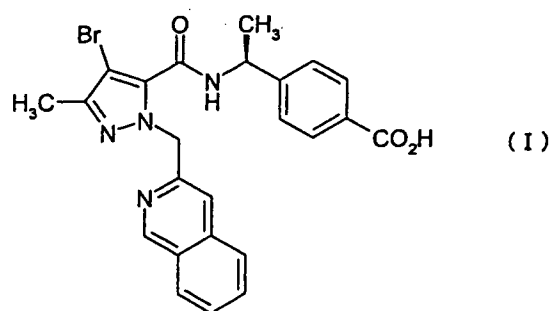
【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：式(I)



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

醯胺化合物

Amide compound

【技術領域】

[0001] 本發明係關於醫藥組成物，例如可使用作為慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之治療用醫藥組成物之有效成分的 4-[(1S)-1-({[4-溴-1-(異喹啉-3-基甲基)-3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基)乙基]苯甲酸(以下有時稱為「化合物 A」)、或其鹽。

【先前技術】

[0002] 前列腺素 (prostaglandin) E2 (以下稱為「PGE2」) 已知為花生四烯酸級聯 (arachidonic acid cascade) 之代謝產物之一。PGE2 顯示各種生理活性，參與發痛增強作用、炎症促進作用、炎症抑制作用、子宮收縮作用、消化管蠕動運動促進作用、覺醒作用、胃酸分泌抑制作用、血壓降低作用、血小板凝聚阻礙作用、骨再吸收促進作用、血管新生作用等。

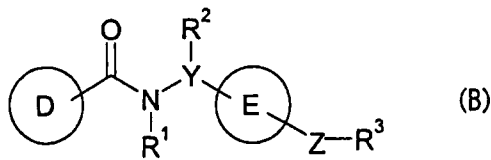
PGE2 之受體存在有 EP1、EP2、EP3 及 EP4 之 4 種亞型，該等廣泛分布於各種組織中。EP1 受體之活化引起細胞內 Ca^{2+} 之增加。EP3 受體之活化引起細胞內 Ca^{2+} 之增

加，同時引起腺苷酸環化酶（adenylate cyclase）之抑制且減少細胞內之 cAMP 量。EP2 及 EP4 受體之活化引起腺苷酸環化酶之活化，且使細胞內之 cAMP 量增加。尤其 EP4 受體與平滑肌之鬆弛、炎症反應之促進或抑制、淋巴球分化、腎小球系膜（mesangium）細胞之肥大或增生、來自胃腸之黏液分泌等有關（Pharmacology & Therapeutics 2013, 138:485-502；Pharmacological Reviews 2013, 65:1010-1052；American Journal of Physiology Renal Physiology 2004, 287, F673-F681）。

PGE2 受體之阻礙劑，亦即 EP 受體拮抗劑對 EP 受體具有結合活性，且妨礙 PGE2 之經過 EP 受體之作用。因此，期待 EP 受體拮抗劑作為治療起因於 PGE2 之疾病之藥劑。其中，EP4 受體拮抗劑期待作為對於與 EP4 有關之疾病，例如腎臟病、炎症性疾病、各種疼痛等之人類與動物之治療藥（Journal of American Society Nephrology 2010, 21:1678-1690；Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107:12233-12238；The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2008, 325:425-434）。另外，EP4 受體選擇之拮抗劑就避免基於其他之 EP1、EP2 及 EP3 之拮抗的副作用方面而言係較佳（Physiological Reviews 1999, 79:1193-1226；Annual Reviews Physiology 2001, 63:579-605）。

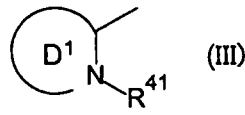
[0003] 專利文獻 1 中報導以下述式（B）表示之化合物作為 EP4 受體拮抗劑。

[化1]



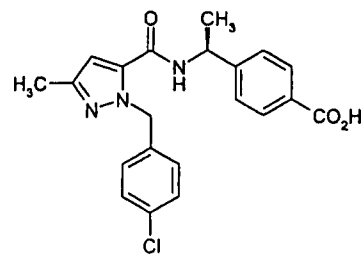
(式中，環 D 為下式 (III) 之基等，下式中，環 D¹ 表示可經苯基取代之單環或二環式含氮雜環，R⁴¹ 表示 -X²-B⁴，X² 表示 C₁₋₆ 伸烷基等，B⁴ 表示可經選自 R⁴ 之相同或不同之 1~5 個基分別取代之芳基、雜環等，其他符號參照該專利文獻)。

[化2]



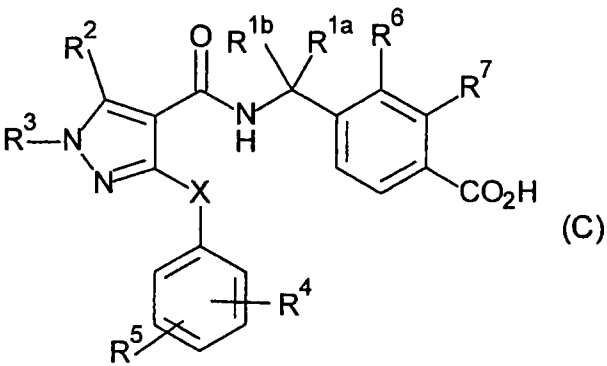
[0004] 該專利文獻之實施例 205 中揭示下述實施例化合物，但揭示該實施例化合物作為環 D¹ 為吡啶之具體化合物。

[化3]



[0005] 專利文獻 2 中報導以下述式 (C) 表示之化合物作為 EP4 受體拮抗劑。

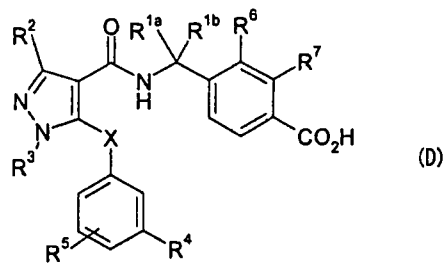
[化4]



(式中， R^2 表示甲基、氟甲基等， R^4 表示氟甲基、甲氧基等，其他符號參照該專利文獻)。

[0006] 專利文獻 3 報導以下述式 (D) 表示之化合物作為 EP4 受體拮抗劑。

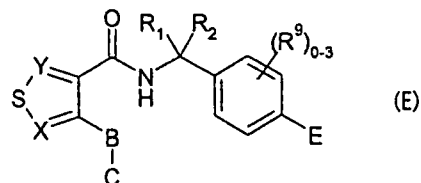
[化5]



(式中， R^2 表示甲基、氟甲基 (例如單氟甲基、二氟甲基、三氟甲基) 等， R^4 表示氟甲基、甲氧基等，其他符號參照該專利文獻)。

[0007] 專利文獻 4 報導以下述式 (E) 表示之化合物作為 EP4 受體配體。

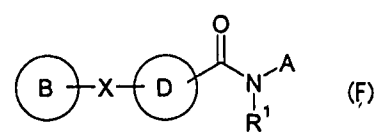
[化6]



(式中之符號參照該專利文獻)。

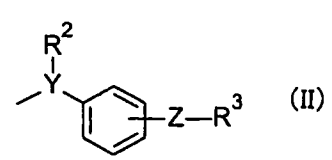
[0008] 專利文獻 5 中報導以下述式 (F) 表示之化合物作為 EP4 受體拮抗劑。

[化7]



(式 中 ， 環 B 及 環 D 為 相 同 或 相 互 不 同 ， 表 示 可 經 取 代 之 芳 基 、 可 經 取 代 之 雜 環 ， X 表 示 單 鍵 、 -R⁰⁰- 等 ， R⁰⁰ 表 示 低 級 伸 烷 基 ， R¹ 表 示 H 等 ， A 為 下 式 (II) 之 基 等 ， 下 式 中 ， Y 表 示 CH 等 ， R² 表 示 R⁰ 等 ， R⁰ 表 示 低 級 烷 基 ， Z 表 示 單 鍵 等 ， R³ 表 示 -COOH 等 ， 其 他 符 號 參 照 該 專 利 文 獻) 。

[化8]



該 專 利 文 獻 中 ， 並 無 環 D 為 吡 啶 之 具 體 化 合 物 之 揭 示 。

[0009] 專利文獻 1 至專利文獻 5 中，具體實施例所揭示之化合物與化合物 A 之構造不同。

[先 前 技 術 文 獻]

[專 利 文 獻]

[0010]

專利文獻 1：國際公開第 2009/139373 號

專利文獻 2：國際公開第 2012/103071 號

專利文獻 3：國際公開第 2012/039972 號

專利文獻 4：國際公開第 2008/017164 號

專利文獻 5：國際公開第 2009/005076 號

【發明內容】

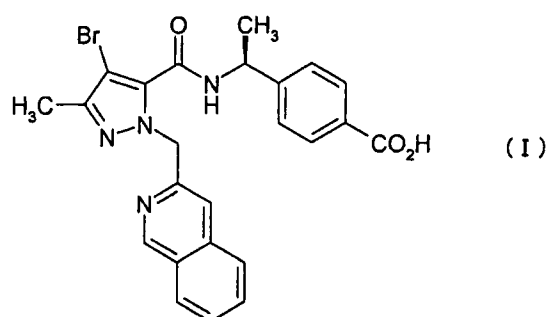
〔發明欲解決之課題〕

[0011] 本發明提供一種可使用作為醫藥組成物，例如慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之治療用醫藥組成物之有效成分之化合物。

〔用以解決課題之手段〕

[0012] 本發明人等針對具有 EP4 受體拮抗作用之化合物積極地檢討，發現以式 (1) 表示之 4-[(1S)-1-({4-溴-1-(異喹啉-3-基甲基)-3-甲基-1H-吡唑-5-基}羰基)胺基)乙基]苯甲酸 (化合物 A) 或其鹽顯示優異之 EP4 受體拮抗作用，因而完成本發明。

[化9]



亦即，本發明係關於化合物 A 或其鹽，以及包含化合物 A 或其鹽、及製藥學上容許之賦形劑之醫藥組成物。

[0013] 且，本發明係關於包含化合物 A 或其鹽、及

製藥學上容許之賦形劑之慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用醫藥組成物。又，該醫藥組成物包含化合物 A 或其鹽、及製藥學上容許之賦形劑之慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療劑。

且，本發明係用以製造慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用醫藥組成物之化合物 A 或其鹽之用途、慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用之化合物 A 或其鹽之用途、慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用之化合物 A 或其鹽、以及將化合物 A 或其鹽之有效量投與至對象而成之慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療方法。又，所謂「對象」為需要該預防或治療之人類或其他動物，某樣態係需要該預防或治療之人類。

〔發明效果〕

[0014] 化合物 A 或其鹽由於具有 EP4 受體拮抗作用，故可使用作為慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防及/或治療用醫藥組成物之有效成分。

【實施方式】

[0015] 本發明之化合物 A 或其鹽之樣態示於下。又，本說明書中僅記載化合物 A 時，意指未形成鹽而作為游離化合物之化合物 A。

(1) 化合物 A 或其鹽。

(1-1) 化合物 A。

(1-2) 化合物 A 之甲烷磺酸鹽。

(2) (1) 所記載之化合物 A 或其鹽之結晶。

(3) (1-1) 所記載之化合物 A 之結晶。

(3-1) 如 (3) 所記載之化合物 A 之結晶，其示差掃描熱量計分析 (DSC 分析) 之吸熱波峰之起始溫度為 253°C 附近。

(3-2) 如 (3) 所記載之化合物 A 之結晶，其特徵為燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 $2\theta (^{\circ}) = 5.7$ 附近、7.9 附近、11.5 附近、13.1 附近、及 17.9 附近顯示波峰。

(3-3) 如 (3) 所記載之化合物 A 之結晶，其特徵為燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 $2\theta (^{\circ}) = 5.7$ 附近、7.9 附近、8.3 附近、8.9 附近、9.2 附近、11.5 附近、12.5 附近、13.1 附近、15.8 附近、16.3 附近、16.7 附近、17.2 附近、17.9 附近、18.5 附近、及 19.5 附近顯示波峰。

(3-4) 如 (3) 所記載之化合物 A 之結晶，其特徵為 DSC 分析中之吸熱波峰之起始溫度為 253°C 附近，燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 $2\theta (^{\circ}) = 5.7$ 附近、7.9 附近、11.5 附近、13.1 附近、及 17.9 附近顯示波峰。

(3-5) 如 (3) 所記載之化合物 A 之結晶，其特徵為 DSC 分析中之吸熱波峰之起始溫度為 253°C 附近，燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 $2\theta (^{\circ}) = 5.7$ 附近、7.9

附近、8.3 附近、8.9 附近、9.2 附近、11.5 附近、12.5 附近、13.1 附近、15.8 附近、16.3 附近、16.7 附近、17.2 附近、17.9 附近、18.5 附近、及 19.5 附近顯示波峰。

(4) 如(1-2)所記載之化合物 A 之甲烷磺酸鹽之結晶。

(4-1) 如(4)所記載之化合物 A 之甲烷磺酸鹽之結晶，其在 DSC 分析中之吸熱波峰之起始溫度為 192℃ 附近。

(4-2) 如(4)所記載之化合物 A 之甲烷磺酸鹽之結晶，其特徵為燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 2θ (°) = 4.7 附近、9.5 附近、12.0 附近、13.2 附近、13.7 附近、15.3 附近、18.8 附近、20.3 附近、20.9 附近、及 22.8 附近顯示波峰。

(4-3) 如(4)所記載之化合物 A 之甲烷磺酸鹽之結晶，其特徵為 DSC 分析之吸熱波峰之起始溫度為 192℃ 附近，燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，在 2θ (°) = 4.7 附近、9.5 附近、12.0 附近、13.2 附近、13.7 附近、15.3 附近、18.8 附近、20.3 附近、20.9 附近、及 22.8 附近顯示波峰。

(5-1) 一種醫藥組成物，其含有(1)~(1-2)中任一項所記載之化合物、及製藥學上容許之賦形劑。

(5-2) 一種醫藥組成物，其含有(2)~(4-3)中任一項所記載之結晶、及製藥學上容許之賦形劑。

(5-3) 一種醫藥組成物，其為慢性腎衰竭及/或糖

尿病性腎症之預防或治療用之含有（1）～（1-2）中任一項所記載之化合物、及製藥學上容許之賦形劑。

（5-4） 一種醫藥組成物，其為慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療用之含有（2）～（4-3）中任一項所記載之結晶、及製藥學上容許之賦形劑。

（6-1） 一種（1）～（1-2）中任一項所記載之化合物之用途，係用於製造慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療用醫藥組成物。

（6-2） 一種（2）～（4-3）中任一項所記載之結晶之用途，係用於製造慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療用醫藥組成物。

（7-1） 如（1）～（1-2）中任一項所記載之化合物，係用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療。

（7-2） 如（2）～（4-3）中任一項所記載之結晶，係用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療。

（8-1） 一種（1）～（1-2）中任一項所記載之化合物之用途，係用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療。

（8-2） 一種（2）～（4-3）中任一項所記載之結晶之用途，係用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防或治療。

（9-1） 一種慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療方法，係將（1）～（1-2）中任一項所記載之化合

物之有效量投予對象。

(9-2) 將(2)~(4-3)中任一項所記載之結晶之有效量投予對象所成之慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療方法而成。

[0016] 再者，本發明亦包含以化合物 A 或其鹽所示之化合物之製藥學上容許之前藥。所謂製藥學上容許之前藥為具有藉由加溶劑分解或在生理學條件下轉化成羧基之基之化合物。形成前藥之基列舉為例如 Prog. Med., 5, 2157-2161 (1985)，或「醫藥品之開發」(廣川書店，1990年)第7卷 分子設計 163-198 所記載之基。

[0017] 本發明中，所謂化合物 A 之鹽為製藥學上容許之鹽，有時形成酸加成鹽或與鹼之鹽。具體列舉為與鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸、硝酸、磷酸等無機酸，或甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富馬酸、馬來酸、乳酸、蘋果酸、扁桃酸、酒石酸、二苯甲醯基酒石酸、二甲苯醯基酒石酸、檸檬酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、對-甲苯磺酸、天門冬胺酸、穀胺酸等有機酸之酸加成鹽，與鈉、鉀、鎂、鈣、鋁等之無機鹼，與甲胺、乙胺、乙醇胺、離胺酸、鳥胺酸(ornithine)等之有機鹼之鹽，與乙醯基白胺酸等各種胺基酸及胺基酸衍生物之鹽或銻鹽等。

[0018] 進而，本發明亦包含化合物 A 或其鹽之各種水合物或溶劑合物，及結晶多形之物質。且，本發明亦包含以各種放射性或非放射性同位素標記之化合物 A 或其

鹽。

[0019] 本說明書中，粉末 X 射線繞射圖形中之繞射角（ 2θ （°））及 DSC 分析中之吸熱波峰之起始溫度（°C）之記載所包含之「附近」意指包含該數據設定法中通常容許之誤差範圍，且意指大約為其繞射角及吸熱波峰之起始值。粉末 X 射線繞射之繞射角（ 2θ （°））之誤差範圍，某樣態為 $\pm 0.2^\circ$ ，另一樣態為 $\pm 0.1^\circ$ 。DSC 分析之吸熱波峰之起始溫度（°C）之誤差範圍，某樣態為 $\pm 2^\circ\text{C}$ ，另一樣態為 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

又，粉末 X 射線繞射波峰在數據之性質上、結晶之同一性認定上重要的是結晶晶格之間隔或整體之圖形，繞射角及繞射強度隨著結晶成長方向、粒子大小、測定條件而多少有變化。

[0020]

（製造法）

化合物 A 或其鹽可利用基於其基本構造或取代基之種類之特徵，使用各種習知之合成法製造。此時，依據官能基種類，在自原料至中間體之階段將該官能基取代成適當保護基（可容易地轉換成該官能基之基）有製造技術上有效之情況。該保護基可列舉為例如 Wuts（P.G.M. Wuts）及 Greene（T.W. Greene）著之「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis（第 4 版，2006 年）」所記載之保護基等，只要依據該等之反應條件適當選擇即可。該方法中，導入該保護基進行反應時，可視需要去除保護

基，藉此獲得期望之化合物。

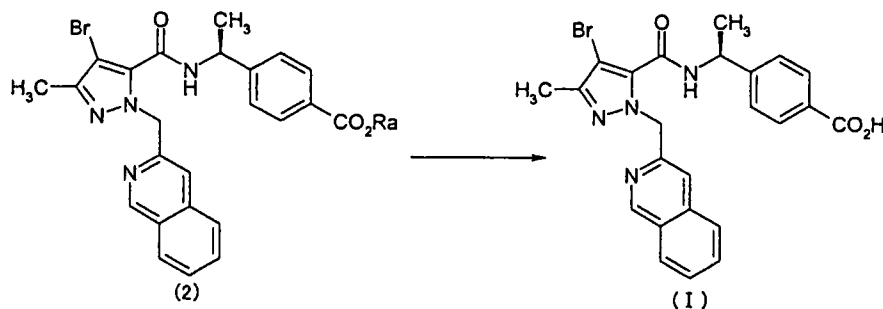
又，化合物 A 之前藥可與上述保護基同樣，在原料至中間體之階段中導入特定基，或使用所得之化合物 A 進一步進行反應予以製造。反應可藉由使用一般之酯化、醯胺化、脫水等本技藝者習知之方法進行。

以下，說明化合物 A 之代表性製造法。各製法亦可參照附加於該說明之參考文獻進行。又，本發明之製造法並不限於以下所示之例。且，只要沒有特別記載，則該製造法之構造式中所示之符號中，相同符號表示相同意義。

[0021]

(第一製法)

[化10]



(式中，Ra 為直鏈或分支狀之碳數 1 至 6 之烷基，例如甲基、乙基等)。

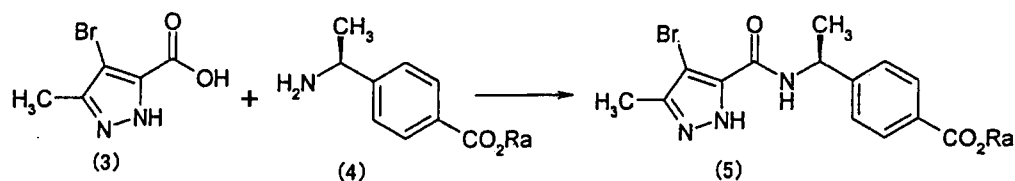
[0022] 式 (I) 所示之化合物 A 可藉由以通式 (2) 表示之化合物之水解予以製造。此處，水解反應可參照前述「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (第 4 版，2006 年)」實施。

[0023]

(原料合成)

原料製法 1

[化11]



[0024] 原料化合物 (5) 可利用化合物 (3) 與化合物 (4) 之醯胺化反應製造。

反應係以等量或使一者過量使用化合物 (3) 與化合物 (4)，在縮合劑存在下，於對反應惰性之溶劑中，自冷卻至加熱下，較好在 $-20^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 下，通常攪拌 0.1 小時~5 天進行。此處，溶劑並無特別限制，列舉為例如苯、甲苯或二甲苯等芳香族烴類，二氯甲烷 (DCM)、1,2-二氯乙烷 (DCE) 或氯仿等鹵化烴類，二乙醚、四氫呋喃 (THF)、二噁烷、二甲氧基乙烷 (DME) 等醚類，N,N-二甲基甲醯胺 (DMF)、二甲基亞砷 (DMSO)、乙酸乙酯、乙腈或水，或該等之混合物。縮合劑有些情況較好使用 1-[雙 (二甲胺基) 亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并 [4,5-b] 吡啶-1-鎢-3-氧化物六氟磷酸鹽 (HATU)、1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽、1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺、二環己基碳二醯亞胺 (DCC)、1,1'-羰基二咪唑 (CDI)、二苯基磷酸疊氮化物、磷醯氯 (phosphorus oxychloride)、或擔持縮合劑之聚苯乙烯樹脂，例如 PS-碳二醯亞胺 (PS-Carbodiimide) (Argonaut Technologies, 美國) 等，但並不限於該等。此外，有些

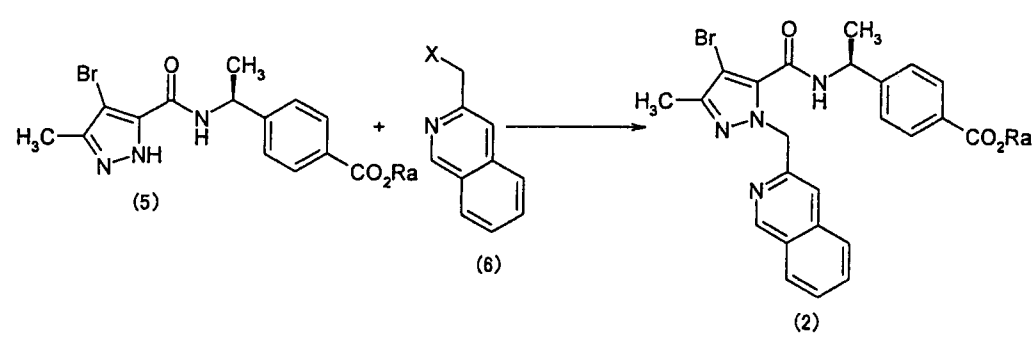
情況較好於反應中使用例如 1-羥基苯并三唑（HOBt）等添加劑，又，例如在三乙胺（TEA）、N,N-二異丙基乙胺（DIPEA）或 N-甲基嗎啉（NMM）等有機鹼、或碳酸鉀、碳酸鈉或氫氧化鉀等無機鹼存在下反應有時對於順利進行反應方面有利。另外基於去除反應結束後過量之胺之目的，可使用擔持異氰酸酯之聚苯乙烯樹脂，例如 PS-異氰酸酯（PS-Isocyanate）（Argonaut Technologies，美國）等。進而基於去除反應結束後過量之羧酸及前述之添加劑等之目的，可使用擔持四級銨鹽之聚苯乙烯樹脂，例如 MP-碳酸酯（MP-Carbonate）（Argonaut Technologies，美國）等。

且，亦可使用將化合物（3）導入反應性衍生物後與化合物（4）反應之方法。此處化合物（3）之反應性衍生物列舉為與磷醯氯、亞硫醯氯等鹵化劑反應獲得之醯鹵化物，與氯甲酸異丁酯等反應獲得之混合酸酐，與 HOBt 等縮合獲得之活性酯等。該等反應性衍生物與化合物（4）之反應可在前述鹵化烴類、芳香族烴類、醚類等對反應惰性之溶劑中，在冷卻下~加熱下，較好在 -20℃ ~60℃ 下進行。

[0025]

原料製法 2

[化12]



(式中，X 表示脫離基)。

[0026] 原料化合物 (2) 可藉由化合物 (5) 與化合物 (6) 之烷化反應製造。

以 X 表示之脫離基之具體例包含鹵素、甲烷磺醯氧基、對-甲苯磺醯氧基、三氟甲烷磺醯氧基等。

該反應係以等量或使一者過量使用化合物 (5) 與化合物 (6)，使該等混合物在對反應惰性之溶劑中，或無溶劑下，自冷卻下至加熱回流下，較好在 0℃ 至 80℃ 下通常攪拌 0.1 小時~10 天。此處所用之溶劑之例並無特別限制，列舉為苯、甲苯、二甲苯等芳香族烴類，二乙醚、THF、二噁烷、DME 等醚類，DCM、DCE、氯仿等鹵化烴類，DMF、DMSO、1-甲基-2-吡咯啉酮、二甲基乙醯胺、丙酮、乙酸乙酯、乙腈及該等之混合物。在 TEA、DIPEA 或 NMM 等有機鹼，或第三丁氧化鉀、碳酸銨、碳酸鉀、碳酸鈉或氫氧化鉀等無機鹼存在下進行反應在順利進行反應方面有時較有利。

[0027] 化合物 A 係單離成游離化合物、其鹽、水合物、溶劑合物、或結晶多形之物質，並經純化。化合物 A

之鹽亦可藉由施加慣用方法之造鹽反應製造。

單離、純化係使用萃取、分離結晶化、各種劃分層析等一般化學操作進行。

光學異構物可利用消旋體之一般光學解析法（例如，導入與光學活性之鹼或酸之非立體異構物鹽之分別結晶化，或使用對掌性管柱（chiral column）之層析等）獲得，且可由適當之光學活性之原料化合物製造。

[0028] 化合物 A 之藥理活性可利用以下之試驗確認。

[0029]

試驗例 1：小鼠 EP4 受體親和性評價試驗

小白鼠 EP4 受體表現載體（vector）之構築：

將小鼠 EP4 受體基因（GenBank 註冊編號：NM_032076.1）導入表現載體 -pcDNA3.1-V5-His-TOPO（Invitrogen）中。

小鼠 EP4 受體之暫時性表現：

將小鼠 EP4 受體之表現載體導入 HEK-293 細胞（ATCC 編號：CRL-1573）中。導入係使用 Lipofectamine（註冊商標）2000 試藥（Invitrogen），依據隨附說明書進行。導入後以 α -MEM 培養基培養 20~24 小時。

膜劃分之調製：

抽吸去除培養基，於每 15cm 盤添加 10mL 之冷卻磷

酸緩衝生理食鹽水 (Phosphate buffered saline (PBS))
 , 使用細胞刮棒 (Sumitomo Bakelite) 刮下細胞。回收細胞並離心 ($250\times g$, 4°C , 5min) 後 , 每盤懸浮於 6mL 之冷卻 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4 ; Nacalai Tesque , 包含 5mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA , Nacalai Tesque)) 中 , 使用 POLYTRON (註冊商標) 均質化 , 使該均質液離心 ($69,000\times g$, 20min , 4°C) 。使所得沉澱物再懸浮於冷卻之 20mmol/L Tris-HCl 中 , 再均質化 , 使其均質液離心 ($69,000\times g$, 20min , 4°C) 。使所得沉澱以每盤懸浮於 1mL 之 50mmol/L HEPES-NaOH (Dojindo Laboratories) (pH7.5) 後均質化 , 作為膜劃分於 -80°C 冷凍保存。此時 , 一部分使用於蛋白質濃度之測定。蛋白質濃度之測定係使用 Bio-Rad 蛋白質分析套組 (Bio-Rad Laboratories) , 依據隨附之標準方案複製 (duplicate) 進行。

結合分析：

$[^3\text{H}]$ PGE2 及膜劃分以分析緩衝液 (50mmol/L HEPES-NaOH , 10 mmol/L MgCl_2 , pH7.5) 稀釋 , 受驗化合物及未標記之 PGE2 (Cayman) 以 DMSO 及分析緩衝液稀釋。反應液 ($200\mu\text{L}$) 之組成為 50mmol/L HEPES-NaOH (pH7.5) 、 10mmol/L MgCl_2 、 0.3nmol/L $[^3\text{H}]$ PGE2 (Perkin Elmer) $50\mu\text{L}$ 、小鼠 EP4 細胞膜劃分 ($200\mu\text{g}$ 蛋白質/mL) $100\mu\text{L}$ 及試驗化合物 (最終濃度 0.1 、 0.3 、 1 、 3 、 10 、 30 及 100nmol/L) $50\mu\text{L}$ 。非特異結合之測定中 , 以成為最終

濃度為 $1\mu\text{mol/L}$ 之方式添加未標記之 PGE2 (Cayman) 。 DMSO 之最終濃度設為 1% 。反應液於 96 孔微盤 (Sumitomo Bakelite) 於室溫培育 1 小時。反應液使用 FilterMate 收取器 (Perkin Elmer) 以濾紙 UniFilter-96 GF/B (Perkin Elmer) 過濾。過濾後之濾紙以冷卻之分析緩衝液 $300\mu\text{L/孔}$ 洗淨 3 次後，以乾燥機暫時乾燥，添加液體閃蒸劑 MicroScint20 (Perkin Elmer) $50\mu\text{L/孔}$ 。使用 TopCount (Perkin Elmer) 測定放射活性。測定均以一次兩份實施一次。特異結合量係自總結合量減去非特異結合量而求得。Ki 值依據常法算出。

評價結果，化合物 A 對於小鼠 EP4 受體之 Ki 值為 0.874nmol/L 。又，專利文獻 1 之實施例 205 之化合物對小鼠 EP4 受體之 Ki 值為 140nmol/L 。

[0030]

試驗例 2：人類 EP4 受體親和性評價試驗

結合分析：

$[^3\text{H}]$ PGE2 及人類 EP4 細胞膜劃分 (Chemicon) 以分析緩衝液 (50mmol/L HEPES-NaOH, 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L CaCl_2 (pH7.4) , 0.5% 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin (BSA))) 稀釋，受驗化合物及未標記之 PGE2 (Sigma) 以 DMSO 及分析緩衝液稀釋。反應液 ($200\mu\text{L}$) 之組成為包含 $[^3\text{H}]$ PGE2 (最終濃度 2.9nmol/L) 之分析緩衝液 $175\mu\text{L}$ 、膜劃分 (Chemicon, $40\mu\text{g}$ 蛋白質/mL) $50\mu\text{L}$ 及受驗化合物 (最終濃度 0.1、1、10、100 及

1000nmol/L) 25 μ L。非特異結合之測定中，以成為最終濃度為 10 μ mol/L 之方式添加未標記之 PGE₂。DMSO 之最終濃度設為 1%。反應液於 25℃ 培育 60 分鐘。該反應液使用細胞收取器 (Blundell) 以濾紙 GF/B (Whatman) 過濾。過濾後之濾紙以包含 50mmol/L HEPES-NaOH (pH7.4)、500mmol/L NaCl、0.1% BSA 之溶液 1mL 洗淨 3 次。將濾紙 GF/C 放入分析緩衝液中，添加 5mL 之液體閃爍劑 Atomlight。使用液體閃蒸計數器 (Perkin Elmer) 測定放射活性。測定均以一次兩份實施一次。特異結合量係自總結合量減去非特異結合量而求得。K_i 值依據常法算出。

評價結果，化合物 A 對於人類 EP4 受體之 K_i 值為 1.46nmol/L。

[0031]

試驗例 3：人類 Jurkat 細胞中之 cAMP 量測定之人類 EP4 受體拮抗作用評價試驗

細胞培養：

使用添加有 10%牛胎兒血清 (fetal bovine serum (FBS)) 之 RPMI1640 培養基 (型號 11879020, Invitrogen)，將 Jurkat 細胞 (源自人類白血病 T 淋巴腫瘤) 在 37℃、5% CO₂ 之條件下培養。增生至融合 (confluent) 後，添加最終濃度 5 μ mol/L 之吲哚美辛 (indometacin) 進一步培養 18 小時。以 15mL 移液管回收該細胞，以 CellBanker (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc) 調製成 1 $\times$ 10⁶ 個/mL，在 -80℃ 保存。

化合物處理：

將受驗化合物以含 0.5% BSA 之分析緩衝液（1×HBSS（Hanks buffered salt solution（漢氏緩衝鹽溶液）），日水製藥）、20mmol/L HEPES-NaOH（Nacalai）（pH7.4）、0.5mmol/L IBMX（3-異丁基-1-甲基黃嘌呤，WAKO）、0.02% CHAPS（Sigma）、0.5% BSA（Sigma）、2μmol/L 吲哚美辛（Sigma）稀釋調整至最終濃度之 3 倍濃度。PGE2 以含 0.5% BSA 之分析緩衝液調整至 300nmol/L。將經冷凍保存之 Jurkat 細胞於 37℃ 解凍，使用含 0.5% BSA 之分析緩衝液調製成 1×10^6 個/mL。於 384 孔 U 型底黑色微盤（CORNING）中以各 5μL 逐次依序添加試驗化合物（最終濃度 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 及 10nmol/L）、細胞、PGE2，以盤搖晃器攪拌後，在室溫培育 30 分鐘。為了求出 PGE2 非刺激狀態之 cAMP 量，設置 PGE2 未添加群。

cAMP 量之測定及解析：

cAMP 測定係使用 cAMP HiRange 套組（Cisbio international）。培育後，以 Lysis 緩衝液（50mmol/L 磷酸緩衝液（pH7.0）、0.8mol/L KF、1% TritonX-100、0.2% BSA）稀釋至 0.6 倍之套組之 d2 試藥於各孔中各添加 5μL，以盤搖晃機攪拌。接著以 Lysis 緩衝液稀釋至 0.6 倍之套組之鎔穴化合物（europium cryptate）試藥於各孔中

各添加 5 μ L，以盤搖晃機攪拌，在遮光下於室溫培育 60 分鐘。培育後，使用 RAVO1420 (Perkin Elmer) 於 620nm 測定穴合物之螢光強度，以 665nm 測定 d2 之螢光強度。為了作成標準曲線，於各孔中饋入 280、70、17.5、4.38、1.09、0.27、0.068nmol/L 之 cAMP，與上述同樣測定螢光強度。測定均以一次三分 (triplicate) 進行。添加 PGE2 時之 cAMP 量設為 100%，未添加 PGE2 時之 cAMP 量設為 0%，自化合物處理時之 cAMP 量，由邏輯回歸法算出化合物之 IC₅₀ 值。由 3 次實驗結果算出平均值。

評價結果，人類 Jurkat 細胞中，化合物 A 對於因 PGE2 (100nmol/L) 所致之 cAMP 產生作用之 IC₅₀ 值為 0.16nmol/L。

[0032]

試驗例 4：利用 cAMP 量測定之大鼠 EP4 受體拮抗作用評價試驗

大鼠 EP4 受體表現載體之構築：

與試驗例 1 同樣進行。

大鼠 EP4 受體安定表現細胞之構築：

將大鼠 EP4 受體之表現載體導入 CHO-K1 細胞 (ATCC 編號：CCL-61)。導入係使用 Lipofectoamine (註冊商標) 2000 試藥 (Invitrogen)，依據隨附說明書進行。導入後以含有 G418 (NACALAI TESQUE) 之 α -MEM

培養基（型號 12571063，Invitrogen）培養，取得抗藥性細胞株。

細胞培養及化合物處理：

將已安定表現大鼠 EP4 之 CHO-K1 細胞於 96 孔盤中以 5×10^4 個/100 μ L 播種，培養隔夜。將培養基更換成 2 μ mol/L 吲哚美辛/0.5% BSA/ α -MEM 培養基，再 60 分鐘後，更換成 1mmol/L IBMX/2 μ mol/L 吲哚美辛/0.5% BSA/ α -MEM 培養基。10 分鐘後，添加受驗化合物（最終濃度 0.1、0.3、1、3 及 10nmol/L），再 10 分鐘後，以使最終濃度成為 100nmol/L 之方式添加 PGE2（最終 DMSO 濃度 0.1%）。為了算出因添加 PGE2 之 cAMP 產生量，設置 PGE2 未添加群。使細胞於 CO₂ 培養器（37℃，5% CO₂）內培養並反應。30 分鐘後去除培養基，添加 0.2% TritonX-PBS 100 μ L/孔將細胞溶解。試驗以一次兩份（duplicate）實施兩次。

cAMP 量之測定及解析：

使用 cAMP HiRange 套組測定細胞溶解液中所含之 cAMP 量。各孔之細胞溶解液以各 10 μ L 分注於 384 孔 U 型底黑色微盤中，以各 5 μ L 依序添加 d2 試藥、鎔穴合物試藥，遮光下於室溫培育 60 分鐘。培育後，使用 ARV1420 於 620nm 測定穴合物之螢光強度，於 665nm 測定 d2 之螢光強度。於標準曲線作成用，於各孔中饋入

280、70、17.5、4.38、1.09、0.27 及 0.068nmol/L 之 cAMP，與上述同樣測定螢光強度。將添加最終濃度 100nmol/L 之 PGE2 時之 cAMP 量設為 100%，將 PGE2 未添加時之 cAMP 量設為 0%，由受驗化合物處理時之 cAMP 量，利用邏輯回歸法算出受驗化合物之 IC_{50} 值。由 2 次實驗結果算出平均值。

評價結果，大鼠 EP4 受體表現 CHO-K1 細胞中，化合物對於因 PGE2 (100nmol/L) 所致之 cAMP 產生作用之 IC_{50} 值為 1.04nmol/L。

[0033]

試驗例 5：體內大鼠 EP4 受體拮抗作用評價試驗

試驗中使用非絕食下之 SD 大鼠（雄性，6 週齡）。將溶解於 PEG400：20% Tween 80：1mol/L $NaHCO_3$ 水溶液=1：4：5 之混合液中之受驗化合物以 0.03mg/kg 經口投予 (po) (5mL/kg)。1 小時後，將溶解於生理食鹽水之 EP4 促效劑 (agonist) ONO-4819 之活性代謝物 (ONO-AE1-437 (CAS No. 256382-23-7)) 以 0.01mg/kg 於背部進行皮下投予 (sc) (5mL/kg)。於 30 分鐘後，尾靜脈內投予脂多醣 (LPS, 0.01mg/kg) (2mL/kg)，於 60 分鐘後，麻醉下將血液約 0.5mL 採集於含肝素 (heparin) 之試管內。藉由離心操作 (1000×g, 10 分鐘, 4℃) 自血液樣本分離血漿。以 ELISA 套組 (DuoSet ELISA, R&D Systems) 測定血漿中之大鼠 TNF- α 濃度。將 ONO-AE1-437 非處置群 (n=5) 之 TNF- α 濃度設為阻礙率 100%，將

ONO-AE1-437 處置群 (n=5) 本身之阻礙率設為 0%，算出受驗化合物群 (n=5) 對於因 EP4 促效劑所致之 TNF- α 產生阻礙作用之抑制率。

評價結果，化合物 A (0.03mg/kg, po) 之 EP4 促效劑 ONO-AE1-437 (0.01mg/kg, sc) 之 TNF- α 產生阻礙作用抑制了 38%。

[0034]

試驗例 6：對於大鼠血漿中之腎素作用評價試驗

試驗中使用非絕食下之 SD 大鼠 (雄性, 7 週齡)。將溶解於 PEG400 : 20% Tween 80 : 1mol/L NaHCO₃ 水溶液 = 1 : 4 : 5 之混合液中之受驗化合物以 0.3mg/kg 經口投予 (po) (5mL/kg)。1 小時後，將溶解於生理食鹽水之 EP4 促效劑 ONO-4819 之活性代謝物 (ONO-AE1-437) 以 0.01mg/kg 於背部進行皮下投予 (5mL/kg)。其 10 分鐘後於麻醉下予以斷頭，將血液約 2mL 採集於含 EDTA · 2Na 3mg 之試管中。藉由離心操作 (1000×g, 10 分鐘, 4℃) 自血液樣本分離血漿。於血漿 100μL 中添加分析緩衝液 (混合 2mol/L NaH₂PO₄ 20.4mL、1mol/L Na₂HPO₄ 9.3mL、0.5mol/L EDTA · 2Na 15mL、CHAPS 0.1g 並以蒸餾水稀釋至合計 50mL, pH5.55) 10μL 及 100mmol/L 4- (2-胺基乙基) 苯磺醯氟鹽酸鹽 1μL。分取半量於 37℃ 培育 90 分鐘。剩餘半量保存於 4℃ 供空白反應用。以 ELISA 法測定兩樣本中之血管收縮素 (Angiotensin) I 濃度，自 37℃ 培養樣本之值減去空白反應之值所得之濃度作為血漿

中腎速活性 (plasma renin activity (PAR)) 。將 ONO-AE1-437 非處置群 (n=5) 之 PRA 設為阻礙率 100% , 將 ONO-AE1-437 處置群 (n=4) 本身之阻礙率設為 0% , 算出受驗化合物群 (n=5) 之阻礙率。

評價結果 , 化合物 A (0.3mg/kg , po) 之 EP4 促效劑 ONO-AE1-437 (0.01mg/kg , sc) 之 PRA 上升抑制了 102% 。

[0035]

試驗例 7 : 對於 2 型糖尿病 db/db 小鼠之尿中白蛋白之效果檢討試驗

試驗係使用 2 型糖尿病 db/db 小鼠 (雄性 , 8 週齡) 。使用抗小鼠白蛋白抗體 (RAM/Alb/7S , Nordic Immunology) 以 ELISA 法測定由 24 小時採尿所得之尿樣品中之白蛋白濃度 , 使用 CRE-EN KAINOS (KAINOS) 測定尿中肌酸酐濃度。算出尿中白蛋白 - 肌酸酐比 (ACR) , 以不偏向 ACR 之方式以受驗化合物非處置群 (n=12) 及受驗化合物處置群 (n=12) 進行分群。對受驗化合物處置群將懸浮於 0.5% 甲基纖維素 (MC) 溶液之受驗化合物以 0.3mg/kg 每日 1 次經口投予 1 週 (10mL/kg) 。對受驗化合物非處置群將 0.5% MC 溶液以 10mL/kg 之投予容量每日 1 次經口投予 1 週。最終投予結束後實施 24 小時採尿 , 以算出之 ACR 為指標 , 檢討受驗化合物對於 2 型糖尿病小鼠之早期腎病之改善效果。求出將受驗化合物非處置群之 ACR 值設為 100% 時之受驗化合

物處置群之 ACR 之抑制率。

評價結果，由化合物 A (0.3mg/kg, po) 經口投予 1 週後 2 型糖尿病 db/db 小鼠之 ACR 抑制了 44%。

[0036]

試驗例 8：對於 5/6 腎臟摘出 (5/6Nx) 慢性腎衰竭大鼠之腎功能之效果檢討試驗

試驗係使用 Wistar 大鼠 (雄性, 8 週齡)。在戊巴比妥麻醉下切除左腎之三分之二，其一週後全摘出右腎 (5/6Nx)。5/6Nx 之 2 週後，使用 Bio-Rad 蛋白質分析套組測定 24 小時採尿所得之尿樣本中之尿蛋白質濃度，使用 DETAMINA-L CRE (KYOWA MEDEX) 測定尿中肌酸酐濃度。算出尿中蛋白質-肌酸酐比 (UPCR)，以不偏向 UPCR 之方式以受驗化合物非處置群 (n=12) 及受驗化合物處置群 (n=12) 進行分群。隨後，對受驗化合物處置群將懸浮於 0.5% MC 溶液之受驗化合物以 0.2mg/kg 每日 1 次經口投予 6 週 (5mL/kg)。對受驗化合物非處置群將 0.5% MC 溶液以 5mL/kg 之投予容量每日 1 次經口投予 6 週。最終投予結束後實施 24 小時採尿，以算出之 UPCR 為指標，檢討受驗化合物對於慢性腎衰竭大鼠之腎功能之改善效果。求出將受驗化合物非處置群之 UPCR 值設為 100% 時之受驗化合物處置群之 UPCR 之抑制率。

評價結果，由化合物 A (0.2mg/kg, po) 經口投予 6 週後 5/6 腎臟摘出慢性腎衰竭大鼠之 UPCR 抑制了 47%。

[0037]

試驗例 9：對於大鼠 EP1/EP2/EP3 受體之受體拮抗作用評價試驗（選擇性試驗）

評價化合物 A 對於源自大鼠之 PGE2 受體之其他亞型（EP1、EP2、EP3）之拮抗作用。關於 EP1 及 EP2 係以細胞內 Ca^{2+} 量為指標，關於 EP2 係以細胞內之 cAMP 量為指標，檢討受驗化合物之作用。

大鼠 EP1、EP2 或 EP3 受體表現載體之構築：

將表現載體 pcDNA3.1-V5-His-TOPO（Invitrogen）分別導入大鼠 EP1 受體基因（GenBank 註冊編號：D88751.1）、大鼠 EP2 受體基因（GenBank 註冊編號：NM_031088.1）、或大鼠 EP3 受體基因（GenBank 註冊編號：NM_012704.1）。

大鼠 EP1、EP2 或 EP3 受體安定表現細胞之構築：

將大鼠 EP1、EP2 或 EP3 受體之表現載體導入 HEK-293（大鼠 EP1 或 EP3 受體安定表現用，ATCC 編號：CRL-1573）或 CHO-K1 細胞（大鼠受體 EP2 受體安定表現用，ATCC 編號：CCL-61）。導入係使用 Lipofectamine（註冊商標）2000 試藥（Invitrogen），依據所附說明書進行。導入後以含有 G418（Nacalai Tesque）之 D-MEM 培養基（大鼠 EP1 或 EP3 受體安定表現用）（型號 11885084，Invitrogen）或含有 G418 之 α -MEM 培養基（大鼠 EP2 受體安定表現用）培養細胞，取得抗藥性細胞株。

EP2 受體安定表現細胞之培養及化合物處理：

將已安定表現大鼠 EP2 之 CHO-K1 細胞於 96 孔盤中以 1×10^4 個/100 μ L 播種，使用添加 10% FBS 之 α -MEM 培養基於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 之條件下培養隔夜。將培養基更換成 2 μ mol/L 吲哚美辛/0.1% BSA/ α -MEM 培養基，再 60 分鐘後，更換成 1mmol/L IBMX/2 μ mol/L 吲哚美辛/0.1% BSA/ α -MEM 培養基（型號 12571063，Invitrogen）。10 分鐘後，添加受驗化合物（最終濃度 0.01、0.1、1 及 10 μ mol/L），再 10 分鐘後，以使最終濃度成為 100nmol/L 之方式添加 PGE2（最終 DMSO 濃度 0.1%）。為了算出因添加 PGE2 之 cAMP 產生量，設置 PGE2 未添加群。使細胞於 CO₂ 培養器（37 $^{\circ}$ C，5% CO₂）內培養並反應。30 分鐘後去除培養基，添加 0.2% TritonX-PBS 100 μ L/孔將細胞溶解。試驗以一次兩份（duplicate）實施 1 次。

EP2 受體安定表現之細胞內之 cAMP 量之測定及解析：

使用 cAMP HiRange 套組與試驗例 4 同樣測定細胞溶解液中所含之 cAMP 量。將添加最終濃度 100nmol/L 之 PGE2 時之 cAMP 量設為 100%，將 PGE2 未添加時之 cAMP 量設為 0%，算出受驗化合物處理時之 cAMP 量之比例。

評價結果，化合物 A 對於透過大鼠之 EP2 受體因 PGE2 所引起之細胞內 cAMP 量增加，即便於 10,000 nmol/L 亦未顯示 50%以上之阻礙作用。

EP1 及 EP3 受體安定表現細胞之培養及化合物處理：

將已安定表現大鼠 EP1 或 EP3 之 HEK-293 細胞於 96 孔盤中以 1×10^4 個/100 μ L 播種，使用添加 10% FBS 之 D-MEM 培養基於 37°C、5% CO₂ 之條件下培養隔夜。於分析緩衝液（1 $\times$ HBSS，20mmol/L HEPES-NaOH（pH7.4），0.6mg/mL 丙磺舒（probenecid），0.1% BSA）中以 70：1 之比例添加 Ca³ 分析套組（Molecular Devices）之螢光試藥 Dye。將培養基更換成該稀釋之 Dye 溶液，培育 3 小時。於其中添加 DMSO 及溶解於上述分析緩衝液中之化合物（最終濃度 1 及 10 μ mol/L）。5 分鐘後，以成為最終濃度 100nmol/L 之方式添加 PGE2（最終 DMSO 濃度 1%）。使用大鼠 EP1 或大鼠 EP3 受體安定表現細胞之試驗各以一次兩份（duplicate）實施 1 次。

EP1 及 EP3 受體安定表現細胞內之 Ca²⁺濃度之測定及解析：

細胞內 Ca²⁺濃度係使用 FLIPR tetra（Molecular Devices）測定 Dye 之螢光強度作為指標。為了測定因添加 PGE2 之細胞內 Ca²⁺濃度，而設置 PGE2 未添加群。將添加最終濃度 100nmol/L PGE2 時之 Ca²⁺濃度設為 100%，將 PGE2 未添加時之 Ca²⁺濃度設為 0%，算出化合物處理時之 Ca²⁺濃度之比例。

評價結果，化合物 A 對於透過大鼠之 EP1 或 EP3 受

體因 PGE₂ 所引起之細胞內 Ca²⁺ 濃度之上升，即便於 10,000nmol/L 亦未顯示 50%以上之阻礙作用。

[0038]

試驗例 10：對大鼠消化道障礙之評價

使用 SD 大鼠（雄性，7 週齡）。將溶解於 PEG400：20% Tween 80：1mol/L NaHCO₃ 水溶液=1：4：5 之混合液中之受驗化合物以 3mg/kg 經口投予 7 天（n=5，5mL/kg）。於受驗藥非處置群（n=5）以 5mL/kg 之投予容量經口投予上述混合液 7 天。於最終投予之隔天整夜絕食下採血供血液學・血液化學檢查用。採血後，藉由放血予以安樂死之動物立即予以解剖，摘出胃、十二指腸、空腸、迴腸、盲腸、結腸、直腸、肝臟。摘出臟器固定於 10%中性緩衝福馬林液中，使用於病理組織評價。

評價結果，化合物 A 未確認到顯示異常之結果。

[0039] 上述試驗結果，確認化合物 A 具有 EP4 受體親和性，顯示優異之 EP4 受體拮抗作用（試驗例 1~5）。確認化合物 A 可抑制 EP4 促效劑誘發之 PRA 上升（試驗例 6）。確認化合物 A 針對於 2 型糖尿病 db/db 小鼠之尿中白蛋白之效果檢討試驗以及對於 5/6 腎臟摘出（5/6Nx）慢性腎衰竭大鼠之腎功能之效果檢討試驗中具有改善效果（試驗例 7、8）。

因此，化合物 A 或其鹽可使用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療等。

[0040] 由上述試驗例 1 之結果，化合物 A 與專利文

獻 1 之實施例 205 比較，顯示 EP4 受體親和性較優異。進而由上述試驗例 10 之結果，化合物 A 顯示係引起消化道障礙之顧慮較小之化合物。

[0041] 上述試驗之結果確認化合物 A 或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，可使用作為 EP4 所參與之各種疾病之預防或治療用醫藥組成物等之有效成分。EP4 所參與之各種疾病可列舉出例如腎臟病（例如，腎硬化症、痛風腎、多發性囊胞腎、腎病徵候群、急性腎炎、再發性血尿、持續性血尿、慢性腎炎、急速進行性腎炎、急性腎衰竭、慢性腎衰竭、糖尿病性腎症、巴特氏徵候群（Bartter syndrome）等）、炎症性皮膚疾病（例如，曬傷、燙傷、濕疹、皮膚炎等）、動脈硬化症引起之虛血性心疾病（例如心肌梗塞、狹心症等）、起因於動脈硬化症之腦血管障礙（例如，腦中風、亦包含小間隙梗塞（lacunar infarction）之腦中風、腦血栓、腦出血、蜘蛛膜下腔出血、腦梗塞等）、消化性潰瘍（例如，胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、惡性腫瘤及其轉移（例如結腸癌、乳癌等）、疼痛（例如術後急性痛、外傷性疼痛、拆線後疼痛、頸肩腕疼痛、肩關節周圍炎、變形性關節炎（OA）、手根管徵候群、風濕性慢性關節炎（RA）、術後慢性痛、間質性膀胱炎、膀胱痛症候群、非細菌性慢性前列腺炎（CP/CPPS）、脊髓損傷後疼痛、腦梗塞後疼痛、多發性硬化症（疼痛）、帕金森氏症之疼痛、糖尿病性伸經因性疼痛、帶狀疱疹後疼痛、HIV 神經因性疼痛、三叉神經痛、

纖維肌痛症、腰痛症（包含侵害受容性、神經因性之腰痛全部）、腰部脊柱管狹窄症、脊椎障礙之疼痛（腰部脊柱管狹窄症、脊椎損傷除外）、腦丘性疼痛（thalamic pain）、偏頭痛、頭痛、下肢不靜止（腿部不安症）（restless legs））徵候群、癌性疼痛、過敏性腸徵候群）等，尤其是慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症等腎臟病。

又，化合物 A 或其鹽可使用作為各種浮腫（例如，心臟性浮腫、腦浮腫等）、如惡性高血壓症等之高血壓症、月經前緊張症、尿路結石、如因急性或慢性疾病引起之缺尿症、高磷血症等之治療及/或預防之藥劑。

再者，化合物 A 或其鹽可使用作為各種多尿症（例如，中樞性尿崩症、腎性尿崩症、心因性尿崩症、糖尿病、氯化鈉吸收障礙、多飲症等）之治療及/或預防之藥劑。

[0042] 含有化合物 A 或其鹽作為有效成分之醫藥組成物可使用該領域中常用之賦形劑，亦即藥劑用賦形劑或藥劑用擔體等，以慣用方法調製。

投予可為利用丸劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑、液劑等經口投予，或關節內、靜脈內、肌肉內等之注射劑，以栓劑、點眼劑、眼軟膏、經皮用液劑、軟膏劑、經皮用貼劑、經黏膜液劑、經黏膜貼劑、吸入劑等之非經口投予之任一種形態。

[0043] 經口投予用之固體組成物係使用錠劑、散劑、顆粒劑等。該固體組成物中，使有效成分與至少一種

惰性之賦形劑混合。組成物根據慣用方法亦可含有惰性添加劑，例如滑澤劑或崩解劑、安定化劑、溶解輔助劑。錠劑或丸劑亦可視需要以糖衣或胃溶性或腸溶性物質之薄膜被膜。

經口投予用之液體組成物包含藥劑上容許之乳懸劑、溶液劑、懸浮劑、糖漿劑或酏劑等，且包含一般使用之惰性稀釋劑，例如純水或乙醇。該液體組成物除惰性稀釋劑以外亦可含有如可溶化劑、潤濕劑、懸浮劑之輔助劑、甜味劑、矯味劑、芳香劑、防腐劑。

[0044] 非經口投予用之注射劑含有無菌之水性或非水性之溶液劑、懸浮劑或乳濁劑。水性之溶劑包含例如注射用蒸餾水或生理食鹽液。非水性之溶劑有例如乙醇之醇類。該組成物亦可進一步包含等張化劑、防腐劑、潤濕劑、乳化劑、分散劑、安定化劑、或溶解輔助劑。該等係通過例如保留細菌之過濾器過濾，藉由調配殺菌劑或照射而無菌化。此外，該等亦可製造無菌之固體組成物，在使用前溶解或懸浮於無菌水或無菌之注射用溶劑中使用。

[0045] 外用劑包含軟膏劑、硬膏劑、乳霜劑、凝膠劑、貼劑、噴霧劑、洗液劑、點眼劑、眼軟膏等。含有一般所用之軟膏基劑、洗液基劑、水性或非水性之液劑、懸浮劑、乳劑等。

[0046] 吸入劑或經鼻劑等經黏膜劑可使用液體或半固體狀者，依據過去習知之方法製造。亦可適當添加例如習知之賦形劑，進而亦可適當添加 pH 調整劑、防腐劑、

界面活性劑、潤澤劑、安定劑或增黏劑等。投予可使用適當吸入或吹送用之裝置。例如，可使用計量投予吸入裝置等習知之裝置或噴霧器，將化合物單獨作成粉末或作成經處方之混合物粉末，或與醫藥可容許之擔體組合作成溶液或懸浮液投予。乾燥粉末吸入器等可為單次或多次投予用者，亦可利用乾燥粉末或含粉末之膠囊。或者，亦可使用適當之推進劑例如氯氟烷或二氧化碳等適當氣體之加壓氣溶噴霧器等之形態。

[0047] 通常經口投予時，每日投藥量較適當為每單位體重約為 0.001~100mg/kg，較好為 0.1~30mg/kg，更好為 0.1~10mg/kg，其可為 1 次投予或分成 2 次~4 次投予。靜脈內投予時，每日投予量較好為每單位體重約 0.0001~10mg/kg，1 天 1 次~分成複數次投藥。此外，經黏膜劑係將每單位體重約 0.001~100mg/kg 以 1 天 1 次~分成複數次投予。投藥量係考慮症狀、年齡、性別等依據個別情況適當決定。

[0048] 依據投予路徑、劑形、投予部位、賦形劑或添加劑之種類而異，但本發明之醫藥組成物含有 0.01~100 重量%，其樣態為 0.01~50 重量%之有效成分的 1 種或以上之化合物 A。

[0049] 化合物 A 可與認為化合物 A 能顯示有效性之疾病之各種治療劑或預防劑併用。該併用可同時投予、或個別連續投予、或亦可間隔期望時間間隔投予。同時投予製劑可為調配劑亦可經個別製劑化。

實施例

[0050] 以下，基於實施例，更詳細說明以式 (I) 表示之化合物 A 或其鹽之製造法。化合物 A 或其鹽之製造法並非僅限於以下所示之具體實施例之製造法（步驟），亦可以本技藝者本身了解之方法製造。

又，DSC 分析及粉末 X 射線繞射係藉以下方法進行。

[0051]

(1) DSC 分析

DSC 分析係使用 TA 儀器製之 Q1000 及 Q2000 進行。將試料約 2mg 填充於專用之鋁製樣品盤中，在樣品盤未加蓋之狀態下，在氮氣氛圍下（50mL/分鐘），將測定範圍設為室溫~300℃，以升溫速度 10℃/分鐘連續測定在試料與對照盤（空的鋁製樣品盤）間產生之熱量變化並加以記錄。又，包含數據處理之裝置之操作係依據各裝置中指示之方法及順序。

(2) 粉末 X 射線繞射

粉末 X 射線繞射之測定係使用 RINT-TTRII，以下列條件測定：燈管：Cu，管電流：300mA，管電壓：50kV，取樣寬：0.020°，掃描速度：4°/min，波長：1.54056Å，測定繞射角範圍（2θ）：2.5~40°。又，包含數據處理之裝置之操作係根據各裝置中指示之方法及順序。

[0052] 又，實施例中，使用以下之簡寫。ESI+：

ESI-MASS 中之 m/z 值，NMR-DMSO- d_6 ：DMSO- d_6 中之 ^1H NMR 中之波峰 δ (ppm)。

又方便起見，濃度 mol/L 以 M 表示。例如，1M 氫氧化鈉水溶液意指 1mol/L 之氫氧化鈉水溶液。

[0053]

實施例 1

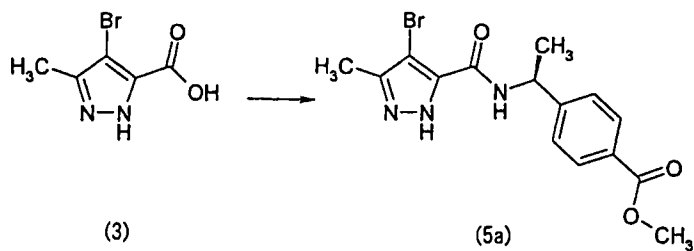
4-[(1S)-1-({[4-溴-1-(異噁嗪-3-基甲基)-3-甲基-1H-吡唑-5-基]羰基}胺基)乙基]苯甲酸(I)之合成

[0054]

步驟 1.

4-[(1S)-1-{[(4-溴-3-甲基-1H-吡唑-5-基)羰基]胺基}乙基]苯甲酸甲酯(5a)之合成

[化13]



於 4-溴-3-甲基-1H-吡唑-5-羧酸(3)(1.00g)、DMF(20mL)、4-[(1S)-1-胺基乙基]苯甲酸甲酯鹽酸鹽(1.26g)、HOBt(0.99g)之混合物中添加 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺(1.2mL)，在室溫下隔夜攪拌。於混合物中添加乙酸乙酯，在冰冷下攪拌。於混合物中添加 10%檸檬酸水溶液，分離成有機層及水層，以乙酸乙酯萃取水層。合併所得有機層，以飽和碳酸氫鈉水溶液、

水、飽和食鹽水依序洗淨，以無水硫酸鎂乾燥後，過濾。減壓下濃縮濾液，獲得 4-[(1S)-1-{[(4-溴-3-甲基-1H-吡唑-5-基)羰基]胺基}乙基]苯甲酸甲酯 (5a) (1.75g)。

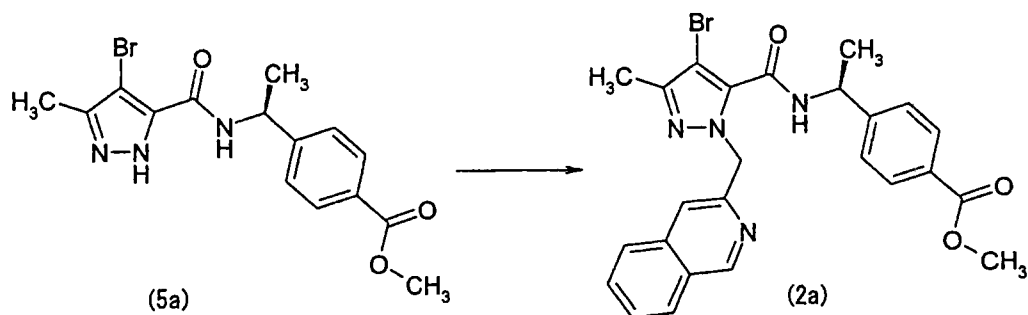
ESI+ : 366 , 368

[0055]

步驟 2.

4-[(1S)-1-({[4-溴-1-(異喹啉-3-基甲基)-3-甲基-1H-吡唑-5-基]羰基}胺基)乙基]苯甲酸甲酯 (2a) 之合成

[化14]



在冰冷下攪拌 4-[(1S)-1-{[(4-溴-3-甲基-1H-吡唑-5-基)羰基]胺基}乙基]苯甲酸甲酯 (5a) (1.72g)、DMF (20.0mL) 之混合物。將第三丁氧基鉀 (580mg) 添加於混合物中，攪拌 0.5 小時。於混合物中添加 3-(溴甲基)異喹啉 (1.10g) 與 DMF (14mL) 之混合物，升溫至室溫攪拌 10 天。冰冷下攪拌所得混合物，添加乙酸乙酯、10%檸檬酸水溶液，持續攪拌且以乙酸乙酯萃取。所得有機層以飽和碳酸氫鈉水溶液、水、飽和食鹽水依序洗淨，以無水硫酸鎂乾燥後，過濾。減壓濃縮濾液，殘留物以矽膠管柱層析 (正己烷：乙酸乙酯=6：4) 純化，獲得 4-

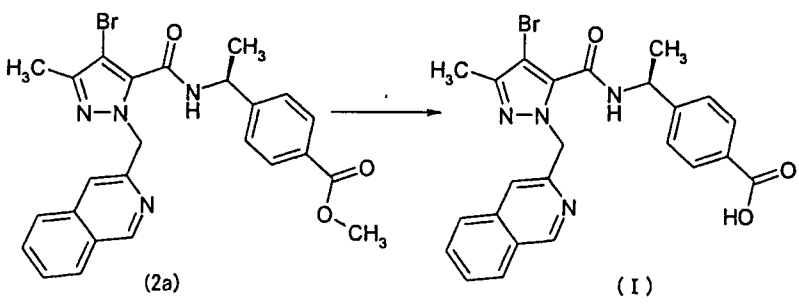
[(1S)-1- ({[4-溴 -1- (異 喹 啉 -3-基 甲 基) -3-甲 基 -1H-吡 啶 -5-基]羰 基 }胺 基) 乙 基]苯 甲 酸 甲 酯 (2a) (518mg) 。

NMR-DMDO-d₆ : 9.28 (1H , d , J=7.8 Hz) , 9.23 (1H , s) , 8.13 (1H , d , J=7.8 Hz) , 7.89 (1H , d , J=7.8 Hz) , 7.81-7.76 (1H , m) , 7.72-7.64 (3H , m) , 7.50 (1H , s) , 7.38 (2H , d , J=8.3 Hz) , 5.65-5.54 (2H , m) , 5.12-5.04 (1H , m) , 3.83 (3H , s) , 2.17 (3H , s) , 1.37 (3H , d , J=7.0 Hz)

[0056]

步驟 3.

4-[(1S)-1- ({[4-溴 -1- (異 喹 啉 -3-基 甲 基) -3-甲 基 -1H-吡 啶 -5-基]羰 基 }胺 基) 乙 基]苯 甲 酸 (I) 之 合 成
[化15]



於 4-[(1S)-1- ({[4-溴 -1- (異 喹 啉 -3-基 甲 基) -3-甲 基 -1H-吡 啶 -5-基]羰 基 }胺 基) 乙 基]苯 甲 酸 甲 酯 (2a) (486mg) 、 THF (10.0mL) 、 甲 醇 (10.0mL) 之 混 合 物 中 , 添 加 冰 冷 下 之 2M 氫 氧 化 鈉 水 溶 液 (5.0mL) , 在 室 溫 攪 拌 17 小 時 。 於 混 合 物 中 添 加 冰 冷 卻 下 之 1M 鹽 酸 (10.0mL) , 升 溫 至 室 溫 , 攪 拌 2 小 時 。 過 濾 析 出 之 固 體 , 以 水 洗 淨 獲 得 4-[(1S)-1- ({[4-溴 -1- (異 喹 啉 -3-基 甲

基)-3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基)乙基]苯甲酸(I)
(411mg)之結晶。

ESI+: 493, 495

NMR-DMSO- d_6 : 12.9-12.7 (1H, m), 9.30 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 9.24 (1H, s), 8.13 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 7.91 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 7.81-7.76 (1H, m), 7.74-7.66 (3H, m), 7.53 (1H, s), 7.40 (2H, d, $J=8.2$ Hz), 5.60 (2H, s), 5.14-5.03 (1H, m), 2.16 (3H, s), 1.37 (3H, d, $J=7.0$ Hz)

元素分析: 對 $C_{24}H_{21}BrN_4O_3$ 之計算值: C, 58.43; H, 4.29; N, 11.36; Br, 16.20。

實測值: C, 58.33; H, 4.38; N, 11.24; Br, 16.07。

[0057] 實施例 1 之步驟 3 所得之結晶之使用 Cu 作為燈管進行粉末 X 射線繞射測定之結果獲得含 $2\theta(^{\circ})=5.7$ 、 7.9 、 8.3 、 8.9 、 9.2 、 11.5 、 12.5 、 13.1 、 15.8 、 16.3 、 16.7 、 17.2 、 17.9 、 18.5 及 19.5 之波峰之圖譜。

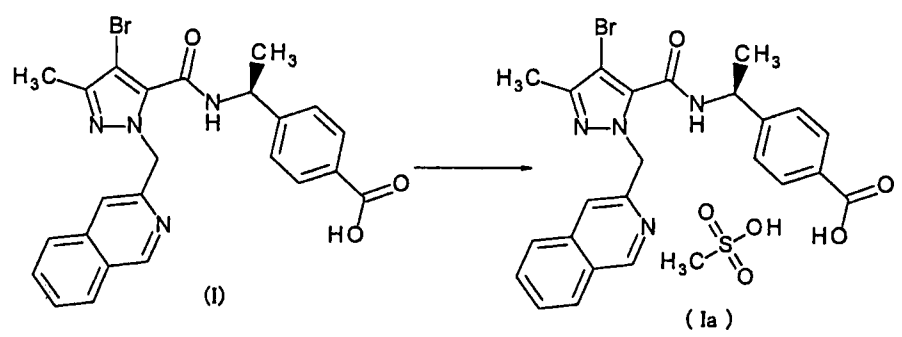
實施例 1 之步驟 3 所得之結晶之 DSC 分析之結果，吸熱波峰之起始溫度為 253°C 。

[0058]

實施例 2

4-[(1S)-1-({[4-溴-1-(異喹啉-3-基甲基)-3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基)乙基]苯甲酸甲烷磺酸鹽(Ia)之合成

[化16]



在冰冷下將甲烷磺酸（140 μ L）添加於 4-[(1S)-1-（{[4-溴-1-（異喹啉-3-基甲基）-3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基）乙基]苯甲酸（I）（1000.0mg）、二噁烷（30mL）之混合物中。使所得混合物升溫至 90 $^{\circ}$ C，攪拌 1 小時。放冷至室溫後，過濾析出之固體，獲得 4-[(1S)-1-（{[4-溴-1-（異喹啉-3-基甲基）-3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基）乙基]苯甲酸甲烷磺酸鹽（Ia）之結晶（1030mg）。

ESI+：493、495

NMR-DMSO- d_6 ：9.32（1H，s），9.27（1H，d， J =7.7 Hz），8.17（1H，d， J =7.9 Hz），7.95（1H，d， J =7.9 Hz），7.90-7.79（1H，m），7.77-7.66（3H，m），7.59（1H，s），7.40（2H，d， J =7.8 Hz），5.71-5.54（2H，m），5.16-5.00（1H，m），2.33（3H，s），2.17（3H，s），1.37（3H，d， J =7.1 Hz）

元素分析：對 C₂₄H₂₁BrN₄O₃.CH₄O₃S 之計算值：C，50.94；H，4.27；N，9.50；S，5.44；Br，13.56。

實測值：C，50.65；H，4.25；N，9.36；S，5.41；

Br, 13.42。

[0059] 實施例 2 所得之結晶之使用 Cu 作為燈管進行粉末 X 射線繞射測定之結果獲得含 $2\theta (^{\circ}) = 4.7、9.5、12.0、13.2、13.7、15.3、18.8、20.3、20.9$ 及 22.8 之波峰之圖譜。

實施例 2 所得之結晶之 DSC 分析之結果，吸熱波峰之起始溫度為 192℃。

〔產業上之可利用性〕

[0060] 化合物 A 或其鹽具有 EP4 受體拮抗作用，可使用作為慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎症之預防及/或治療用醫藥組成物之有效成分。

申請專利範圍

1. 一種化合物，其係 4-[(1S)-1- ({[4-溴-1- (異喹啉-3-基甲基) -3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基) 乙基]苯甲酸或其鹽。

2. 如請求項 1 之化合物，其係 4-[(1S)-1- ({[4-溴-1- (異喹啉-3-基甲基) -3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基) 乙基]苯甲酸甲烷磺酸鹽。

3. 如請求項 2 之化合物，其係 4-[(1S)-1- ({[4-溴-1- (異喹啉-3-基甲基) -3-甲基-1H-吡啶-5-基]羰基}胺基) 乙基]苯甲酸甲烷磺酸鹽之結晶。

4. 如請求項 3 之化合物，其係於 DSC 分析中之吸熱波峰之起始溫度 (onset temperature) 為 192℃，且燈管使用 Cu 之粉末 X 射線繞射中，於 $2\theta (^{\circ}) = 4.7$ 、9.5、12.0、13.2、13.7、15.3、18.8、20.3、20.9、及 22.8 具有波峰之結晶。

5. 一種醫藥組成物，其含有如請求項 1 之化合物或其鹽、及製藥學上容許之賦形劑。

6. 一種醫藥組成物，其係慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用且含有如請求項 5 之化合物或其鹽、及製藥學上容許之賦形劑。

7. 一種如請求項 1 之化合物或其鹽之用途，其係用於製造慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療用醫藥組成物。

8. 如請求項 1 之化合物或其鹽，其係用於慢性腎衰

竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療。

9. 一種如請求項 1 之化合物或其鹽之用途，其係用於慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療。

10. 一種慢性腎衰竭及/或糖尿病性腎病之預防或治療方法，其係將有效量之如請求項 1 之化合物或其鹽投予至對象而成。

11. 一種醫藥組成物，其含有如請求項 3 之結晶、及製藥學上容許之賦形劑。