



(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 201038552 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：099103103

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C07D401/12 (2006.01)

C07D401/10 (2006.01)

A61K31/4709(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/02/04 歐洲專利局 09152089.0

(71)申請人：健生藥品公司 (比利時) JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (BE)

比利時

(72)發明人：雪潔斯 布魯諾 SCHOENTJES, BRUNO (FR)；戴肯斯 蘇菲 DESCAMPS, SOPHIE (FR)；安柏藍德 納瑟莉 AMBLARD, NATHALIE CLAUDIE ISABELLE (FR)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 130 頁

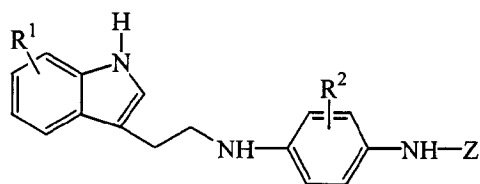
(54)名稱

用作抗癌劑之吲哚衍生物

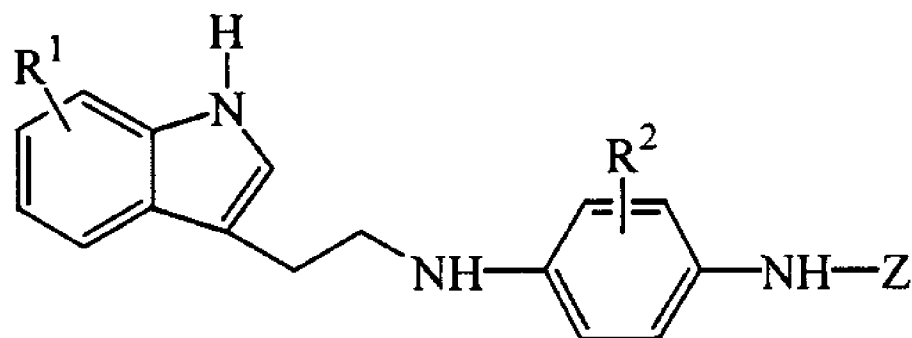
INDOLE DERIVATIVES AS ANTICANCER AGENTS

(57)摘要

本發明提供式(I)化合物、其於治療癌症上之用途、及包含該式(I)化合物之醫藥組成物。



(I)



(I)



(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 201038552 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：099103103

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C07D401/12 (2006.01)

C07D401/10 (2006.01)

A61K31/4709(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/02/04 歐洲專利局 09152089.0

(71)申請人：健生藥品公司 (比利時) JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. (BE)

比利時

(72)發明人：雪潔斯 布魯諾 SCHOENTJES, BRUNO (FR)；戴肯斯 蘇菲 DESCAMPS, SOPHIE (FR)；安柏藍德 納瑟莉 AMBLARD, NATHALIE CLAUDIE ISABELLE (FR)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 130 頁

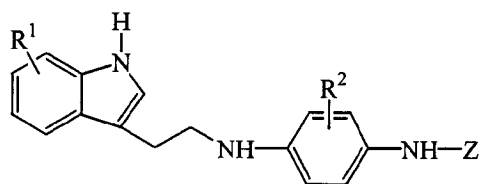
(54)名稱

用作抗癌劑之吲哚衍生物

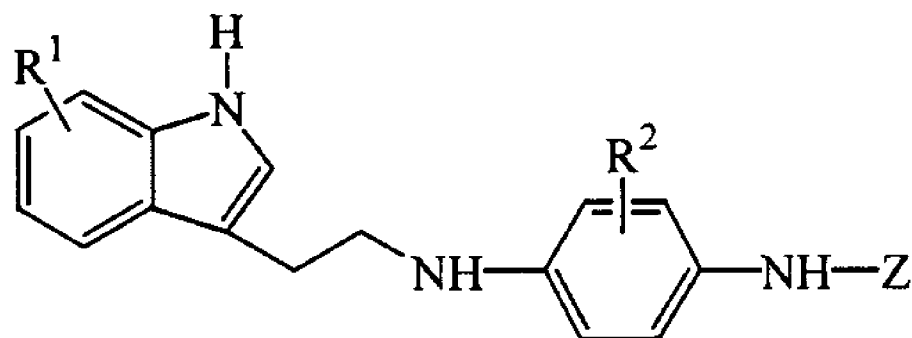
INDOLE DERIVATIVES AS ANTICANCER AGENTS

(57)摘要

本發明提供式(I)化合物、其於治療癌症上之用途、及包含該式(I)化合物之醫藥組成物。



(I)



(I)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於吡啶化合物及含該作為抗癌劑之化合物的組成物。此外，本發明提供所揭示化合物之製備方法、含其之組成物及使用其之方法，例如作為一種藥劑，特別是用於治療癌症。

本申請案主張歐洲專利申請案 No. 09152089.0 之優先權，其併於本文參考。不受任何理論所拘束，現今認為，雖然在腫瘤細胞生物學中，MDM2 及 p53 代表關鍵要素，且在對於細胞損傷或緊迫的細胞反應上具有關鍵角色，儘管本化合物增加 p53 之表現，藉由本化合物引出其之已證實有效的臨床前抗腫瘤活性，似乎其不能代表主要分子標靶。最初的觀察資料指出在 DNA 合成及/或複製-緊迫反應上直接或間接的效果作為支持所觀察到的化合物臨床前抗腫瘤活性。本化合物在缺乏 p53、缺乏機能性 p53、或具有突變之 p53 之腫瘤細胞亦呈現抗增殖效果，此外，其可使腫瘤形成細胞對於化學療法及放射療法敏感。

【先前技術】

p53 為一種腫瘤抑制因子蛋白質，其在調節細胞增殖與細胞生長抑止/細胞凋零之間的平衡上扮演一種樞紐的角色。在正常狀況下，p53 之半生期非常短暫，因此 p53 在細胞中之濃度很低。然而，對於細胞 DNA 損害或細胞緊迫(例如致癌基因活化、端粒(telomere)蝕化、組織缺氧)的反應，p53

之濃度增加。此增加 p53 濃度導致活化驅動細胞進入生長抑止或進入細胞凋零程序之一些基因的轉錄。因此，p53 重要的功能是避免受損細胞不受控制之增殖，從而保護生物避免癌症生長。本文所使用之“MDM2”(鼠雙微粒體 2; Murine Double Minute 2)一詞意指由於 mdm2 基因表現而獲得之蛋白質。在此術語之意義內，MDM2 包含所有經 mdm2 編碼之蛋白質、期之突變體，或者是其薄片蛋白質(slice protein)、及其磷酸化蛋白質。此外，如本文中所使用，“MDM2”一詞包括 MDM2 類似物，例如 MDMX，亦已知為 MDM4，及 MDM2 同系物及其他動物之類似物，例如人類同系物 HDM2 或人類類似物 HDMX。MDM2 為一種 p53 功能之關鍵負調節劑，其經由結合至 p53 之胺基端反式激活域(transactivation domain)形成負的自動調節環，因此 MDM2 抑制 p53 活化轉錄之能力及將 p53 蛋白質水解降解。在正常狀況下，此調節環是維持 p53 低濃度的原因。

JP11130750 尤其敘述經取代苯基胺基羰基吲哚基衍生物，作為 5-HT 受體拮抗劑。

EP1129074 敘述鄰胺苯甲酸醯胺，作為血管內皮生長因子受體(VEGFR)之抑制劑，並用於治療血管生成疾病。WO01/42224 提供羧基醯胺衍生物，用於治療阿滋海默症。EP1317443 揭示三環三級胺衍生物，使用作為趨化素(chemokine)受體 CXCR4 或 CCR5 調控劑，用於治療人類免疫不全病毒及貓

免疫不全病毒。

EP1379239 揭示 N-(2-芳基乙基)苯甲基胺，作為 5-HT₆ 受體之拮抗劑。WO00/15357 提供哌啶-4-苯基衍生物，作為 MDM2 與 p53 間相互作用之抑制劑。EP1137418 提供三環化合物，用於恢復 p53 家族蛋白質之構形安定性。WO03/040402 提供抑制蛋白質間相互作用之化合物，例如 MDM2 與 p53 間之相互作用。EP1443937 敘述經取代 1,4-苯并二氮吡 (benzodiazepines) 及其作為 MDM2-p53 相互作用抑制劑之用途。EP1458380 提供順-2,4,5-三苯基-咪唑酮，其抑制 MDM2 蛋白質與類 p53 胜肽之相互作用，並具有抗增殖活性。

EP1519932 揭示雙芳基磺醯胺化合物，其結合至 MDM2，並可用於癌症治療。

WO2006/032631 、 WO2007/107543 、
WO2007/107545 、 WO2009/019274 、
WO2009/037308、及 WO2009/037343 揭示 MDM2
與 p53 相互作用之抑制劑。

對於腫瘤細胞生長具有有效抑制效果、具有寬廣的安全輪廓，及較少非所欲之副作用的小分子有所需求。

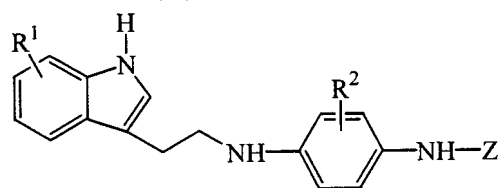
【發明內容】

本發明化合物顯示優異活體外活性及優異的活體內抗腫瘤效果，其對於 P450 酵素具有低親合性，降低不利的藥劑-藥劑相互作用的風險，容許較寬廣的安全限度。此外，本發明化合物具有低的藥

劑誘導神經效果，且具有改良的心血管輪廓，其可適宜地影響化合物之劑量限制毒性(dose limiting toxicity)。

本發明提供化合物、組成物、及治療癌症之方法。此外，本發明化合物及組成物用於增強化學療法及放射療法之效力。

本發明涉及式(I)化合物



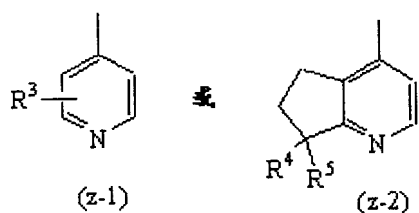
(I)

包括其任何立體化學異構型式，其中

R^1 為羥基 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基；前提為 R^1 取代基位於吲哚部分的位置6或7；

R^2 為氫或 C_{1-4} 烷基；

Z為選自下列之基



R^3 為氫或羥基 C_{1-4} 烷基；

R^4 為羥基或 C_{1-4} 烷氧基；

R^5 為氫或 C_{1-4} 烷基；或

R^4 及 R^5 結合在一起形成酮基；

其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

式(I)化合物亦可存在為其之互變異構型式，雖

然於上式中並未明確指出，這些型式意圖包括於本發明之範圍內。

本發明亦關於式(I)化合物於製造用於治療癌症之藥劑上之用途，及關於一種用於治療癌症之式(I)化合物。

用於前述定義及下文中的一些術語如下說明，這些術語有時依其使用或以組合術語使用。

做為基團或基團之一部分的 C_{1-4} 烷基定義為具有 1 至 4 個碳原子之直鏈或支鏈飽和碳氫殘基，例如甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基；做為基團或基團之一部分的 C_{1-6} 烷基定義為具有 1 至 6 個碳原子之直鏈或支鏈飽和碳氫殘基，例如 C_{1-4} 烷基所定義之基及戊基、己基、2-甲基丁基等。 C_{2-6} 烯基定義為含一雙鍵及具有 2 至 6 個碳原子之直鏈及支鏈碳氫殘基，例如乙烯基、2-丙烯基、3-丁烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、3-甲基-2-丁烯基等。

由取代基劃至環系統中的線表示鍵可連接至任何適當的環原子。

關於治療用途，式(I)化合物之鹽類為相對離子是醫藥上可接受者。然而，非醫藥上可接受之酸及鹼的鹽類亦可供給使用，例如在製備或純化醫藥上可接受化合物。所有鹽類，無論醫藥上可接受或不能接受者皆包含於本發明之範圍內。

前文或下文所述之醫藥上可接受鹽類意指包含式(I)化合物能夠形成之治療上活性無毒性酸加成鹽型式，後者可便利地經由以此適當之酸處理

鹼形式而獲得，該酸如無機酸，例如氫鹵酸，例如氫氯酸、氫溴酸等；硫酸；硝酸；磷酸等；或有機酸，例如乙酸、丙酸、羥基乙酸、2-羥基丙酸、2-酮基丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、馬來酸、富馬酸、蘋果酸、酒石酸、2-羥基-1,2,3-丙烷三羧酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、4-甲基苯磺酸、環己烷磺酸、2-羥基苯甲酸、4-胺基-2-羥基苯甲酸等酸。相反地，鹽型式可經由鹼處理轉變成游離鹼的型式。

含酸性質子之(I)化合物經由以適當有機及無機鹼處理，可轉變成其治療上活性無毒性金屬或胺加成鹽型式。如前文或下文中所述之醫藥上可接受鹽類意指亦包含式(I)化合物能夠形成之治療上活性無毒性金屬或胺加成鹽型式(鹼加成鹽型式)。適當的鹼加成鹽型式包含，例如銨鹽、鹼金屬及鹼土金屬鹽類，例如鋰、鈉、鉀、鎂、鈣鹽等、有機鹼之鹽類，例如一級、二級及三級脂族及芳族胺，例如甲胺、乙胺、丙胺、異丙胺、四丁基胺異構物、二甲胺、二乙胺、二乙醇胺、二丙胺、二異丙胺、二-正丁胺、吡咯啉、哌啉、嗎啉、三甲胺、三乙胺、三丙胺、吡啶、喹啉及異喹啉、苜星(benzathine)、*N*-甲基-D-還原葡糖胺、2-胺基-2-(羥基甲基)-1,3-丙二醇、海巴明(hydrabamine)鹽類、及具有胺基酸之鹽類，例如精胺酸、離胺酸等。相反地，鹽型式可經由酸處理轉變成游離酸的型式。

鹽類一詞亦包含四級銨鹽(四級胺)，經由式(I)

化合物之鹼性氮與適當之四級化試劑間之反應可形成式(I)化合物，該四級化試劑例如為任意地經取代之 C_{1-6} 烷基鹵化物、芳基鹵化物、 C_{1-6} 烷基羰基鹵化物、芳基羰基鹵化物、或芳基 C_{1-6} 烷基鹵化物，例如甲基碘或苯甲基碘、其中芳基代表未經取代或經取代之苯基。其它具有優異離去基之反應物亦可使用，例如 C_{1-6} 烷基 三氟甲烷磺酸酯、 C_{1-6} 烷基 甲烷磺酸酯、及 C_{1-6} 烷基 對甲苯磺酸酯。四級胺具有正電氮。醫藥上可接受相對離子包括氯、溴、碘、三氟乙酸根、乙酸根、三氟甲烷磺酸根、硫酸根、磺酸酯。可使用離子交換樹脂導入相對離子之選擇。

較佳地，鹽類一詞意指醫藥上可接受酸加成鹽型式及醫藥上可接受金屬或胺加成鹽型式。

溶劑化物一詞包含式(I)化合物可形成之水合物及溶劑加成型式，及其鹽類。此型式之實例例如為水合物、醇化物等。

將可察知一些式(I)化合物及其鹽類、及溶劑化物可包含一或多個對掌中心，並存在立體化學異構型式。

如前文中所使用，“式(I)化合物之立體化學異構型式”一詞定義經由相同鍵之順序鍵結相同原子，但具有不可交換之不同立體結構所組成之所有可能的化合物，其可具有式(I)化合物及其醫藥上可接受性鹽類或生理機能性衍生物。

除另有提及或指出外，化合物之化學命名代表

所有可能之立體化學異構型式的混合物，且各個別的式(I)異構型式及其鹽類或溶劑化物實質上不含相關其他異構物，即少於 50%，較佳地少於 20%，更佳地少於 10%，更佳地少於 5%，更佳地少於 2%，且最佳地少於 1%。因此，當式(I)化合物為例如特定為 R，此意指化合物實質上不含 S 異構物。或若式(I)化合物為例如特定為 E，此意指化合物實質上不含 Z 異構物。

尤其是，立體中心可具有 R-或 S-組態；在二價環(部分)飽和殘基上之取代基可具有順式-或反式-組態。包含雙鍵之化合物在該雙鍵上可具有 E (對側)或 Z (同側)-立體化學。術語順式、反式、R、S、E 及 Z 為熟悉技術者所熟知。

式(I)化合物之立體化學異構型式顯然地意圖包含於本發明之範圍內。

特別受關注的是立體化學上純的這些式(I)化合物。

依據 CAS-命名規定，當已知絕對組態之二個立體中心存在於分子中時，R 或 S 描述符號被指定(基於 Cahn-Ingold-Prelog 順序規則)為最小編號對掌中心，參考中心。使用相關描述符號[R*,R*]或[R*,S*]表示第二立體中心之組態，其中 R*經常被特定為參考中心，且[R*,R*]表示具有相同對掌之中心，且[R*,S*]表示不同對掌之中心。例如，若分子中最小編號對掌中心具有 S 組態，而第二中心為 R，立體描述符號將被特定為 S-[R*,S*]。若使用“ α ”及

“ β ”：在具有最低環數之環系統的不對稱碳原子上，最優先取代基之位置任意地經常位於環系統所決定之平均平面的“ α ”位置。在環系統中，相對於在參考原子上最優先取代基之位置，在其他不對稱碳原子上最優先取代基之位置，若其位於環系統所決定之平均平面的同側，則被命名為“ α ”，若其位於環系統所決定之平均平面的另一側，則被命名為“ β ”。

○ 當於本文使用時，述語順式及反式符合 Chemical Abstracts nomenclature (J. Org. Chem. 1970, 35 (9), 2849-2867)，且涉及環部分上取代基之位置。

○ 式(I)化合物可被合成為對映異構物之外消旋混合物形式，其可依技術中已知之解析程序相互分離。外消旋式(I)化合物可經由與適當對掌性酸反應，被轉換成對應之非鏡像異構鹽形式。隨後分離該非鏡像異構鹽形式，例如經由選擇性或部分結晶，並將對映異構物經由鹼解離。式(I)化合物之分離對映異構物形式的另一方式包含使用對掌性靜止相之液體層析。倘若反應立體特異性地發生，該純的立體化學異構型式亦可衍生自對應的適當起始物質之純立體化學異構型式，較佳地，若特定立體異構物為所欲，該化合物將經由製備之立體特異性方法合成，這些方法將有利地使用對映異構性純的起始物質。

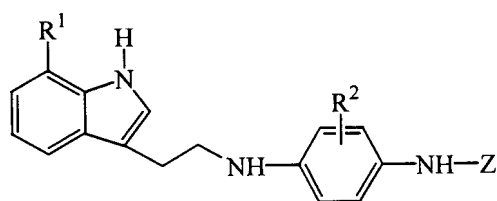
本發明亦意圖包括任何存在於本發明化合物

中之原子的同位素，例如氫之同位素，包括氘及氚，及碳之同位素，包括 C-13 及 C-14。

每當於下文使用時，"式(I)化合物"或"本發明化合物"表示亦包括醫藥上可接受鹽類，特別是酸或鹼(金屬或胺)加成鹽、所有立體異構型式、溶劑化物、及所有多型結晶型式或非晶型式。

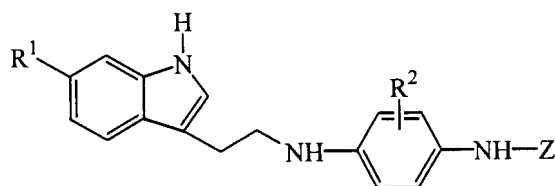
每當於前文或下文使用時，取代基各自可被獨立地自許多定義之列表中選出，所有可能之組合被預期為化學上可能的。

本發明令人關注的具體實施例為 R^1 取代基位於吲哚部分之位置 7 的這些式(I)化合物，因此，化合物具有下式



(I-a)

本發明令人關注的具體實施例為 R^1 取代基位於吲哚部分之位置 6 的這些式(I)化合物，因此，化合物具有下式



(I-b)

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)，其中 R^1 為羥基 C_{1-6} 烷基，特別是 $-CH_2-OH$ 、 $-C(CH_3)_2-OH$ 、 $-CH(CH_3)-OH$ 、

-CH₂-CH₂-OH 、 -CH(CH(CH₃)₂)-OH 、
-CH₂-CH₂-CHOH-CH₃，尤其是-C(CH₃)₂-OH。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)，其中 R¹ 為 C₂₋₆ 烯基，特別是 -CH=CH₂、-C(CH₃)=CH₂。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)或上述其之令人關注的具體實施例，其中 R² 為氫。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R² 為 C₁₋₄ 烷基，特別是甲基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R³ 代表氫。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R³ 代表羥基 C₁₋₄ 烷基，特別是 -CH₂-OH。較佳地，此 R³ 取代基位於吡啶部分之位置 2。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R⁴ 代表羥基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R⁴ 代表 C₁₋₄ 烷氧基，特別是甲氧基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^5 代表氫。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^5 代表 C_{1-4} 烷基，特別是甲基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^4 及 R^5 一起形成酮基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^4 為羥基且 R^5 為氫。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^4 為羥基且 R^5 為 C_{1-4} 烷基，特別是甲基。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 R^4 為 C_{1-4} 烷氧基且 R^5 為氫。

本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 Z 為式(z-1)之基。

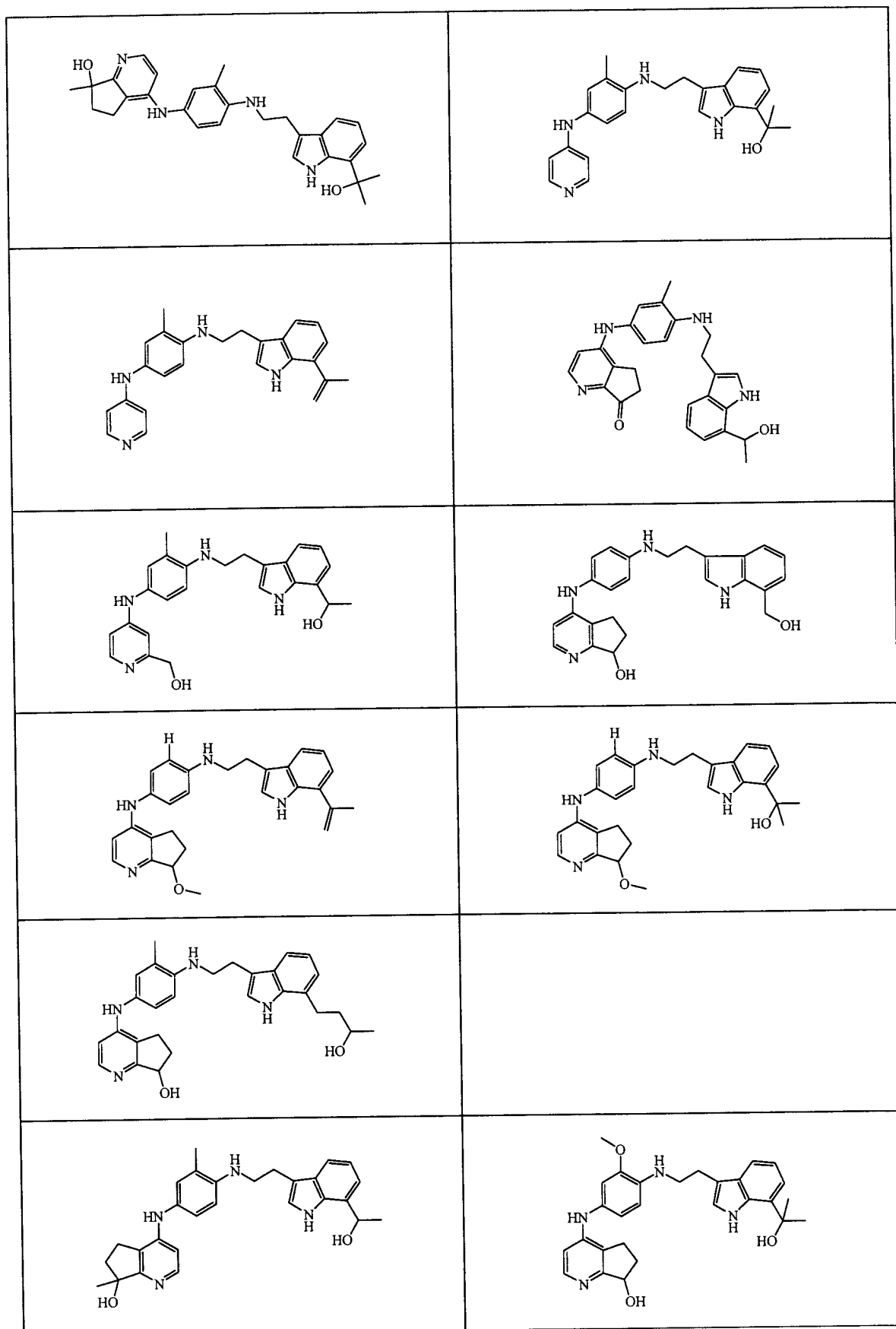
本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)、或只要可能，上述其之令人關注的具體實施例，其中 Z 為式(z-2)之基。

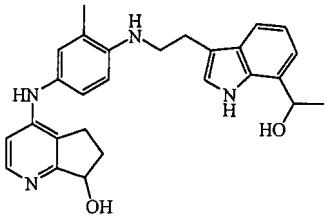
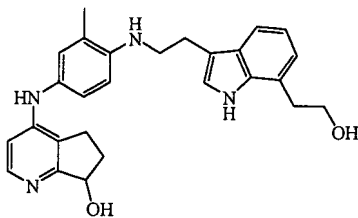
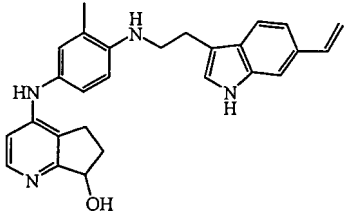
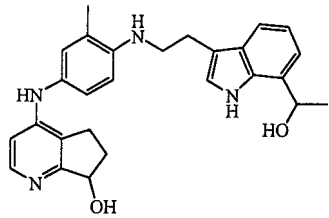
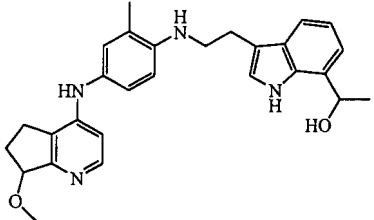
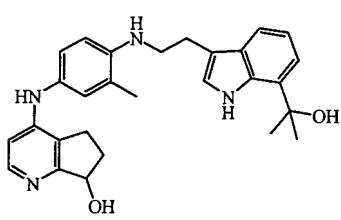
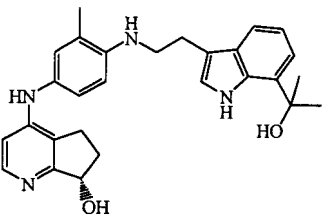
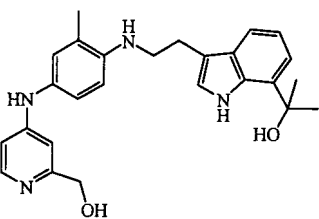
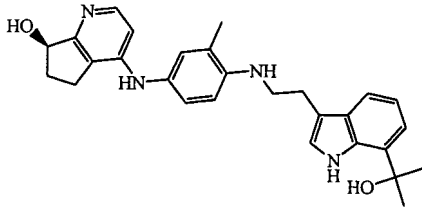
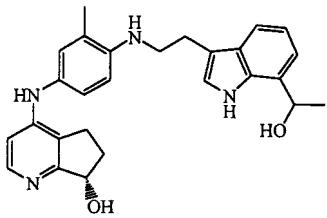
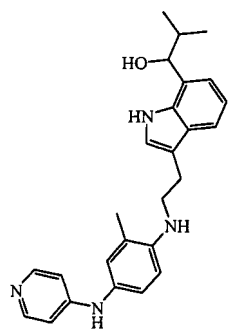
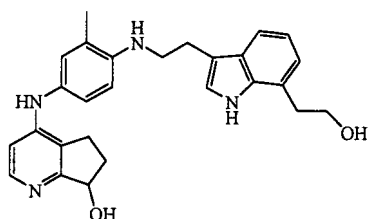
上述令人關注的具體實施例的所有可能組合被認為包含於本發明之範圍內。

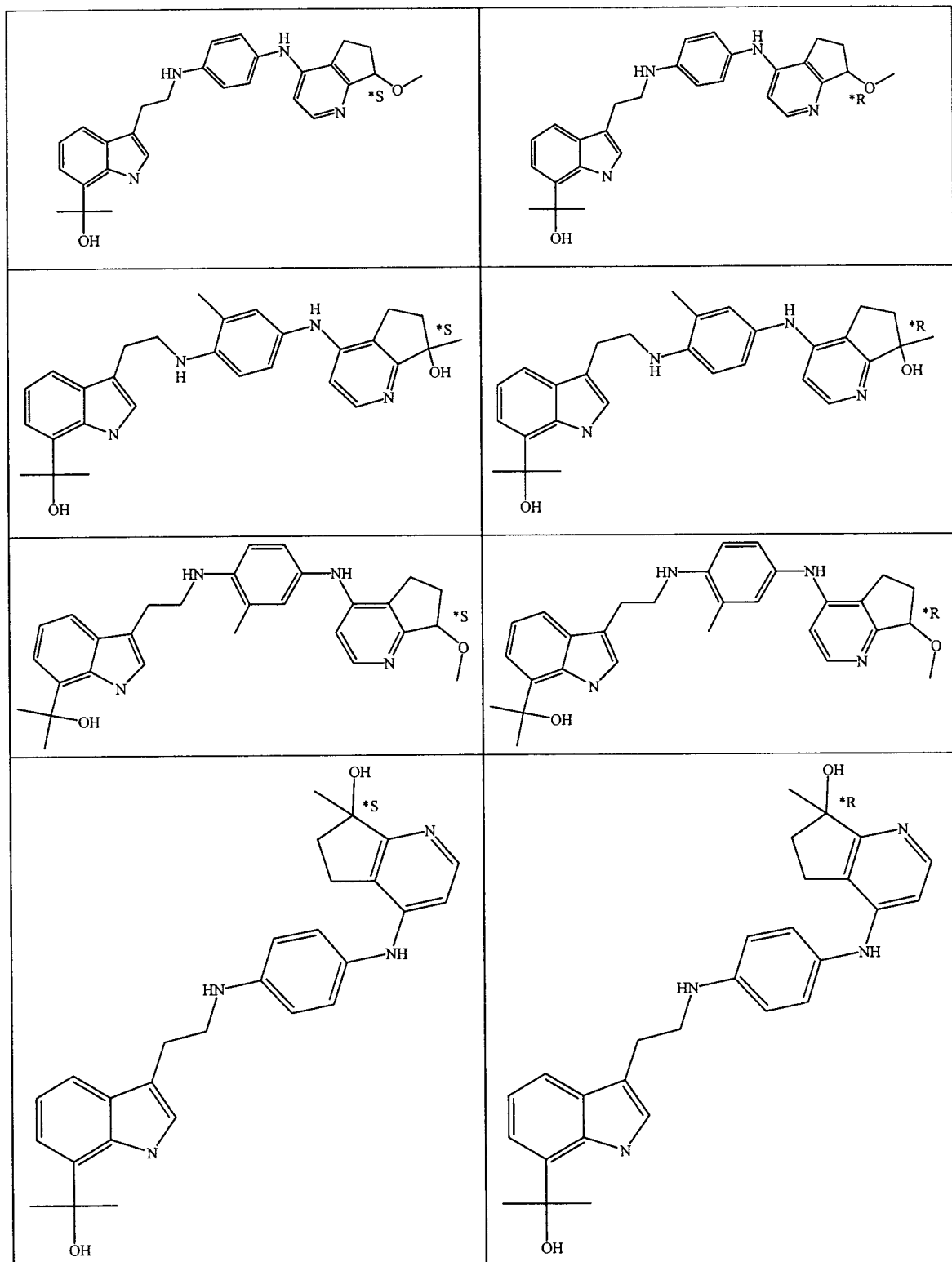
本發明令人關注的具體實施例為這些式(I)化合物、(I-a)或(I-b)，其中 R^1 為 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 或 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ； R^2 為氫或甲基； R^3 為氫或 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ； R^4 為羥基或甲基氧基； R^5 為氫或甲基、或 R^4 與 R^5 結合在一起形成酮基。

較佳地，上述令人關注的具體實施例之化合物為立體化學性純的。

本發明較佳的化合物選自下列所組成之群組



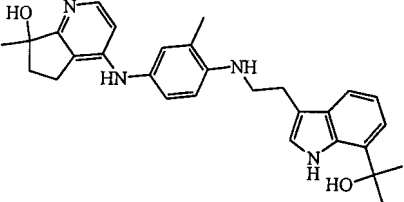
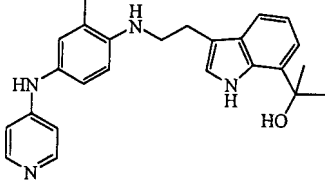
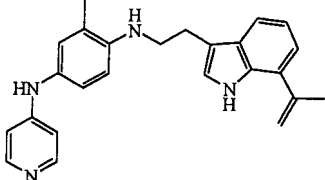
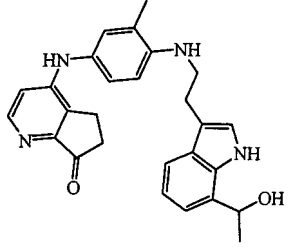
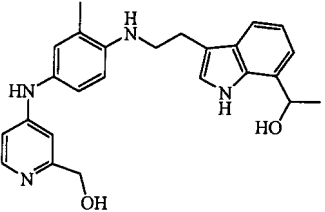
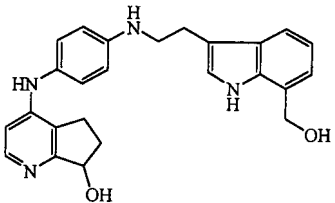
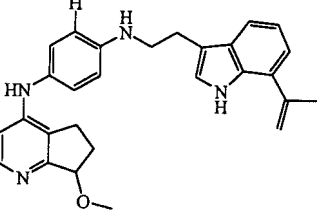
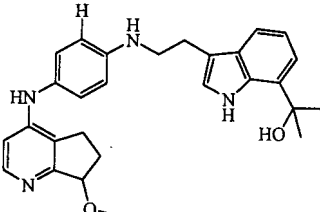
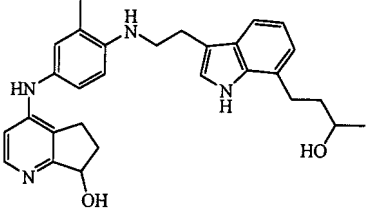
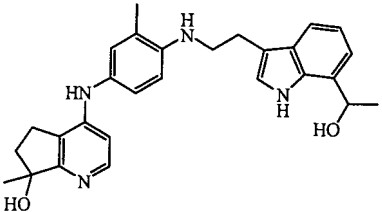
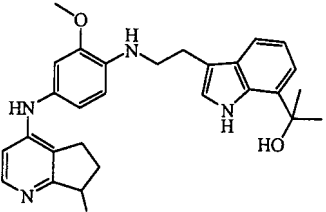
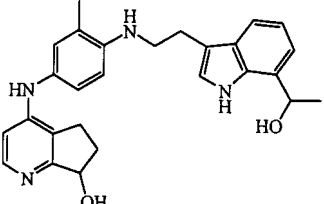
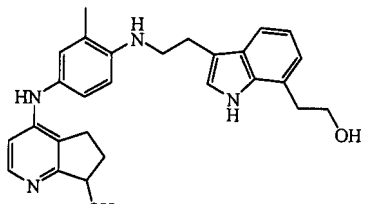


包括任何其立體化學異構型式；

其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

(*表示相關立體化學)

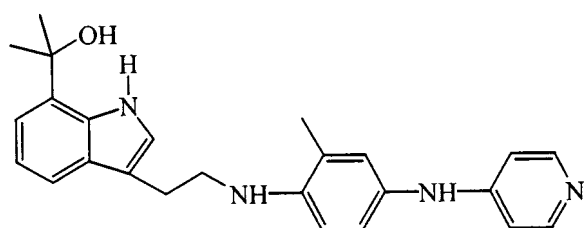
本發明較佳的化合物選自下列所組成之群組

包括其任何立體化學異構型式；

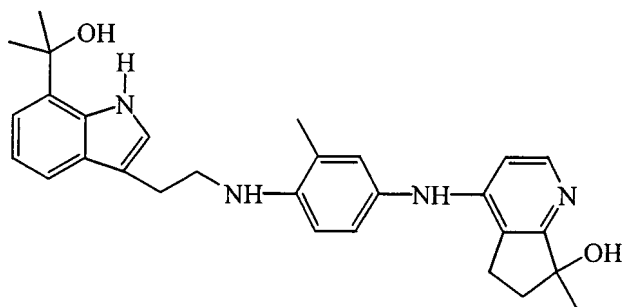
其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

本發明較佳的化合物為具有下式之化合物



其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

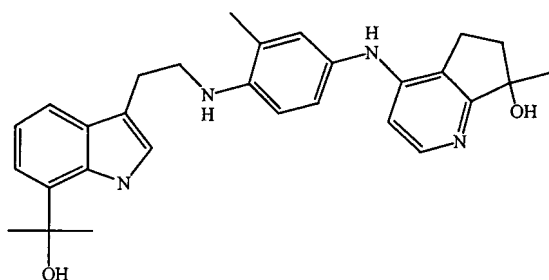
本發明較佳的化合物為具有下式之化合物



包括其任何立體化學異構型式；

其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

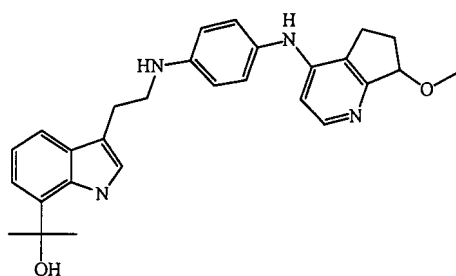
本發明較佳的化合物為具有下式之對映異構物



且具有左旋旋光性，其以鈉(589 奈米)之 D-線波長的光，於溫度 20°C，及晶格路徑長度 1 公寸，在濃度 8.59 毫克/毫升之氯仿中量測；或

其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

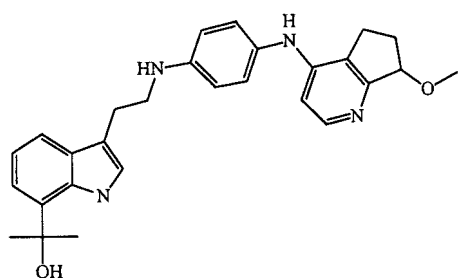
本發明較佳的化合物為具有下式之對映異構物



且具有右旋旋光性，其以鈉(589 奈米)之 D-線波長

的光，於溫度 20°C，及晶格路徑長度 1 公寸，在濃度 10.33 毫克/毫升之甲醇中量測；或其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

本發明較佳的化合物為具有下式之對映異構物



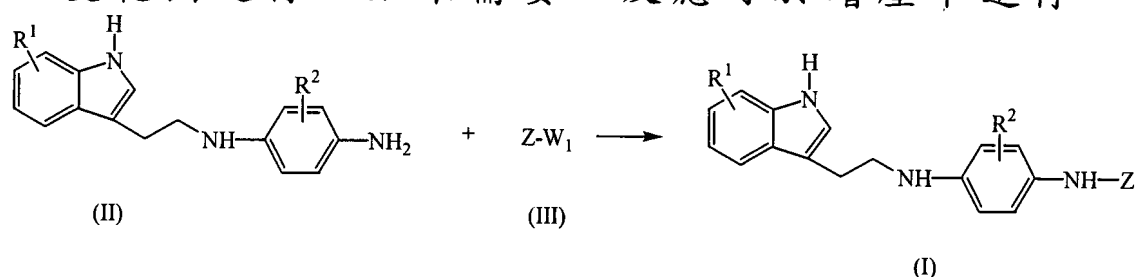
且具有左旋旋光性，其以鈉(589 奈米)之 D-線波長的光，於溫度 20°C，及晶格路徑長度 1 公寸，在濃度 10.74 毫克/毫升之甲醇中量測；或其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

式(I)化合物、其醫藥上可接受鹽類及其立體化學異構型式可於習知方法中製備。起始物質及一些中間產物為已知的化合物，且為商業上可獲得，或可根據技術中通常已知之習知反應程序製備。敘述於 WO2006/032631 之合成方法亦作為關於此方面之參考資料。

一些此類製備方法將於下文中更詳細的敘述，獲得最終式(I)化合物之其他方法敘述於實施例中。

一般而言，式(I)化合物可經由式(II)中間產物與式(III)中間產物反應而製備，其中 W_1 為適當之離去基，例如鹵素，例如氟、氯、溴或碘、或磺醯氧

基，例如甲基磺醯氧基、4-甲基苯基磺醯氧基等。反應可於反應-惰性溶劑中完成，例如醇，例如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、丁醇等；醚，例如1,4-二噁烷，較佳地有適當的酸存在，例如HCl、1,1'-氧基雙丙烷等；酮，例如4-甲基-2-戊酮；或N,N-二甲基甲醯胺、硝基苯、乙腈等。添加適當的鹼，例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或碳酸氫鹽，或有機鹼，例如N,N-二異丙基乙基胺、三乙基胺、碳酸鈉或碳酸鉀，可被用於收取在反應過程中被解離之酸。可添加少量適當的金屬碘化物，例如碘化鈉或碘化鉀，以促進反應。攪拌可增強反應速率。反應可便利地於室溫與反應混合物之回流溫度間的溫度範圍進行，如果需要，反應可於增壓下進行。

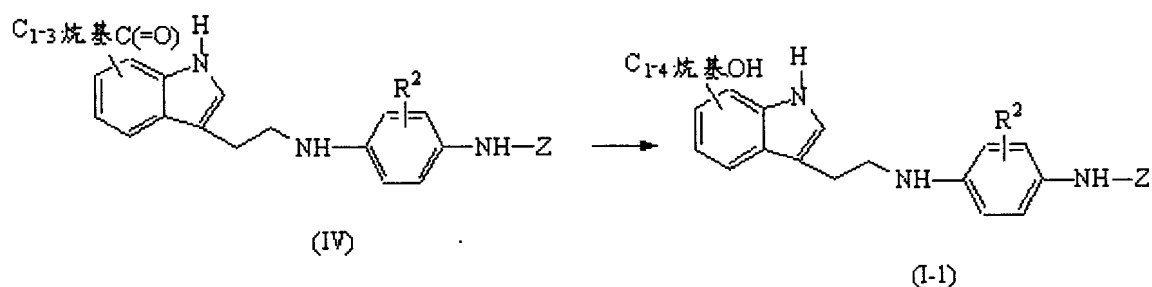


在上述反應中，式(II)中間產物，其中 R¹ 為 -C(OH)(CH₃)₂ 可產生對應之最終式(I)化合物，其中 R¹ 為 -C(CH₃)=CH₂。

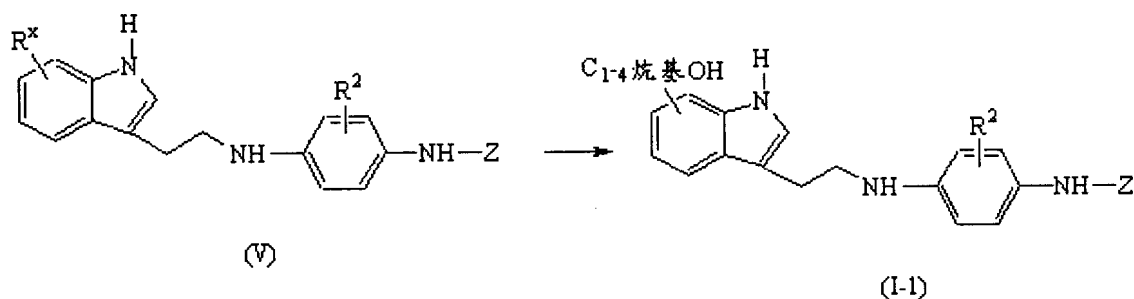
上述式(III)中間產物與式(II)中間產物之反應亦可在適當的催化劑，例如 Pd(dba)₂(雙[(1,2,4,5-η)-1,5-二苯基-1,4-戊二烯-3-酮]-鈀)、適當的配位基，例如 BINAP (2,2'-雙(二苯基膦)-1,1'-雙萘基)、適當的鹼，例如三級丁醇鈉、及適當的溶劑，例如甲苯，存在下

完成。

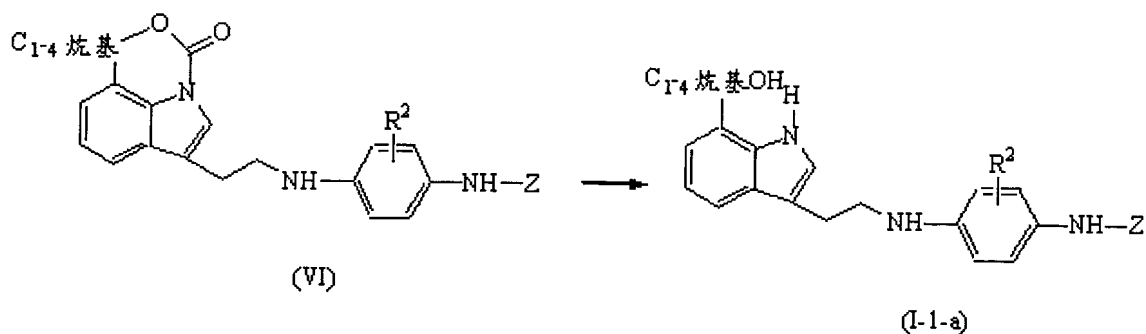
式(I)化合物，其中 R^1 代表羥基 C_{1-4} 烷基，該化合物以式(I-1)代表，其亦可在適當的還原劑，例如 $NaBH_4$ ，及適當的溶劑，例如醇，例如甲醇等存在下，經由還原對應之式(IV)羰基衍生物而製備。



式(I-1)化合物亦可在適當的還原劑，例如 $LiAlH_4$ ，及適當的溶劑，例如四氫呋喃存在下，經由還原對應之式(V)醚衍生物而製備，其中 R^x 代表 $-C_{1-3}$ 烷基 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基。



式(I-1)化合物，其中 R^1 代表羥基 C_{1-4} 烷基，且該羥基 C_{1-4} 烷基位於吲哚部分之位置 7，該化合物以式(I-1-a)表示，其亦可經由以適當的鹼，例如氫氧化鈉，及適當的溶劑，例如四氫呋喃，或醇，例如乙醇等，水解式(VI)中間產物而製備。

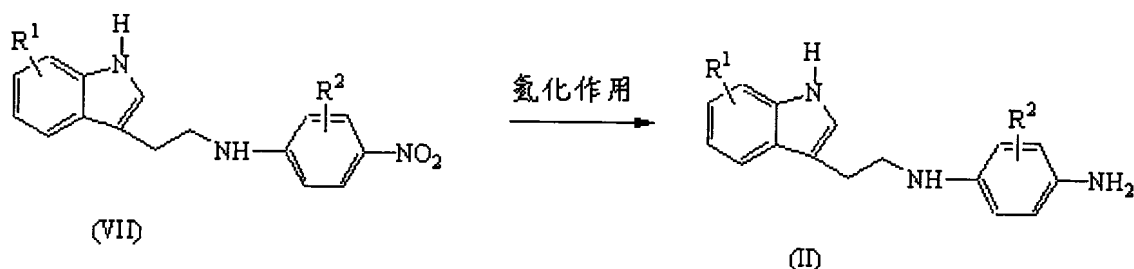


經由技術中已知的反應或官能基轉變，式(I)化合物亦可被相互轉換。

經由在適當的溶劑中，例如醇，例如 2-丙醇、二乙醚、二異丙醚，與適當的酸反應，例如氫氯酸，式(I)化合物亦可被轉換成醫藥上可接受性酸加成鹽。

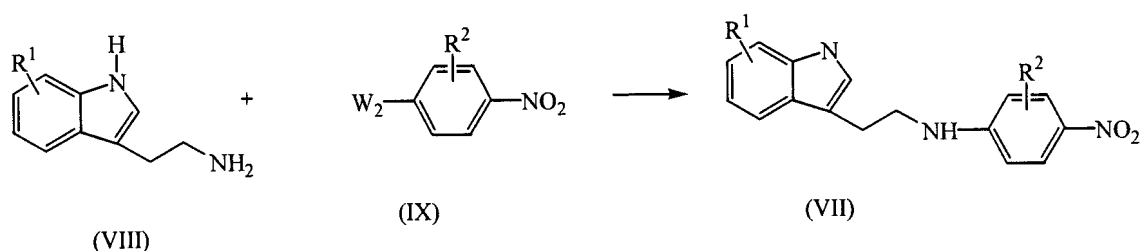
一些中間產物及起始物質為已知化合物，且為商業上可獲得或可根據技術中已知之製程製備。

一般而言，在適當的金屬催化劑存在下，例如雷氏鎳(Raney Nickel)，於適當的溶劑存在下，例如醇，例如甲醇或乙醇等；或含鉑之炭，在適當的催化劑毒(catalyst poison)存在下，例如噻吩溶液及五氧化釩，在適當的溶劑存在下，例如四氫呋喃，式(II)中間產物可經由氫化式(VII)中間產物而製備。

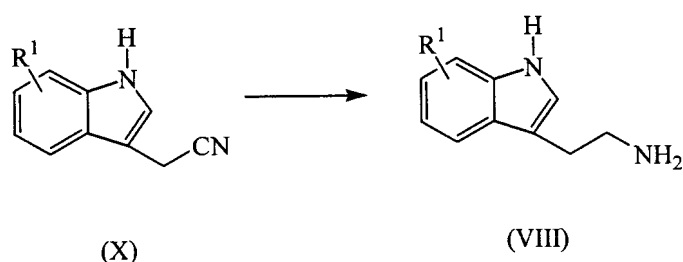


在適當的溶劑存在下，例如 N,N-二甲亞砜，式(VII)中間產物可經由反應式(VIII)中間產物與式

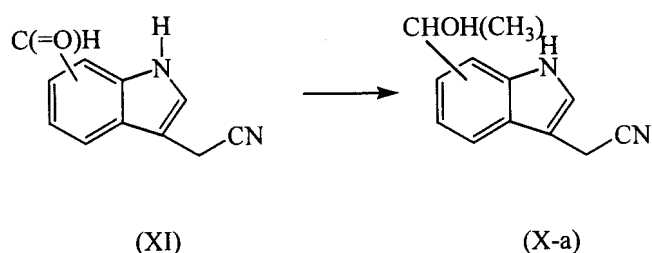
(IX)中間產物而製備，其中 W_2 代表適當的離去基，例如鹵原子，例如氯、溴、氟等。添加適當的鹼例如，例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或碳酸氫鹽或有機鹼，例如 N,N-二異丙基乙胺、三乙胺、碳酸鈉、碳酸氫鈉、或碳酸鉀，可用於收取反應過程期間所解離之酸。



在雷氏鎳及 NH_3 存在下，在適當的溶劑存在下，例如醇，例如甲醇等，式(VIII)中間產物可由相對應之式(X)中間產物製備。



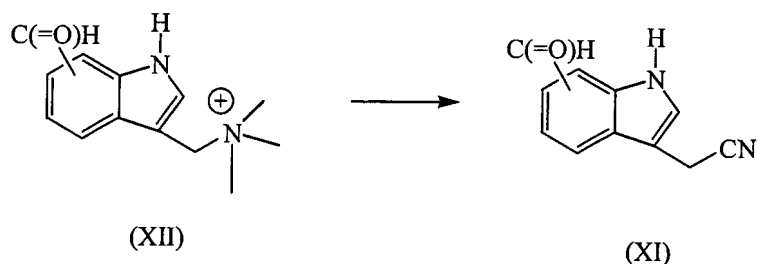
式(X)中間產物，其中 R^1 代表羥基 C_{1-4} 烷基，例如 $-CH(OH)(CH_3)$ ，該中間產物以式(X-a)表示，其可經由在適當的溶劑存在下，例如四氫呋喃，與 CH_3MgCl 反應，由式(XI)中間產物製備。



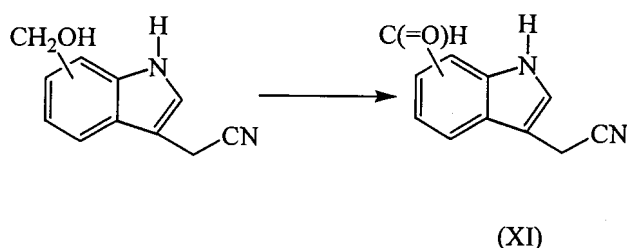
相同的反應可用於製備其他另一羥基 C_{1-4} 烷

基。例如，其 R^1 代表 $-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$ 之中間產物可由對應之具有 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$ 的中間產物製備。

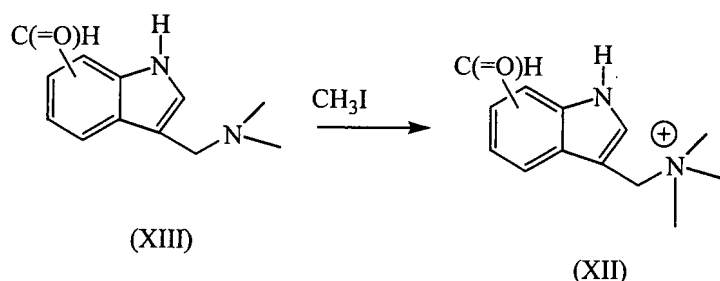
式(XI)中間產物可在適當的溶劑存在下，例如 N,N-二甲基甲醯胺，經由反應式(XII)中間產物與氰化鈉而製備。



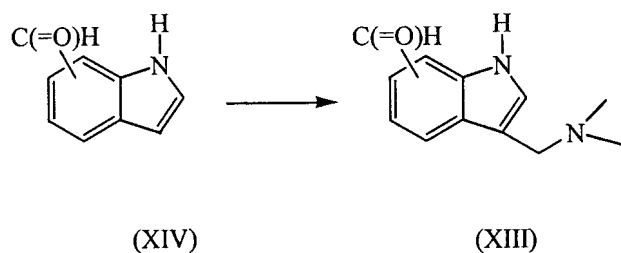
或者是，式(XI)中間產物亦可在戴斯-馬丁過碘烷(Dess-Martin periodinane)及例如二氯甲烷之適當溶劑存在下，經由氧化對應羥基類似物而製備。



式(XII)中間產物可在適當的溶劑存在下，例如醇，例如乙醇，經由反應式(XIII)中間產物與 CH_3I 而製備。



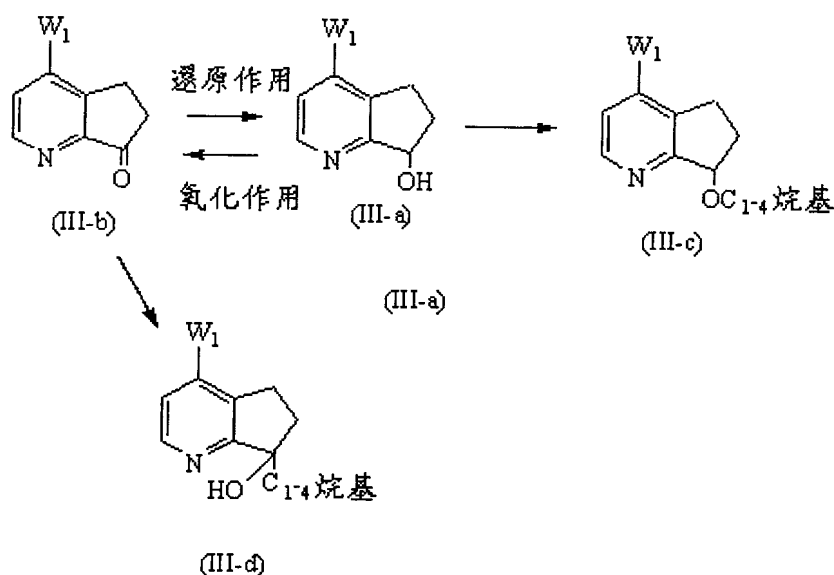
式(XIII)中間產物可在乙酸存在下，經由反應式(XIV)中間產物與埃申莫瑟氏鹽類酸(Eschenmosser's salt acid)而製備。



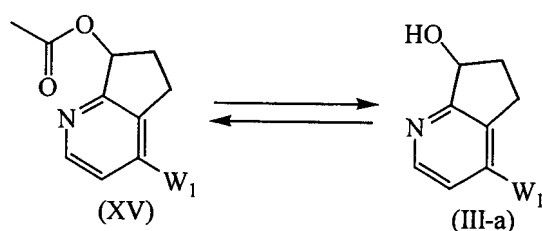
式(XIV)中間產物可在適當的氧化劑存在下，例如 MnO_2 ，在適當的溶劑存在下，例如二氯甲烷，經由氧化對應之羥基類似物而製備。

式(III)中間產物，其中 Z 為式(z-2)基，且 R^4 為羥基，該中間產物以式(III-a)表示，其可在適當的溶劑存在下，例如醇，例如甲醇，經由以適當的還原劑，例如 NaBH_4 ，還原式(III-b)中間產物而製備。

式(III-a)中間產物可在適當的鹼，例如氫化鈉，及適當的溶劑，例如四氫呋喃存在下，經由與 C_{1-4} 烷基碘化物反應，轉換成式(III-c)中間產物。可在適當的溶劑存在下，例如二氯甲烷，經由與適當的氧化劑反應，例如 MnO_2 ，氧化式(III-a)中間產物而製備式(III-b)中間產物。在適當的溶劑存在下，例如四氫呋喃，式(III-b)中間產物可經由與 C_{1-4} 烷基 MgCl 反應，轉換成式(III-d)中間產物。



式(III-a)中間產物亦可經由在甲醇/ NH_3 之混合物中攪拌式(XV)中間產物而製備。如果需要，式(III-a)中間產物可經由在乙酸酐與吡啶之混合物中攪拌，轉換成式(XV)中間產物。

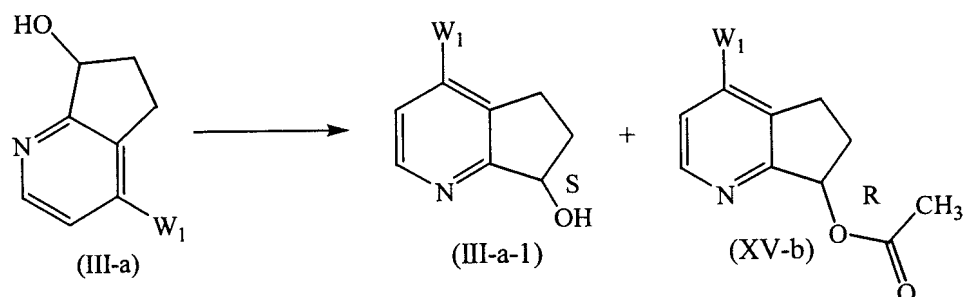


中間產物(III-a)之 S-對映異構物(本文稱為式(III-a-1)中間產物)，及式(XV)中間產物之 R-對映異構物(本文稱為式(XV-b)中間產物)，可經由在適當的溶劑中，例如乙酸乙烯酯，添加南極假絲酵母脂肪酶 B(Lipase Candida Antartica B)至式(III-a)中間產物之外消旋混合物中而製備(詳見流程圖 1)。當需要時，式(XV-b)中間產物可經由在 $MeOH/NH_3$ 中反應，轉換成中間產物(III-a)之 R 對映異構物，本文稱為式(III-a-2)中間產物。

由外消旋混合物起始，此方法提供以 $ee > 99\%$ 及 58% 產率轉換一種對映異構物成為其之乙酸鹽，且第二種對映異構物以 $ee > 99\%$ 及 42% 產率被分離。

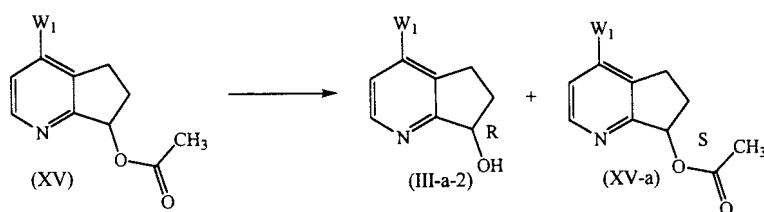
對映異構物過量(ee)一詞為熟悉立體化學之人所熟知。關於(+)及(-)對映異構物之混合物，以 $F(+)$ 及 $F(-)$ 之莫耳或重量分率給予之組成物(其中 $F(+)+F(-)=1$)，對於 $F(*)$ 之對映異構物過量定義為 $F(+)-F(-)$ ，且百分比對映異構物過量定義為 $100*[F(+)-F(-)]$ 。

流程圖 1



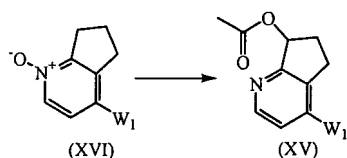
或者是，中間產物(III-a)之 R-對映異構物(本文稱為式(III-a-2)中間產物)及式(XV)中間產物之 S-對映異構物(本文稱為式(XV-a)中間產物)可經由在水中，添加南極假絲酵母脂肪酶 B 至式(XV)中間產物之外消旋混合物而製備(詳見流程圖 2)。當需要時，式(XV-a)中間產物可經由在 $MeOH/NH_3$ 中反應，轉換成中間產物(III-a-1)。

流程圖 2

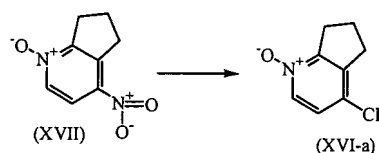


或者是，式(III-a)中間產物亦可經由對掌性管柱層析分離成其之對映異構物。

式(XV)中間產物可經由在乙酸酐中攪拌式(XVI)中間產物而製備。



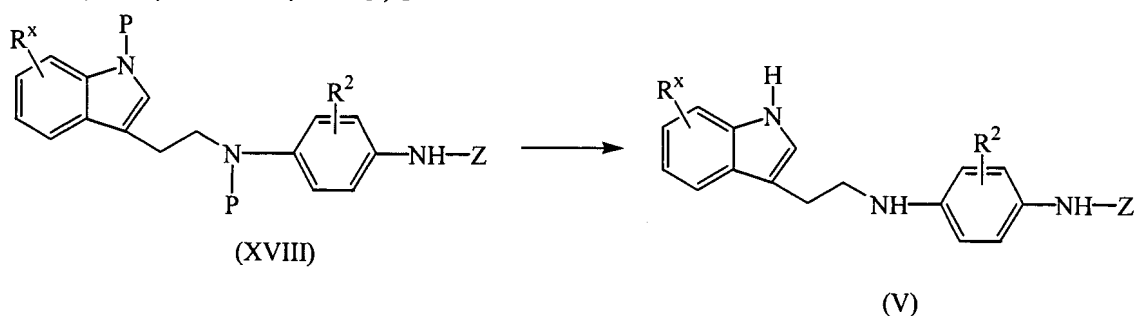
式(XVI)中間產物，其中 W_1 為氯，本文稱為式(XVI-a)中間產物，其之製備可經由添加氯化苯甲基三乙基銨及氯化鈉至含式(XVII)中間產物之乙腈溶液中，之後添加濃氫氯酸。



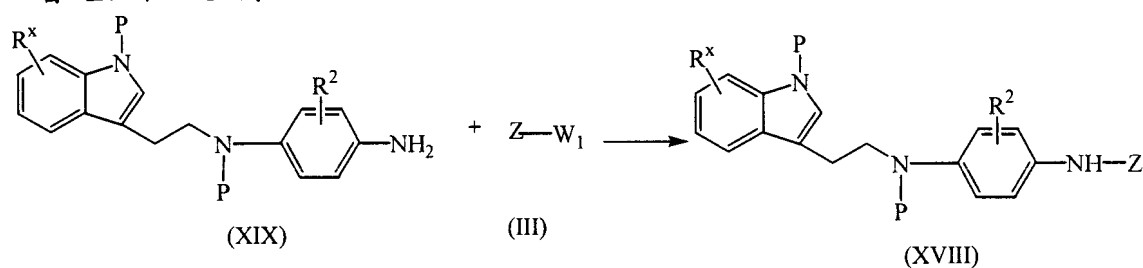
式(XVII)中間產物可經由添加發煙硝酸至硫酸中，之後逐份添加 6,7-二氫-5H-環戊[b]吡啶，1-氧化物而製備。

式(IV)中間產物可根據上述關於式(II)中間產物之反應規則而製備。

式(V)中間產物可在適當的酸，例如氫氯酸，及適當的溶劑，例如乙腈存在下，經由去保護式(XVIII)中間產物而製備，其中 P 代表適當的保護基，例如 $-C(=O)-O-C(CH_3)_3$ 。

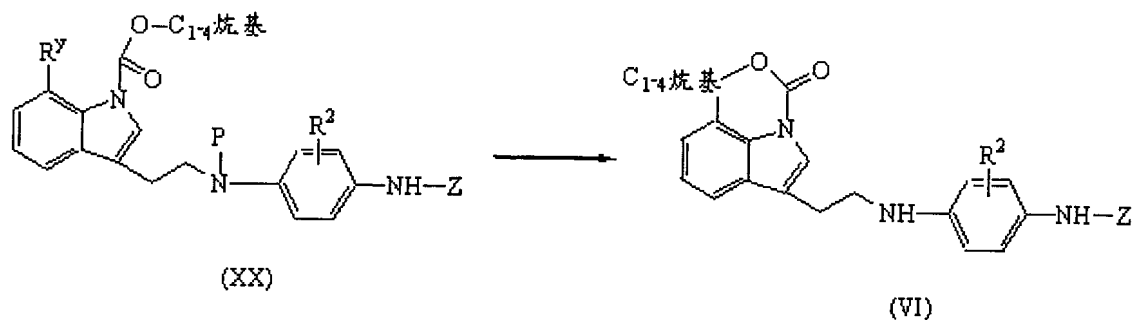


在反應-惰性溶劑，例如醇，例如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、異丙醇丁醇等；醚，例如 1,4-二噁烷存在下，較佳地在適當的酸，例如 HCl、1,1'-氧基雙丙烷等；酮，例如 4-甲基-2-戊酮；或 N,N-二甲基甲醯胺、硝基苯、乙腈等存在下，式(XVIII)中間產物可經由反應式(XIX)中間產物與式(III)中間產物而製備。添加適當的鹼，例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或碳酸氫鹽或有機鹼，例如 N,N-二異丙基乙基胺、三乙胺、碳酸鈉或碳酸鉀，可用於收取反應過程間所解離之酸。添加少量適當的金屬碘化物，例如碘化鈉或碘化鉀，以促進反應。攪拌可增強反應速率。反應可便利地於室溫與反應混合物之回流溫度間的溫度範圍進行，如果需要，反應可於增壓下進行。

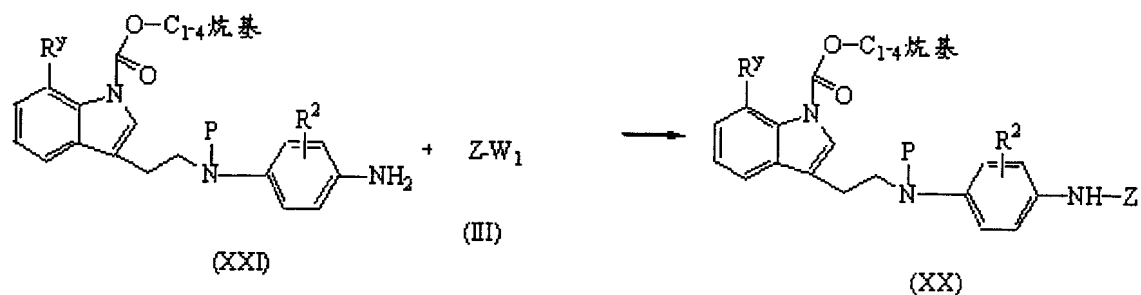


式(XIX)中間產物可根據上述關於式(II)中間產物之反應規則而製備。

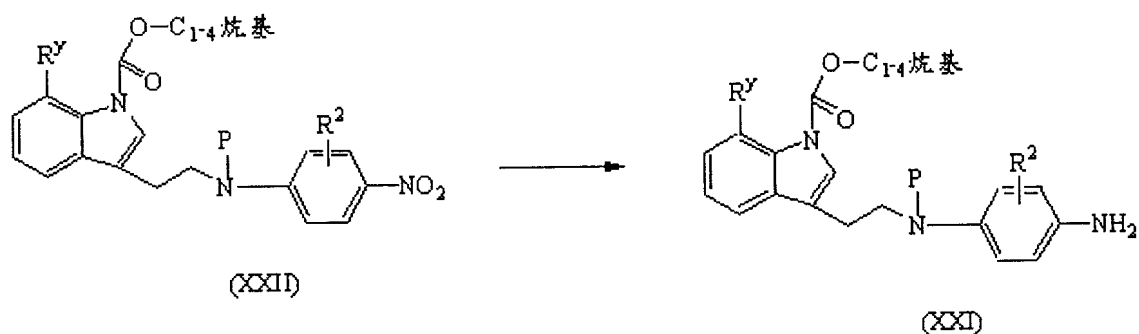
式(VI)中間產物可在適當的酸，例如三氟乙酸及適當的溶劑，例如二氯甲烷存在下，經由反應式(XX)中間產物而製備，其中 P 代表上述定義之適當保護基，且 R^y 代表 -C₁₋₄ 烷基 -O-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃。



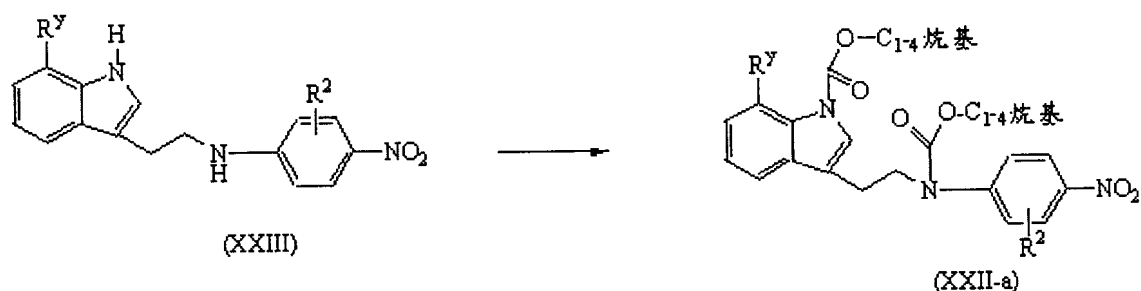
在反應-惰性溶劑，例如醇，例如甲醇、乙醇、2-甲氧基-乙醇、丙醇、異丙醇丁醇等；醚，例如 1,4-二噁烷存在下，較佳地在適當的酸，例如 HCl、1,1'-氧基雙丙烷等；酮，例如 4-甲基-2-戊酮；或 N,N-二甲基甲醯胺、硝基苯、乙腈等存在下，式(XX)中間產物可經由反應式(XXI)中間產物與式(III)中間產物而製備。添加適當的鹼，例如鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽或碳酸氫鹽或有機鹼，例如 N,N-二異丙基乙基胺、三乙胺、碳酸鈉或碳酸鉀，可用於收取反應過程間所解離之酸。添加少量適當的金屬碘化物，例如碘化鈉或碘化鉀，以促進反應。攪拌可增強反應速率。反應可便利地於室溫與反應混合物之回流溫度間的溫度範圍進行，如果需要，反應可於增壓下進行。



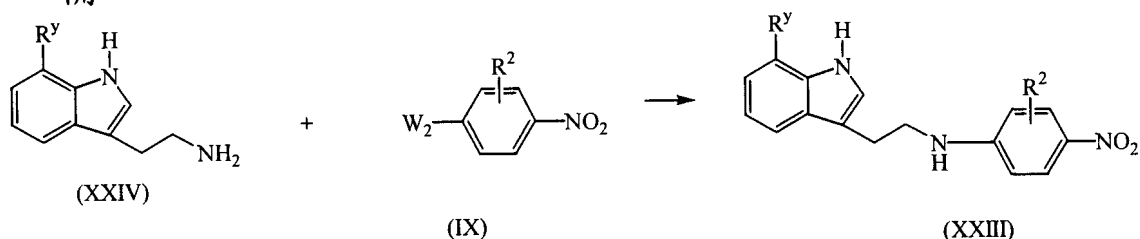
在適當的催化劑，例如雷氏鎳，及適當的溶劑，例如醇，例如甲醇等存在下，式(XXI)中間產物可經由氫化，由對應之式(XXII)硝基中間產物製備。



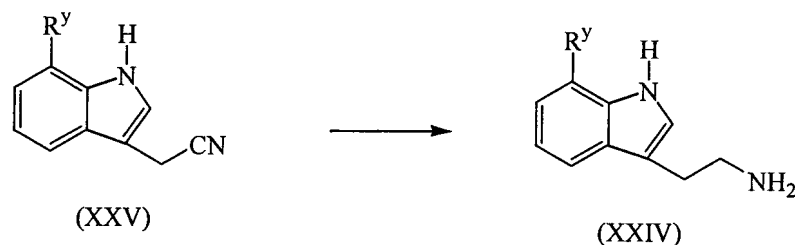
式(XXII)中間產物，其中 P 代表 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_{1-4}$ 烷基，該中間產物以式(XXII-a)表示，其可在適當的鹼，例如三乙胺，及適當的溶劑，例如 4-(二甲基)胺基吡啶存在下，經由反應式(XXIII)中間產物與二-第三丁基 二碳酸酯而製備。



式(XXIII)中間產物可在適當的鹼，例如碳酸氫鈉，及適當的溶劑，例如 N,N-二甲亞砜存在下，經由反應式(XXIV)中間產物與式(IX)中間產物而製備。



式(XXIV)中間產物可在適當的催化劑存在下，例如雷氏鎳，在適當的溶劑存在下，例如醇，例如甲醇等，經由反應式(XXV)中間產物與 NH_3 而製備。



式(XXV)中間產物可在適當的鹼，例如咪唑，及適當的溶劑，例如四氫呋喃存在下，經由反應式(XXVI)中間產物與第三丁基二甲基矽烷基氯而製備。



式(XXVI)中間產物可如上述關於式(XI)中間產物所述製備。

本發明中式(I)化合物及一些中間產物可包含不對稱碳原子。該化合物及該中間產物之純的立體化學異構型式可經由應用技術中已知之製程獲得，例如非鏡像異構物可經由物理方法分離，例如選擇性結晶或層析技術，例如逆流分佈(counter current distribution)、液體層析等方法。對映異構物可由外消旋混合物獲得，其首先經由以適當的解析劑，例如對掌性酸，轉換該外消旋混合物成為非鏡像異構鹽類或化合物之混合物；然後物理性分離該非鏡像異構鹽類或化合物之混合物，例如選擇性結晶、超臨界液體層析或層析技術，例如液體層析等方法；且最後轉換該經分離的非鏡像異構鹽類或化合物成為相對應之對映異構物。純的立體化學異構

型式亦可獲自適當的中間產物及起始物質之純的立體化學異構型式，倘若中間反應立體特異性地發生。

式(I)化合物，包括任何其立體化學異構型式、其醫藥上可接受性鹽類或其溶劑化物，因其增加 p53 之表現而具有有用的藥理學特性，顯示有效的抗增殖活性，顯示有效的抗腫瘤活性。

如前所示，本發明化合物在 C.1 所述之分析中增加 p53 之表現，此增加可歸因於，但不限於一或多種下列作用機制：

- 與上游或下游標靶之相互作用，例如包含於泛素化作用(ubiquitination)或 SUMO 修飾之激酶、或酵素活性，
- p53 蛋白質之直接或間接安定化作用，例如經由保持其在其之機能性結構形式，或經由防止錯誤摺疊，
- 增強 p53 表現或 p53 家族成員之表現，例如 p63 及 p73，
- 增加 p53 活性，例如經由(但不限於)增強其之轉錄活性，及/或
- 增加 p53-發信路徑之基因及蛋白質的表現，例如(但不限於)p21waf1、cip1、MIC-1(GDF-15)、PIG-3、Bax、Puma、Noxa、及 ATF-3。

因此，本發明揭示式(I)化合物使用作為藥劑，特別是用於治療癌症或相關疾病，用於抑制腫瘤生長，用於增加 p53 之表現。

此外，本發明亦涉及化合物於製造藥劑上之用途，該藥劑用於治療經由 p53 之降低表現所調控之疾病，特別是用於治療癌症，其中該化合物為式(I)化合物。

本文中所使用之“治療”一詞涵蓋動物中，特別是人類的疾病及/或症狀之任何治療，且包括：(i)預防病患所發生之疾病及/或症狀，該病患可能感染疾病及/或症狀但尚未被診斷出來；(ii)抑制疾病及/或症狀，即阻止其發展；(iii)緩解疾病及/或症狀，即引起疾病及/或症狀之逆行。

關於“經由 p53 之降低表現所調控之疾病”一詞意指可經由細胞凋零、誘導細胞死亡、或調節細胞循環而被阻止發展、被緩解或被引起逆行的任何非所欲或有害之症狀。

本發明亦提供治療經由 p53 之降低表現所調控之疾病的方法，特別是治療癌症，其經由投與有效量之本發明化合物於所需此治療之病患，例如哺乳動物(且更具體為人類)。

本發明化合物對於腫瘤細胞可具有抗增殖作用，即使此細胞缺乏機能性 p53。更特別是，本發明化合物對於具有廣泛型式或突變 p53 之腫瘤及/或對於過度表現 MDM2 之腫瘤，可具有抗增殖作用。化合物可影響血管生成作用、腫瘤細胞遷移、侵入或轉移。

因此，本發明亦提供一種抑制腫瘤生長之方法，其經由投與有效量之本發明化合物於所需此治

療之病患，例如哺乳動物(且更具體而言為人類)。

腫瘤之實例包括可被本發明化合物抑制之成人及小兒惡性腫瘤，包括但不限於肺癌，包括小細胞肺癌及非小細胞肺癌(例如腺癌)、胰臟癌、結腸癌(例如結腸直腸癌，例如結腸腺癌及結腸腺瘤)、食道癌、口腔鱗狀細胞癌、舌癌、胃癌、肝癌、鼻咽癌，淋巴系統之造血性腫瘤(例如急性淋巴細胞白血病、B細胞淋巴瘤、伯奇(Burkitt)氏淋巴瘤)、非霍奇金(non-Hodgkin)氏淋巴瘤(例如外套細胞淋巴瘤)、霍奇金氏症、顆粒性白血病(例如急性骨髓性白血病(AML)或慢性粒細胞白血病(CML))、急性淋巴細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、甲狀腺濾泡癌、骨髓增生異常徵候群(MDS)，間質起緣性腫瘤、軟組織肉瘤、脂肪肉瘤、胃腸道基質肉瘤、惡性週邊神經鞘腫瘤(MPNST)、尤英(Ewing)肉瘤、平滑肌肉瘤、間質軟骨肉瘤、淋巴肉瘤、纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤、黑色素瘤、畸胎瘤、神經母細胞瘤、腦腫瘤、骨髓母細胞瘤、神經膠質瘤、良性皮膚腫瘤(例如角化)、乳房癌(例如後期乳腺癌)、腎臟癌、腎母細胞瘤、卵巢癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、膀胱癌、前列腺癌，包括後期疾病和激素耐性前列腺癌、睪丸癌、骨肉瘤、頭頸部癌症、表皮細胞癌、多發性骨髓瘤(例如耐性多發性骨髓瘤)、間皮瘤。特別是可以用本發明化合物治療之癌症為乳癌、結腸癌、非小細胞肺癌、急性骨髓細胞白血病(AML)。

本發明化合物亦可用於治療及預防炎症性症狀。

因此，本發明亦提供一種治療及預防炎症性症狀之方法，其經由投與有效量之本發明化合物於所需此治療之病患，例如哺乳動物(且更具體而言為人類)。

本發明化合物亦可用於治療自體免疫疾病及症狀。關於“自體免疫疾病”一詞意指動物的免疫系統對於自己之抗原產生不利反應的任何疾病。關於“自己之抗原”一詞意指通常發現於動物體之任何抗原。代表性之自體免疫疾病包括，但不限於：橋本(Hashimoto)甲狀腺炎、葛瑞夫(Grave)氏症、多發性硬化症、惡性貧血，艾迪生(Addison)氏症、胰島素依賴型糖尿病、類風濕關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE 或狼瘡)、皮膚炎、克隆(Crohn)氏症、韋格納(Wegener)氏肉芽腫，抗腎小球基膜症、抗磷脂徵候群、25 皰疹性皮炎、過敏性腦脊髓炎、腎小球腎炎、膜性腎小球腎炎、古德帕斯丘(Goodpasture)氏徵候群、藍伯特-伊頓(Lambert-Eaton)徵候群、肌無力徵候群、重症肌無力症、水大皰性天皰瘡樣病、多內分泌腺疾病(Polyendocrinopathies)、賴特(Reiter)氏症，和僵人(Stiff-Man)徵候群。

因此，本發明亦提供一種治療自體免疫疾病及症狀之方法，其經由投與有效量之本發明化合物於所需此治療之病患，例如哺乳動物(且更具體而言為人類)。

本發明化合物亦可用於治療與構造不安定或錯誤摺疊之蛋白質相關疾病。

與構造不安定或錯誤摺疊之蛋白質相關疾病的實例包括，但不限於：囊性纖維變性 (CFTR)、馬凡(Marfan)氏徵候群 (微纖維蛋白)、肌萎縮性脊髓側索硬化症 (超氧化物歧化酶(dismutase))、壞血病 (膠原蛋白)、楓糖漿尿疾病 (α -酮酸去氫酶複合物)、成骨不全症 (第 1 型原膠原 pro- α)、庫傑 (Creutzfeldt-Jakob) 二氏症 (病原性蛋白顆粒)、阿茲海默 (Alzheimer) 氏症 (β -澱粉樣蛋白)、家族性澱粉樣變性 (溶菌酶)、白內障 (晶狀體)、家族性高膽固醇血症 (LDL 受體)、 α I-抗胰蛋白酶缺乏症、泰-薩 (Tay-Sachs) 二氏症 (β -己糖胺酶)、色素性視網膜炎 (視紫紅質) 和矮妖症 (leprechaunism) (胰島素受體)。

因此，本發明亦提供一種治療與構造不安定或錯誤摺疊之蛋白質相關疾病之方法，其經由投與有效量之本發明化合物於所需此治療之病患，例如哺乳動物 (且更具體而言為人類)。

有鑒於其有用之醫藥特性，目標化合物可被調配成各種用於投與目的之醫藥型式。

為了製備本發明醫藥組成物，作為活性成分之有效量的本發明化合物與醫藥上可接受載劑充分混合而組合，該載劑可根據所欲投與之製備型式廣泛變化取用。這些醫藥組成物合於適當的單一劑型，較佳地用於經口、直腸、經皮膚投與、或經由

非經腸胃道注射。例如在製備口服劑型組成物，在口服液體製劑情況下，例如懸浮液、糖漿、酏劑及溶液，可使用任何通常之醫藥媒劑，例如水、二醇類、油類、醇類等；或在粉末、丸劑、膠囊、及錠劑情況下，固體載劑，例如澱粉、糖類、高嶺土、潤滑劑、黏結劑、崩解劑等。

因為易於投與，固錠劑及膠囊代表最有利之口服單位劑型，在此情況，固體醫藥載劑顯著地被使用。關於非經腸胃道組成物，載劑通常將包含無菌水(至少大部分)，然而可包括其他成分(例如幫助溶解)。例如可製備注射溶液，其中載劑包含食鹽水溶液、葡萄糖溶液、或食鹽水與葡萄糖之混合物溶液。可製備注射懸浮液，在此情況，可使用適當的液體載劑、懸浮劑等。在適於經皮膚投與之組成物，載劑任意地包含滲透增強劑及/或適當的濕潤劑，任意地以較少比例合併適當的任何種類添加劑，該添加劑對於皮膚並不引起明顯的有害作用。該添加劑可易於投與皮膚及/或可有助於製備所欲組成物，這些組成物可以不同方式投與，例如皮膚滲透貼布、滴劑、軟膏。其特別有利於調配上述醫藥組成物於易於投與之單位劑型及劑量之均勻度。用於本文說明書及申請專利範圍中之單位劑型係指物理性分離之單位，適於作為單一劑量，各單位包含預定量之預計產生所欲治療效果的活性成分與所需之醫藥載劑。各單位劑型之實例為錠劑(包括加載痕或膜衣錠)、膠囊、丸劑、粉末包裝、粉片、

注射溶液或懸浮液、茶匙、湯匙等，及其分離之倍數。

特別有利於調配上述醫藥組成物於易於投與之單位劑型及劑量之均勻度。用於本文說明書及申請專利範圍中之單位劑型係指物理性分離之單位，適於作為單一劑量，各單位包含預定量之預計產生所欲治療效果的活性成分與所需之醫藥載劑。各單位劑型之實例為錠劑(包括加截痕或膜衣錠)、膠囊、丸劑、粉末包裝、粉片、注射溶液或懸浮液、茶匙、湯匙等，及其分離之倍數。

本發明化合物被投與之量足以引起細胞凋零、引起細胞死亡、或調節細胞周期。

因此，本發明化合物被投與之量足以增加 p53 之表現、或發揮其抗腫瘤活性。

熟悉技術者可由下文之測試結果而易於決定有效量。一般而言，需考量的是治療上有效量為 0.005 毫克/公斤體重至 100 毫克/公斤體重，且特別是 0.005 毫克/公斤體重至 10 毫克/公斤體重。其可適當的於一整天適當間隔投與所需劑量，如單一、二、三、四或多個次劑量。該次劑量可調配成單位劑型，例如每單位劑型包含 0.5 至 500 毫克，特別是 1 毫克至 500 毫克，更特別是 10 毫克至 500 毫克之活性成分。

根據投與方法，醫藥組成物較佳地將包含 0.05 至 99 重量%之本發明化合物，更佳地由 0.1 至 70 重量%，甚佳地由 0.1 至 50 重量%，及 1 至 99.95

重量%之醫藥上可接受載劑、更佳地由 30 至 99.9 重量%，甚佳地由 50 至 99.9 重量%，所有百分比基於組成物之總重。

關於本發明其他方面，有設想到本發明化合物與其他抗癌劑之組合物，尤其是使用作為藥劑，更明確而言，於治療癌症或相關疾病。

關於治療上述症狀，本發明化合物可有利的被使用於組合一或多種其他藥劑，更明確而言，在癌症治療上組合其他抗癌劑或佐劑，抗癌劑或佐劑之實例(治療中之支持劑)包括，但不限於：

- 鉑配位化合物，例如順鉑(cisplatin)任意地結合氨磷汀(amifostine)，卡鉑(carboplatin)或奧沙利鉑(oxaliplatin)；
- 紫杉烷類(taxane)化合物，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)，太平洋紫杉醇蛋白質結合粒子(AbraxaneTM)或多西紫杉醇(docetaxel)；
- 拓撲異構酶 I(topoisomerase I)抑製劑，例如喜樹鹼(camptothecin)化合物，例如依立替康(irinotecan)、SN-38、拓撲替康(topotecan)、鹽酸拓撲替康；
- 拓撲異構酶 II 抑製劑，例如抗腫瘤表鬼臼毒素類(epipodophyllotoxins) 或 鬼 臼 毒 素(podophyllotoxin)衍生物，例如依托泊苷(etoposide)、依托泊苷磷酸鹽或替尼泊(teniposide)；
- 抗腫瘤長春花生物鹼類(vinca alkaloids)，例如長

春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristin)、或長春瑞賓(vinorelbine)。

- 抗腫瘤核苷衍生物，例如 5- 氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、亞葉酸(leucovorin)、吉西他濱(gemcitabine)、鹽酸吉西他濱、卡培他濱(capecitabine)、克拉屈濱(cladribine)、氟達拉濱(fludarabine)、奈拉濱(nelarabine)；
- 烷化劑，例如氮芥(nitrogen mustard)或亞硝基脲(nitrosourea)，例如環磷醯胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、卡莫司汀(carmustine)、噻替哌(thiotepa)，馬法蘭 mephalan (mephalan；melphalan)、洛莫司汀(lomustine)、六甲蜜胺(altretamine)、白消安(busulfan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)任意地結合美斯納(mesna)、哌泊溴烷(pipobroman)、卡巴胥(procarbazine)、鏈脲菌素(streptozocin)、替莫唑胺(temozolomide)、尿嘧啶(uracil)；
- 抗腫瘤蒽環類(anthracycline)衍生物，例如柔紅黴素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)任意地結合右雷佐生(dexrazoxane)、doxil®、依達比星(idarubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、表阿黴素(epirubicin)、鹽酸表阿黴素、戊柔比星(valrubicin)；
- 以 IGF-1 受體為標靶之分子，例如足葉苦素(picropodophilin)；

- 替曲卡星(tetracarcin)衍生物，例如替曲卡星 A；
- 糖皮質素，例如強體松(prednisone)；
- 抗體，例如曲妥珠單抗（HER2 抗體）、美羅華(rituximab)（CD20 抗體）、吉妥單抗(gemtuzumab)、吉姆單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、西妥昔單抗(cetuximab)、帕妥珠(pertuzumab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、阿來珠單抗(alemtuzumab)、衣庫珠單抗(eculizumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、疏諾莫單抗(nofetumomab)、帕尼單抗(Panitumumab)、托西莫單抗(tositumomab)、CNTO 328；
- 雌激素受體拮抗劑或選擇性雌激素受體調控劑或雌激素合成抑制劑，例如它莫西芬(tamoxifen)、氟維司群(fulvestrant)、托瑞米芬(toremifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、faslodex®、雷洛昔芬(raloxifene)、或來曲唑(letrozole)；
- 芳香酶(aromatase)抑制劑，例如依西美坦(exemestane)、阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑、睪內酯(testolactone)、和伏氯唑(vorozole)；
- 分化劑(differentiating agent)，例如類視色素(retinoid)、維生素 D、或視黃酸和視黃酸代謝阻斷劑（RAMBA），例如 accutane®；
- DNA 甲基轉移酶抑制劑，例如氮雜胞苷(azacytidine)或地西他濱(decitabine)；
- 抗葉酸劑，例如培美曲塞二鈉(pemetrexed disodium)；

- 抗生素，例如放線菌素 D(antinomycin D)、博萊黴素(bleomycin)、絲裂黴素 C(mitomycin C)、放線菌素、洋紅黴素(carminomycin)、柔紅黴素(daunomycin)、左旋咪唑(levamisole)、普卡黴素(plicamycin)、光神黴素(mithramycin)；
- 抗代謝劑，例如克羅拉濱(clofarabine)、胺基蝶呤(aminopterin)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)或甲氨蝶呤(methotrexate)、阿扎胞苷(azacitidine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟脲苷(floxuridine)、噴司他丁(pentostatin)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；
- 細胞凋零誘導劑和抗血管生成劑，例如 Bcl - 2 抑制劑，例如 YC 137、BH 312、ABT 737、棉子酚(gossypol)，HA 14-1、TW 37 或癸酸；
- 微管蛋白-結合劑，例如卡貝塔汀(combrestatin)、秋水仙素或諾考達唑(nocodazole)；
- 激酶抑制劑（例如 EGFR（上皮生長因子受體）抑制劑、MTKI（多標靶激酶抑制劑）、mTOR 抑制劑），例如夫拉平度(flavoperidol)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)、埃羅替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、達沙替尼(dasatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、馬來酸舒尼替尼(sunitinib maleate)、西羅莫斯(temsirolimus)；
- 法尼基轉移酶抑制劑，例如替吡法尼(tipifarnib)；
- 組蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制劑，例如丁酸鈉、

辛二醯苯胺異羧肟酸 (SAHA)、縮酚酸肽 (depsipeptide) (FR 901228)、NVP-LAQ824、R306465、JNJ-26481585、曲古菌素 A(trichostatin A)，伏立諾他(vorinostat)；

- 泛素-蛋白酶體路徑抑制劑，例如 PS-341、MLN 0.41 或硼替佐米(bortezomib)；
- Yondelis®；
- 端粒末端轉移酶(Telomerase)抑制劑，例如端粒塔汀(telomestatin)；
- 基質金屬蛋白酶抑制劑，例如巴馬司他(batimastat)、立馬司他(marimastat)、匹諾司他(prinostat)或美他司他(metastat)；
- 重組介白素，例如阿地介白素(aldesleukin)、地尼介白素(denileukin diftitox)、干擾素 α 2a、干擾素 α 2b、聚乙二醇干擾素 α 2b。
- MAPK 抑制劑
- 類視色素，例如 9 順維甲酸(Alitretinoin)、蓓薩羅丁(bexarotene)、維生素 A 酸(tretinoin)。
- 三氧化二砷
- 天門冬醯胺酶
- 類固醇，例如屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、諾龍(nandrolone) (癸酸，苯丙酸)，地塞米松(dexamethasone)。
- 促性腺激素釋放荷爾蒙激動劑或拮抗劑，例如阿巴瑞克(abarelix)、乙酸戈舍瑞林(goserelin

acetate)、乙酸組胺瑞林(histrelin acetate)、乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)。

- 沙利竇邁(Thalidomide)、來那度胺(lenalidomide)。
- 巯基嘌呤(Mercaptopurine)、米托坦(mitotane)、帕米德諾內(pamidronate)、培加酶(pegademase)、培門冬酶(pegaspargase)、拉布立酶(rasburicase)。
- BH3 結構類似物，例如 ABT-737。
- MEK 抑制劑，例如 PD98059、AZD6244、CI-1040。
- 集落刺激因子類似物，例如非格司亭(filgrastim)、培非司亭(pegfilgrastim)、沙格司亭(sargramostim)；其之促紅細胞生成素或類似物(例如達貝泊汀 α (darbepoetin alfa))；介白素 11；奧普瑞白介素(oprelvekin)、唑來磷酸(Zoledronate)、唑來磷酸(zoledronic acid)；芬太尼(fentanyl)；雙膦酸鹽；帕里伏明(palifermin)。
- 類固醇細胞色素 P450 17 α -羥基酶-17,20-解離酶抑制劑(CYP17)，例如阿比特龍(abiraterone)。

如上所述，本發明化合物在對於放射療法及化學療法感光之腫瘤細胞上亦具有治療之應用。

因此，本發明化合物可使用作為“輻射敏化劑”及/或“化學敏化劑”或可與“輻射敏化劑”及/或“化學敏化劑”合併給予。

本文所使用之“輻射敏化劑”一詞定義為一種分子，較佳地為一種低分子量分子，投與動物治療上有效量，以增加細胞對於離子化輻射的敏感度，及/或促進可以離子化輻射治療之疾病的治療。

本文所使用之“化學敏化劑”一詞定義為一種分子，較佳地為一種低分子量分子，投與動物治療上有效量，以增加細胞對於化學療法的敏感度，及/或促進可以化學療法之疾病的治療。

對於輻射敏化劑作用模式之數種機制在文獻中已被建議，包括：細胞低氧射線輻射敏化劑(例如 2-硝基咪唑化合物、及苯并三吡二氧化物化合物)仿效氧氣或或者是在低氧下表現類似生物還原劑；非細胞低氧輻射敏化劑(例如鹵化嘧啶)可為 DNA 鹼基之類似物，且優先地併入癌症細胞之 DNA，因此促進輻射誘導破壞 DNA 分子，及/或避免正常 DNA 修復機制；且在治療疾病中，對於輻射敏化劑的各種其他作用之潛在機制已被假設。

現在許多癌症治療規則使用輻射敏化劑結合 x 射線輻射，x 射線活性化輻射敏化劑之實例包括，但不限於下列：甲硝唑(metronidazole)、米索硝唑(misonidazole)、去甲基米索硝唑(desmethylnisonidazole)、哌莫硝唑(pimonidazole)、依他硝唑(etanidazole)、尼莫拉唑(nimorazole)、絲裂黴素 C(mitomycin C)、RSU 1069、SR 4233、EO9、RB 6145、菸鹼醯胺(nicotinamide)、5-溴去氧尿苷(5-bromodeoxyuridine；BUdR)、5-碘去氧尿苷(5-iododeoxyuridine；IUdR)、溴去氧胞苷(bromodeoxycytidine)、氟去氧尿苷(fluorodeoxyuridine；FudR)、羥基脲、順鉑和其

治療上有效的類似物和衍生物。

癌症之光動力療法(Photodynamic therapy; PDT)使用可見光作為敏化劑之輻射活化劑。光動力輻射敏化劑之實例包括，但不限於下列：血卟啉(hematoporphyrin)衍生物、Photofrin®(福得靈®)，苯并卟啉(benzoporphyrin)衍生物、錫初冬卟啉(tin etioporphyrin)、脫鎂葉綠酸-a (pheoborbide-a)、細菌葉綠素-a (bacteriochlorophyll-a)、萘酞菁(naphthalocyanines)、酞菁(phthalocyanines)、酞菁鋅、和其治療上有效的類似物和衍生物。

輻射敏化劑可結合治療上有效量之一或多種其他化合物投與，包括，但不限於：促進輻射敏化劑併入標靶細胞之化合物；控制療法流程、營養物、及/或氧至標靶細胞程之化合物；具有或不具附加輻射之作用在腫瘤的化學治療藥劑；或其他對於治療癌症或其他疾病治療上有效之化合物。

化學敏化劑可結合治療上有效量之一或多種其他化合物投與，包括，但不限於：促進化學敏化劑併入標靶細胞之化合物；控制療法流程、營養物、及/或氧至標靶細胞程之化合物；作用在腫瘤的化學治療藥劑或其他對於治療癌症或其他疾病治療上有效之化合物。鈣拮抗劑，例如維拉帕米(verapamil)，被發現有用於組合抗腫瘤劑，以建立對於所受化學治療藥劑有抗性之腫瘤細胞的化學敏感性，並實現此化合物在藥劑-敏感性惡疾的效力。

鑑於其有用之藥理性質，本發明組合物之成份，即一或多種其他藥劑及本發明化合物可被調配成各種用於投與目的之醫藥型式。成份可分別被調配成個別醫藥組成物或包含所有成分之單一醫藥組成物。

因此本發明亦關於一種醫藥組成物，其包含一或多種其他藥劑及本發明化合物與醫藥載劑。

本發明進一步關於本發明組合物在製造用於抑制腫瘤細胞生長之醫藥組成物上之用途。

本發明進一步關於一種包含作為第一活性成分之本發明化合物及作為其他活性成分之一或多種抗癌劑的產品，作為在治療罹患癌症之病患時，同時、分離或連續使用之一種組合製劑。

一或多種其他藥劑及本發明化合物可同時投與(例如於分離或單一組成物)，或以任何順序連續投與。在後者之情況，二種或多種化合物將在一期間內並以足以確保達成有益或協同效果之數量及方法投與。將可察知，較佳的方法及投與順序及個別劑量及對於組合物各成份之攝生法將依據欲投與之特定的其他藥劑及本發明化合物、其之投與路徑、欲治療之特定腫瘤及欲治療之特定宿主。最理想的投與方法及順序及劑量及攝生法可經由熟悉技術者使用習知方法而易於決定，並可見於本文開始之資料。

當以組合物給予時，本發明化合物與一或多種其他抗癌劑之重量比可經由熟悉技術者決定。該比

例及確切的劑量及投與頻率依據所使用之特定本發明化合物及其他抗癌劑、欲治療之特定症狀、欲治療之特定病患的症狀嚴重性、年齡、體重、性別、飲食、投與時間及一般生理狀況、投與方式及個體可攝取之其他藥劑，如熟悉技術者所熟知。此外，顯然地，有效之每日藥量可依據授治療之病患的反應及/或依據指定本發明化合物之醫師評估而減少或增加。本式(I)化合物及其他抗癌劑之特定之重量比可在 1/10 至 10/1 之範圍，更特別是 1/5 至 5/1，更特別是 1/3 至 3/1。

鉑配位化合物有利地以體表面積每平方米 1 至 500 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 50 至 400 毫克/米²，特別是，每一療程順鉑的劑量約 75 毫克/米²，而卡鉑約 300 毫克/米²。

紫杉烷類化合物有利地以體表面積每平方米 50 至 400 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 75 至 250 毫克/米²，特別是，每一療程太平洋紫杉醇的劑量約 175 至 250 毫克/米²，而多西紫杉醇約 75 至 150 毫克/米²。

喜樹鹼化合物有利地以體表面積每平方米 1 至 400 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 1 至 300 毫克/米²，特別是，每一療程依立替康的劑量約 100 至 350 毫克/米²，而拓撲替康約 1 至 2 毫克/米²。

抗腫瘤鬼臼毒素衍生物有利地以體表面積每平方米 30 至 300 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 50 至 250 毫克/米²，特別是，每一療程依托泊苷的

劑量約 35 至 100 毫克/米²，而替尼泊約 50 至 250 毫克/米²。

抗腫瘤長春花生物鹼類有利地以體表面積每平方米 2 至 30 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 50 至 250 毫克/米²，特別是，每一療程長春鹼的劑量約 3 至 12 毫克/米²，長春新鹼的劑量約 1 至 2 毫克/米²，而長春瑞賓的劑量約 10 至 30 毫克/米²。

抗腫瘤核苷衍生物有利地以體表面積每平方米 200 至 2500 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 700 至 1500 毫克/米²，特別是，每一療程 5-FU 的劑量約 200 至 500 毫克/米²，吉西他濱約 800 至 1200 毫克/米²，而卡培他濱約 1000 至 2500 毫克/米²。

烷化劑，例如氮芥或亞硝基脲，有利地以體表面積每平方米 100 至 500 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 120 至 200 毫克/米²，特別是，每一療程環磷醯胺的劑量約 100 至 500 毫克/米²，苯丁酸氮芥的劑量約 0.1 至 0.2 毫克/公斤，卡莫司汀的劑量約 150 至 200 毫克/米²，而洛莫司汀的劑量約 100 至 150 毫克/米²。

抗腫瘤蔥環類衍生物有利地以體表面積每平方米 10 至 75 毫克(毫克/米²)之劑量投與，例如 15 至 60 毫克/米²，特別是，每一療程多柔比星的劑量約 40 至 75 毫克/米²，柔紅黴素的劑量約 25 至 45 毫克/公斤，而依達比星的劑量約 10 至 15 毫克/米²。

抗雌激素劑依據特定藥劑及欲治療之症狀，有利地每日以 1 至 100 毫克之劑量投與。它莫西芬有

利地以 5 至 50 毫克之劑量口服投與，較佳地為每日二次 10 至 20 毫克，持續治療足夠時間以達到並維持治療效果。托瑞米芬有利地以每日一次約 60 毫克口服投與，持續治療足夠時間以達到並維持治療效果。阿那曲唑有利地以每日一次約 1 毫克口服投與。屈洛昔芬有利地以每日一次約 20-100 毫克口服投與。雷洛昔芬有利地以每日一次 60 毫克口服投與。依西美坦有利地以每日一次約 25 毫克口服投與。

抗體有利地以體表面積每平方米約 1 至 5 毫克(毫克/米²)之劑量投與，或如果不同，則如技術中所知者。群司珠單抗(trastuzumab)有利地以每一療程體表面積每平方米約 1 至 5 毫克(毫克/米²)之劑量投與，特別是，約 2 至 4 毫克/米²。

這些劑量可例如以每一療程一次、二次或多次投與，其可被分離，例如每 7、14、21 或 28 日。

式(I)化合物、醫藥上可接受加成鹽，特別是醫藥上可接受酸加成鹽、及其立體異構型式可具有有用的診斷性質，因為其可用於偵測或確認標示化合物與其他分子、胜肽、蛋白質、酵素或受體之間複合物之形成。

偵測或確認方法可使用以例如放射線同位素、酵素、螢光物質、發光物質等標示劑標示之化合物。放射線同位素之實例包括 ¹²⁵I、¹³¹I、³H 及 ¹⁴C。酵素一般製作係經由連接適當的基質，之後催化可偵測反應而可被偵測。其之實例包括例如 β-半

乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、鹼金屬磷酸酶、過氧化酶和蘋果酸去氫酶，較佳為辣根過氧化酶(horseradish peroxidase)。發光物質包括例如發光胺(luminol)、發光胺衍生物、螢光素、水母素(aequorin)和螢光素酶。

生物樣本可被定義為體組織或體液。體液之實例為腦脊髓液、血液、血漿、血清、尿液、痰、唾液等。

【實施方式】

下列實施例說明本發明。

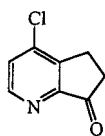
實驗部分

下文中，“DMF”定義為 *N,N*-二甲基甲醯胺，“DCM”定義為二氯甲烷，“DIPE”定義為二異丙基醚，“DMSO”定義為二甲亞砜，“EtOAc”定義為乙酸乙酯，“EtOH”定義為乙醇，“MeOH”定義為甲醇，及“THF”定義為四氫呋喃。

A. 中間產物化合物之製備

實施例 A1

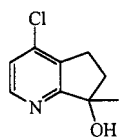
a) 中間產物 1 之製備



將氧化錳(33.31 克，13 當量，0.3832 莫耳)逐份添加至含 4-氯-6,7-二氫-5*H*-環戊[b]吡啶-7-醇(中間產物 3) [CAS 126053-15-4](5 克，1 當量，0.029 莫耳)之 DCM (50 毫升)溶液中，將混合物於室溫攪

拌 24 小時，然後在塞里塑料(celite)上過濾，將溶劑蒸發，產生 3.25 克(66%)之中間產物 1。

b)中間產物 2 之製備

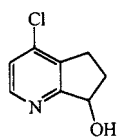


於 -5 至 0°C，在 N₂ 流下，將氯化甲基鎂(1.47 毫升，3.2 當量，0.004 莫耳)逐滴添加至含中間產物 1(0.220 克，1 當量，0.0013 莫耳)之 THF(4 毫升)溶液，反應於室溫攪拌 1.5 小時。

於 0-10°C，添加氯化銨(10%於水中)及 EtOAc，混合物以 EtOAc 萃取三次，然後分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(0.215 克)以管柱層析在矽凝膠上純化(洗提液：環己烷/EtOAc 50/50)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.120 克(50%)之中間產物 2。

實施例 A2

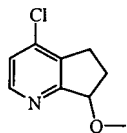
a)中間產物 3 之製備



將四氫硼酸鈉(1.92 克，50.67 毫莫耳)於 5°C 逐份添加至含中間產物 1(7.72 克，46.06 毫莫耳)之 MeOH(80 毫升)溶液中，反應混合物於室溫攪拌 1 晚，然後倒入水中。混合物以 EtOAc 萃取三次，有機層以水及 NaCl 溶液洗滌，分離，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，產生 6.38 克(81.7%)之中

間產物 3(50/50 混合物 RS)。此產物不再純化而於下一步驟中使用。

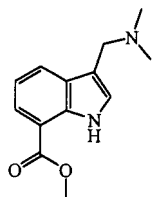
b) 中間產物 4 之製備



在 0°C 及 N₂ 氣壓下，將氫化鈉(1.06 克，44.22 毫莫耳)逐份添加至含中間產物 3(3.00 克，17.70 毫莫耳)之 THF(無水，30 毫升)溶液中，反應於 0°C 攪拌 15 分鐘，然後於 0°C，將碘甲烷(1.65 毫升，26.53 毫莫耳)逐滴添加至混合物中。反應於室溫攪拌 1 晚，冷卻混合物至室溫，並逐滴添加冷水。攪拌混合物 1 小時，然後以 EtOAc 萃取三次。分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，產生 3.10 克(95.4%)之中間產物 4。此產物不再純化而於下一步驟中使用。

實施例 A3

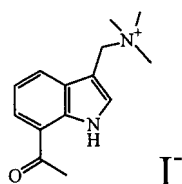
a) 中間產物 5 之製備



將含 1*H*-吲哚-7-羧酸甲酯(0.091 莫耳)、埃申莫澤爾鹽(Eschenmoser's salt)(0.1 莫耳)之乙酸(300 毫升)於 65°C 加熱 2 小時，過濾出沉澱物，溶於 DCM 及碳酸鉀 10%，添加碳酸鉀(固體)，並將混合物於室溫攪拌 1 小時，然後萃取。分離有機層，在 MgSO₄

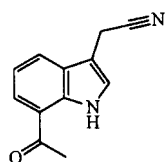
上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，產生 10 克中間產物 5。

b) 中間產物 6 之製備



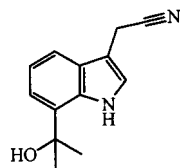
將含中間產物 5(0.043 莫耳)、碘甲烷(0.047 莫耳)之 EtOH(300 毫升)於室溫攪拌隔夜，過濾出沉澱物，並乾燥，產生 8.3 克之中間產物 6。

c) 中間產物 7 之製備



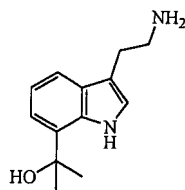
將含中間產物 6(0.023 莫耳)、氰化鈉(0.03 莫耳)之 DMF(100 毫升)於 110°C 加熱 2 小時。將反應混合物倒入冰水中，攪拌 1 小時。過濾出沉澱物，並於 DCM 中收取。萃取溶液，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並蒸發，產生 5.1 克之中間產物 7。

d) 中間產物 8 之製備



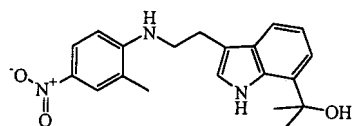
於 5°C，N₂ 流下，將氯化甲基鎂(0.058 莫耳)逐滴添加至含中間產物 7(0.018 莫耳)之 THF(50 毫升)溶液中，反應混合物於 5°C 攪拌 1 小時。於 5°C 逐滴添加氯化銨 10%，反應混合物以 EtOAc 萃取。分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並蒸發，產生 4 克之中間產物 8。

e) 中間產物 9 之製備



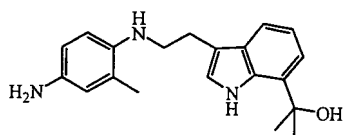
將含中間產物 8(0.019 莫耳)、雷氏鎳(4 克)之 MeOH/NH₃ (50 毫升)於室溫在 3 巴壓力下氫化 2 小時，將反應混合物在塞里塑料上過濾，以 DCM 洗滌，並將濾液蒸發，產生 3.5 克之中間產物 9。

f) 中間產物 10 之製備



將含中間產物 9(0.016 莫耳)、2-氟-5-硝基甲苯(0.018 莫耳)、碳酸一鈉陰離子(0.019 莫耳)之 DMSO(100 毫升)混合物於 60°C 加熱隔夜，混合物冷卻至室溫。添加冰水，添加 DCM。萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並濃縮。殘餘物以管柱層析在矽凝膠上純化(洗提液：環己烷/EtOAc 60/40)，收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 2.8 克之中間產物 10。

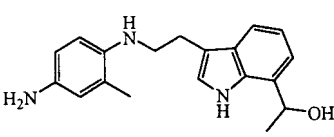
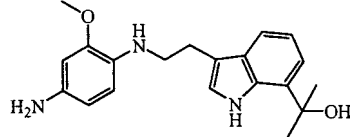
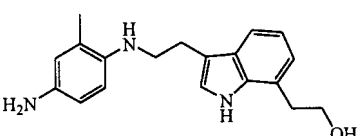
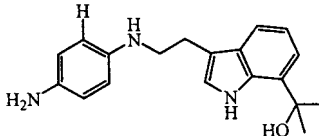
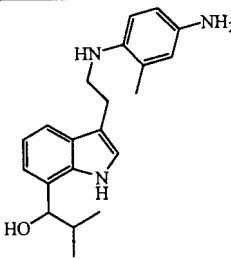
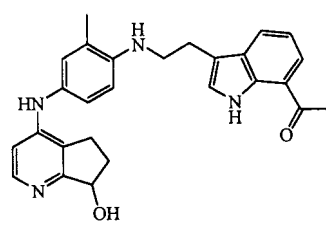
g) 中間產物 11 之製備



將含中間產物 10(0.0079 莫耳)、氧化鈮(0.05 克)、噻吩(4%)之 DIPE (1 毫升)溶液、Pt/C 5% (1.3 克)之 THF (50 毫升)於大氣壓力下於室溫氫化 1

晚。過濾反應，並將溶劑蒸發，產生中間產物 11，此產物不再純化而於下一步驟中使用。

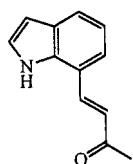
下列中間產物根據方法 A3 製作。

	
中間產物 No. 44	中間產物 No.45
	
中間產物 No.46	中間產物 No.47
	
中間產物 No.48	中間產物 No. 49

實施例 A4

中間產物 7 亦可另以下列製備。

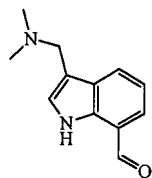
a) 製備中間產物 12



將 1-(三苯基膦烯)-2-丙酮(34.4 毫莫耳)於室溫逐份添加至含 1H-吡啶-7-甲醛(34.44 毫莫耳)之甲基-苯(60 毫升)溶液中。將反應混合物於 100°C 加熱 3 小時，然後冷卻至室溫並蒸發至乾燥。殘餘物(17.4 克)經 HPLC 於二氧化矽上純化：20-45 微米(450

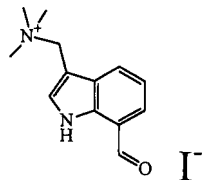
克)，(洗提液 99.5/0.5 DCM/MeOH)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 4.3 克中間產物 12。

b) 製備中間產物 13



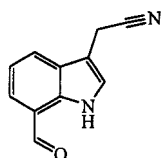
將含中間產物 12(3.4 毫莫耳)及埃申莫澤爾鹽(3.8 毫莫耳)之乙酸(10 毫升)於 65°C 加熱 2 小時。濾出沉澱物，溶於 DCM 及碳酸鉀 10%。添加碳酸鉀(固體)，並將混合物於室溫攪拌 1 小時。萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，產生 0.7 克之中間產物 13。

c) 製備中間產物 14



將含中間產物 13(0.13 毫莫耳)、碘甲烷(0.14 毫莫耳)之 EtOH(300 毫升)於室溫攪拌 2 日，濾出沉澱物並乾燥，產生 47 克之中間產物 14。

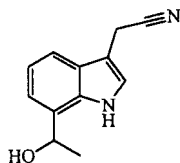
d) 製備中間產物 15



將含中間產物 14(136.5 毫莫耳)、氰化鈉(177.5 毫莫耳)之 DMF(400 毫升)於室溫攪拌 2 小時，添加水並以 EtOAc 萃取反應混合物。分離有機層，在

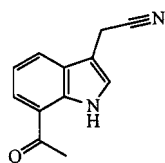
MgSO₄ 上乾燥，過濾及蒸發。殘餘物以高效能液體層析(Irregular SiOH 20-45 毫米 1000g MATREX)純化。移動相：環己烷 70%/EtOAc 30%)。收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 11.8 克之中間產物 15。

e) 製備中間產物 16



將氯化甲基鎂(0.07 莫耳)逐滴添加至含中間產物 15 (0.022 莫耳)之 THF (50 毫升)溶液，添加 NH₄Cl 10%及 EtOAc。萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(2.9 克)以高效能液體層析(Irregular SiOH 20-45 微米 450g MATREX)純化，移動相：環己烷 60%/EtOAc 40%)。收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 2 克之中間產物 16。

f) 製備中間產物 7



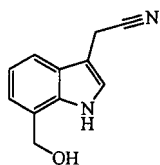
將戴斯 - 馬丁過碘烷 (Dess-Martin periodinane)(24.9 毫升)於室溫逐滴添加至含中間產物 16 (10 毫莫耳)之 DCM (20 毫升)溶液。反應混合物於室溫攪拌 1 小時，然後倒入冰水中，於塞里塑料上過濾，並將濾液以 DCM 萃取。分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並濃縮溶劑。殘餘物(2.8 克)以管柱層析在矽凝膠上純化(洗提液為環己烷

/EtOAc 60/40)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.8 克之中間產物 7。

實施例 A5

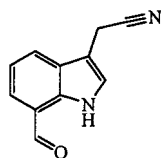
中間產物 15 亦可另依下列製備。

a) 製備中間產物 17



將四氫鋁酸鋰(0.018 莫耳，0.69 克)於 5°C 在 N₂ 氣流下，逐份添加至含 3-(氰基甲基)-1H-吲哚-7-羧酸甲酯(0.012 莫耳，2.6 克)之 THF(50 毫升)溶液中，反應混合物於室溫攪拌 30 分鐘，於 5°C 逐滴添加水，並將反應混合物於塞里塑料上過濾，以 EtOAc 洗滌並萃取。分離有機層，於 MgSO₄ 上乾燥，過濾及濃縮，產生 2.4 克之中間產物 17。

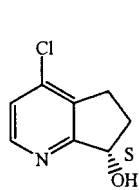
b) 製備中間產物 15



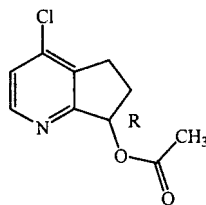
將戴斯-馬丁過碘烷(0.016 莫耳)於 5°C 逐滴添加至含中間產物 17(0.0081 莫耳)之 DCM(15 毫升)溶液中，反應混合物於室溫攪拌 2 小時。將反應混合物於塞里塑料上過濾，蒸發濾液，殘餘物在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液為環己烷/EtOAc 70/30)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.5 克之中間產物 15。

實施例 A6

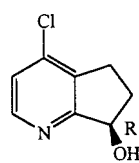
製備中間產物 18、19 及 20



(S)



(R)



(R)

中間產物 18

中間產物 19

中間產物 20

將 4-氯-6,7-二氫-5H-環戊[b]吡啶-7-醇(5 克, 0.029 莫耳)及南極假絲酵母脂肪酶 B (Lipase Candida Antartica B) (2.5 克)之乙酸乙烯酯(50 毫升)混合物於室溫攪拌 4 小時, 將反應混合物於塞里塑料上過濾, 塞里塑料以 DCM 洗滌, 將濾液之溶劑蒸發, 殘餘物(6.3 克)在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液: DCM/MeOH 由 100/0 至 98/2; 15-40 微米), 收集二種不同產物濾份, 並將各產物濾份之溶劑蒸發, 產生 2.1 克之中間產物 18(42%; S-對映異構物), 及 3.6 克之中間產物 19(58%; R-對映異構物)。當所欲中間產物 19 可經由在 MeOH/NH₃ 反應被轉換成中間產物 18 之 R 對映異構物時, 產生中間產物 20。

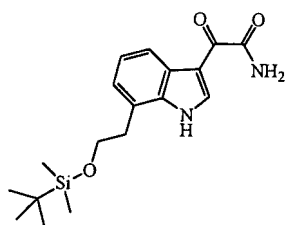
中間產物 18 及 20 亦另可如下製備。

將四氫硼酸鈉(1.37 克, 36.10 毫莫耳)於 5°C 逐份添加至含中間產物 1(5.50 克, 32.82 毫莫耳)之 MeOH(50 毫升)溶液中, 反應混合物於室溫攪拌 1 晚, 然後倒入水中, 並將混合物以 EtOAc 萃取三次。有機層以水及 NaCl 水溶液洗滌, 分離, 在 MgSO₄ 上乾燥, 過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(4.42 克)在對

掌性 PAK AD-H 5 微米 250x20 毫米上，經對掌性超臨界液體層析純化，移動相：85% CO₂，15% MeOH。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 1.625 克(29.2%)化合物 18(S-對映異構物)(DMF，20°C，濃度 0.33w/v%，589 奈米：-77.58°)，及 1.620 克(29.1%)化合物 20(R-對映異構物)(DMF，20°C，濃度 0.33w/v%，589 奈米：+76.74°)。

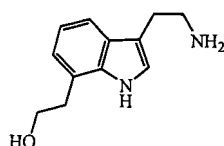
實施例 A7

製備中間產物 21



將草醯氯(0.0079 莫耳)於 5°C 逐滴添加至含 7-[2-[[[(1,1-二甲基乙基)二甲基矽烷基]氧基]乙基]-1H-吲哚(0.0047 莫耳)之二乙醚(20 毫升)。反應混合物於 5°C 攪拌 2 小時。於 5°C 逐滴添加 NH₄OH(濃，20 毫升)至溶液。反應混合物於室溫攪拌隔夜。添加水及 EtOAc，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並濃縮，產生 1.8 克之中間產物 21。

製備中間產物 22

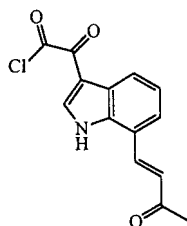


將四氫鋁酸鋰(0.021 莫耳)於 5°C 逐份添加至含中間產物 21(0.0052 莫耳)之 THF(50 毫升)溶液。混合物於回流攪拌隔夜，然後冰浴冷卻至 5°C。逐

滴添加水將過量四氫鋁酸鋰小心地水解，在塞里塑料上濾出混合物，以 DCM 洗滌並萃取。分離有機層，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並濃縮，產生 0.6 克之中間產物 22。

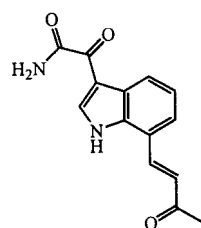
實施例 A8

a) 製備中間產物 23



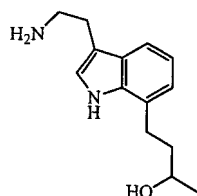
將草醯氯(2.9 毫莫耳)於 5°C 逐滴添加至含 4-(1H-吲哚-7-基)-3-丁烯-2-酮(2.7 毫莫耳)之二乙醚(10 毫升)溶液。移除冷浴，並使反應溫熱至室溫(1.5 小時)。濾出沉澱物並乾燥，產生 0.49 克之中間產物 23。

b) 製備中間產物 24



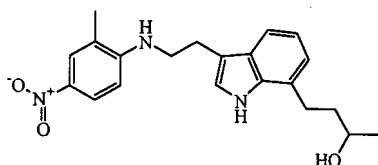
將氫氧化銨(10 毫升)於 5°C 逐滴添加至含中間產物 23(0.725 毫莫耳)之二乙醚(10 毫升)溶液，反應混合物於室溫攪拌隔夜。濾出沉澱物並乾燥，產生 0.11 克之中間產物 24。

c) 製備中間產物 25



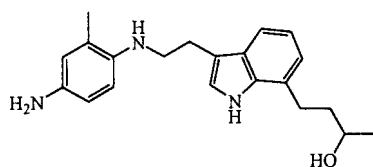
將四氫鋁酸鋰(39.5 毫莫耳)於 5°C 逐份添加至含中間產物 24(7.9 毫莫耳)之 THF(20 毫升)溶液，混合物於 80°C 攪拌 2 小時，然後在冰浴上於 5°C 冷卻。經由逐滴添加水，小心水解過量之四氫鋁酸鋰。在塞里塑料上濾出混合物，以 DCM 洗滌並萃取。分離有機層，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並濃縮，產生 1 克之中間產物 25。

d) 製備中間產物 26



將中間產物 25 (4.3 毫莫耳)、2-氟-5-硝基甲苯(4.7 毫莫耳)、碳酸一鈉陰離子(5.1 毫莫耳)之 DMSO(10 毫升)混合物於 60°C 加熱隔夜，將混合物冷卻至室溫，添加冰水，添加 DCM。萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並蒸發。殘餘物經由管柱層析純化(洗提液：DCM/MeOH 97/3)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，殘餘物經高效能液體層析(Irregular SiOH 15-40 微米 300g MERCK)純化，移動相(NH_4OH 0.1%-二氯甲烷 99%-MeOH 1%)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 200 毫克之中間產物 26。

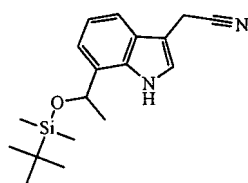
e) 製備中間產物 27



將含中間產物 26(0.35 毫莫耳)、雷氏鎳(200 毫克)之 MeOH(5 毫升)混合物在大氣壓下於室溫氫化，殘餘物於塞里塑料上過濾，以 DCM 洗滌並將殘餘物蒸發，產生 0.14 克之中間產物 27。

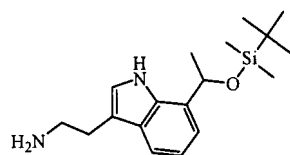
實施例 A9

a) 製備中間產物 28



將第三丁基二甲基矽烷基氯(195 毫克，0.91 毫莫耳)於室溫添加至含中間產物 16(162 毫克，0.81 毫莫耳)、咪唑(143 毫克，2.1 毫莫耳)之 THF(5 毫升)溶液，反應混合物於室溫攪拌隔夜，濾出沉澱物並以 DCM 洗滌。蒸發濾液，殘餘物(365 毫克)在矽凝膠上以驟層析純化(15-40 微米，30g，DCM/MeOH：100/0 至 99/1)。收集純的濾份並蒸發至乾燥，產生 190 毫克之中間產物 28。

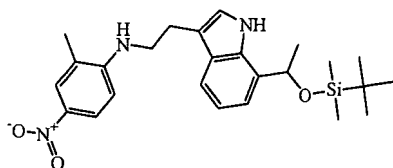
b) 製備中間產物 29



將含中間產物 28(190 毫克，0.6 毫莫耳)、雷氏鎳(0.7g)之 NH₃ 之 MeOH 7N(10 毫升)在 3 巴之 H₂ 下於室溫攪拌 4 小時。將反應於塞里塑料上過濾並

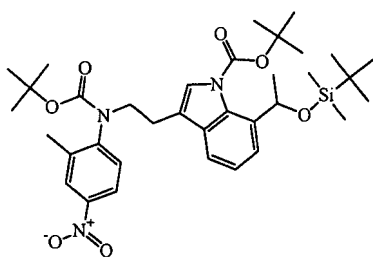
將塞里塑料以 DCM/MeOH(90/10)洗滌三次。將溶劑蒸發而獲得 147 毫克之中間產物 29。

c)製備中間產物 30



將含中間產物 29(147 毫克，0.46 毫莫耳)、1-氟-2-甲基-4-硝基-苯(78 毫克，0.51 毫莫耳)、碳酸鈉鹽(1：1)(85 毫克，1 毫莫耳)之 DMSO(2 毫升)混合物於 65°C 加熱 1 晚，將混合物倒入冰中，並攪拌 10 分鐘，添加 DCM 並將混合物以 DCM 萃取二次。有機層以水洗滌，然後在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，殘餘物在上矽凝膠以驟層析純化(15-40 微米，30g，環己烷/EtOAc 85/15)。收集純的濾份，並蒸發至乾燥，產生 200 毫克之中間產物 30。

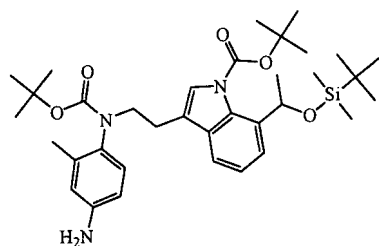
d)製備中間產物 31



將含中間產物 30(2.8 克，6.17 毫莫耳)、二第三丁基二碳酸酯(8 克，37 毫莫耳)、4-二甲基胺基吡啶(0.15 克，1.2 毫莫耳)及三乙胺(1.89 毫升，13.6 毫莫耳)之 THF(50 毫升)於 60°C 攪拌 24 小時，蒸發混合物至乾燥，殘餘物(7.4 克)在矽凝膠(Cartridge 15-40 微米，90g)上以高效能液體層析純化，移動相

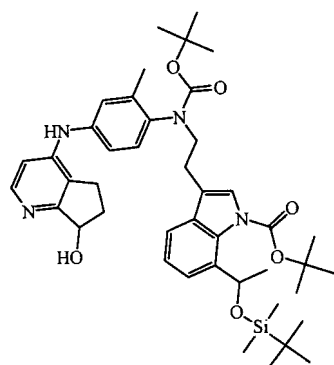
(環己烷 50%；二氯甲烷 50%)。收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 3.3 克之中間產物 31。

e) 製備中間產物 32



將含中間產物 31(3.3 克，5 毫莫耳)、雷氏鎳(3 克)之 MeOH(100 毫升)混合物於 2.5 巴氫化 2 小時。將殘餘物於塞里塑料上過濾，以 DCM 洗滌，並將殘餘物蒸發，產生 2.7 克之中間產物 32。

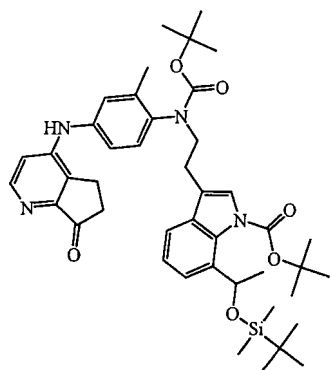
f) 製備中間產物 33



將含中間產物 32(2.6 克，4.2 毫莫耳)、4-氯-6,7-二氫-5H-環戊[b]吡啶-7-醇(0.78 克，4.6 毫莫耳)、HCl 4M 之二噁烷(0.21 毫升，0.8 毫莫耳)於乙腈(28 毫升)及 EtOH(7 毫升)中於 65°C 加熱 72 小時。冷卻至室溫後，添加水及碳酸鉀粉末，並將混合物以 EtOAc 萃取二次。有機層以水洗滌，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並蒸發。殘餘物以高效能液體層析(Irregular SiOH 20-45 微米 450g MATREX)純化，移動相(NH₄OH 0.5%；二氯甲烷 95%；MeOH 5%)。

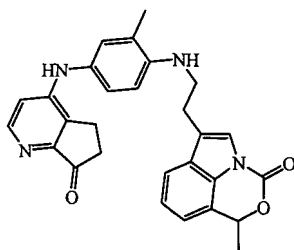
收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 2.35 克之中間產物 33。

g) 製備中間產物 34



將氧化錳(IV)(4.3 克)於室溫逐份添加至含中間產物 33(2.2 克，2.9 毫莫耳)及三(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)胺(47 毫克，0.145 毫莫耳)之 DCM(50 毫升)溶液，混合物於室溫攪拌 18 小時。將混合物於塞里塑料上過濾，塞里塑料以 DCM 洗滌，並將溶劑蒸發，產生 1.84 克之中間產物 34。

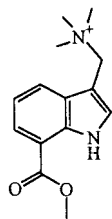
h) 製備中間產物 35



將含中間產物 34(1.2 克，1.6 毫莫耳)之三氟乙酸(1.2 毫升，15.9 毫莫耳)及 DCM(10 毫升)於室溫攪拌 2 日，添加碳酸鉀 10%，並將混合物以 DCM 萃取二次，有機層在 MgSO_4 上乾燥，過濾並蒸發，獲得 0.8 克之中間產物 35。其不再純化而於下一步驟使用。

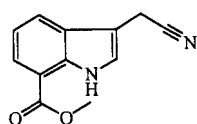
實施例 A10

a) 製備中間產物 36



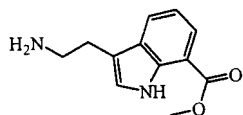
將碘甲烷(0.024 莫耳)添加至含 3-[(二甲基氨基)甲基]-1H-吲哚-7-羧酸甲酯(0.022 莫耳)之 EtOH(50 毫升)溶液。混合物於室溫攪拌隔夜，然後於真空中濃縮至乾燥，產生 5.6 克(68%)之中間產物 36。

b) 製備中間產物 37



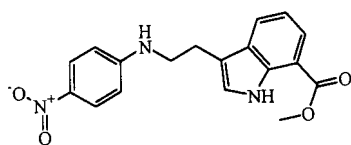
將含中間產物 36(0.015 莫耳)及氰化鈉(0.019 莫耳)之 DMF(60 毫升)混合物於 100°C 攪拌 2 小時，添加水，過濾沉澱物，蒸發濾液，產生 3.5 克(100%)之中間產物 37。

c) 製備中間產物 38



將含中間產物 37(0.016 莫耳)及雷氏鎳(3 克)之 MeOH/NH₃(50 毫升)混合物於室溫在 3 巴壓力下氫化，然後於塞里塑料上過濾，蒸發濾液，產生 3.2 克(89%)之中間產物 38。

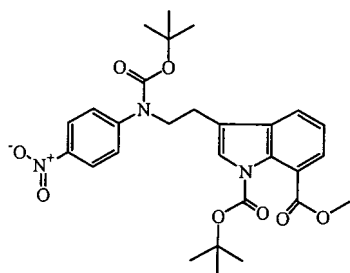
d) 製備中間產物 39



將含中間產物 38(0.0092 莫耳)、1-氟-4-硝基-

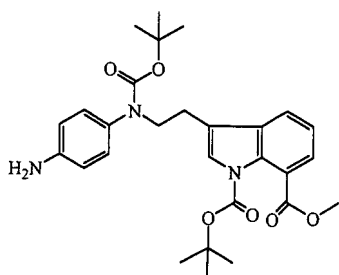
苯(0.01 莫耳)及二異丙基乙基胺(0.023 莫耳)混合物於 180°C 攪拌 2 小時，添加水，混合物以 DCM 萃取，分離有機層，乾燥(MgSO₄)，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(2.6 克)在 kromasil®上以管柱層析純化(洗提液：環己烷/EtOAc 60/40)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 1.4 克(45%)之中間產物 39。

e)製備中間產物 40



將第三丁氧基羰基酐(0.015 莫耳)於室溫添加至含中間產物 39(0.05 莫耳)及 4-(二甲基胺基)吡啶(少量)之 THF (50 毫升)混合物中，將混合物於室溫攪拌隔夜，混合物以 EtOAc 萃取，有機層以水洗滌，乾燥(MgSO₄)，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(4 克)在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液：環己烷/EtOAc 60/40)。收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 3.3 克(82%)之中間產物 40。

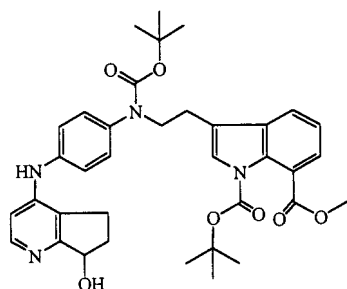
f)製備中間產物 41



將含中間產物 40(0.0061 莫耳)及雷氏鎳(3.3 克)

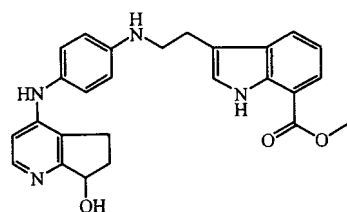
之 MeOH(50 毫升)混合物於室溫在 3 巴壓力下氫化，然後在塞里塑料上過濾，將塞里塑料以 DCM/MeOH(98/2)洗滌，蒸發濾液，殘餘物(2.8 克)在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液：環己烷/EtOAc 70/30)，收集純的濾份，並將溶劑蒸發，產生 1.3 克之(42%)之中間產物 41。

g)製備中間產物 42



將含中間產物 41(0.0018 莫耳)、4-氯-6,7-二氫-5H-環戊[b]吡啶-7-醇(0.33 克)及 HCl/異丙醇(5 低)之乙腈(20 毫升)混合物於 65°C 攪拌 24 小時，添加碳酸鉀 10%，混合物以 EtOAc 萃取，分離有機層，乾燥(MgSO₄)，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(1.1 克)在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液：DCM/MeOH/NH₄OH 95/5/0.1)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.054 克之中間產物 42。

h)製備中間產物 43



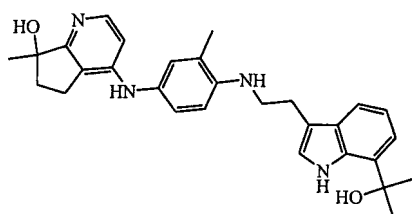
將含中間產物 42(0.0009 莫耳)及 HCl 3N(0.0039 莫耳)之乙腈(10 毫升)混合物於 65°C 攪

拌 3 小時，添加碳酸鉀 10%，混合物以 EtOAc 萃取，分離有機層、乾燥(MgSO_4)、過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(0.4 克，100%)由二乙醚/乙腈結晶，濾出沉澱物並乾燥，產生 0.3 克之中間產物 43，熔點 164°C 。

B. 製備最終化合物

實施例 B1

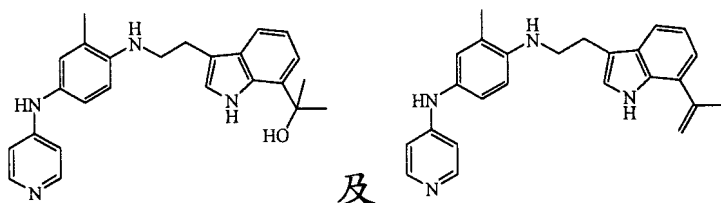
製備化合物 1



將中間產物 11(1.00 克，3.092 毫莫耳)、中間產物 2(0.437 克，2.381 毫莫耳)、 HCl (0.155 毫升，0.618 毫莫耳)之乙腈(10 毫升)於 65°C 攪拌 5 小時，將反應冷卻至室溫，然後以碳酸鉀(10%於水中)鹼化，並以 DCM 萃取三次，有機層以水洗滌，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發，殘餘物(1.37 克)在二氧化矽上以正相層析純化(5 微米 150x30.0 毫米)。移動相(梯度由 0% NH_4OH 、100% DCM、0% MeOH 至 0.8% NH_4OH 、92% DCM、8% MeOH)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，收取殘餘物(0.350 克)至乙腈中於室溫 1 週，結晶此產物並過濾及在真空中乾燥，產生 300 毫克(20.8%)之化合物 1，熔點 209°C 。

實施例 B2

製備化合物 2 及 3



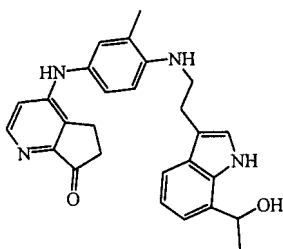
化合物 2

化合物 3

將含中間產物 11(0.0031 莫耳)、N,N-二異丙基乙基胺(0.0028 莫耳)、4-溴吡啶鹽酸鹽(0.0034 莫耳)之乙腈(20 毫升)溶液於 65°C 加熱 6 小時，添加碳酸鉀 10%及 EtOAc。萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並濃縮。殘餘物(1.3 克)在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液 95/5/0.5 DCM/MeOH/NH₄OH)。收集二種濾份，並將溶劑蒸發，獲得 60 毫克化合物 3 及 80 毫克 F2。殘餘物 F2(80 毫克)以超臨界液體層析純化(AMINO 管柱 150x21.2mm)洗提液：MeOH/CO₂ 30/70)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 43 毫克之化合物 2。

實施例 B3

製備化合物 4

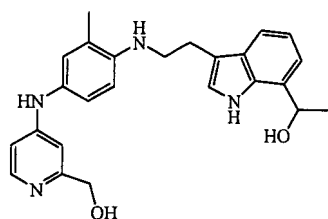


將含中間產物 35(0.8 克，1.7 毫莫耳)及氫氧化鈉 3N(2.57 毫升，2.57 毫莫耳)之 EtOH(22 毫升)及 THF(10 毫升)於室溫攪拌 30 分鐘，添加 NH₄Cl 10% 及 DCM，並將混合物在塞里塑料上過濾，傾析有機層，在上 MgSO₄ 乾燥，過濾並蒸發。殘餘物以在

Spherical SiOH 10 微米 60g (PharmPrep MERCK) 上以正相純化，移動相(NH_4OH 0.1%，95% DCM，5% MeOH)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 250 毫克之化合物 4。

實施例 B4

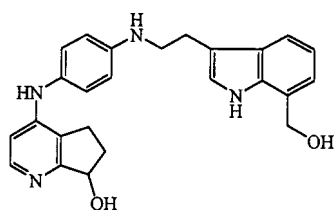
製備化合物 5



將四氫硼酸鈉(0.69 毫莫耳)於 5°C 添加至含中間產物 49(0.46 毫莫耳)之 MeOH(5 毫升)溶液。反應混合物於室溫攪拌隔夜，添加水，以 EtOAc 萃取反應混合物，分離有機層，在 MgSO_4 上乾燥，過濾並蒸發。殘餘物(0.14 克)於乙腈中結晶，濾出沉澱物並乾燥，產生 0.1 克之化合物 5。

實施例 B5

製備化合物 6

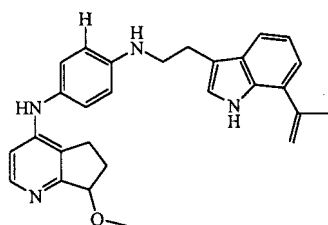


將四氫鋁酸鋰(0.0003 莫耳)於 5°C 逐份在 N_2 氣流下添加至含中間產物 43(0.0002 莫耳)之 THF(4 毫升)溶液。混合物於室溫攪拌 2 小時，添加水。混合物以 EtOAc 萃取，分離有機層，乾燥(MgSO_4)，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物(0.18 克)在 kromasil® 上以管柱層析純化(洗提液： $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$

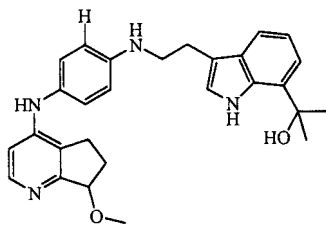
98/2/0.2 至 85/15/1；3.5 微米)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.066 克(70%)之化合物 6。

實施例 B6

製備化合物 7 及 8



及



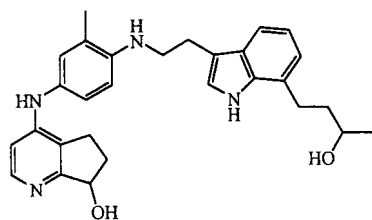
化合物 7

化合物 8

將含中間產物 47(1.00 克，3.23 毫莫耳)、中間產物 4 (0.653 克，3.55 毫莫耳)、HCl/二噁烷(0.242 毫升，0.97 毫莫耳)之乙腈(15 毫升)於 70°C 攪拌 1 晚。將反應混合物冷卻至室溫，然後添加水、碳酸鉀(10%於水中)，混合物以 DCM 萃取三次，分離有機層，在 MgSO₄ 上乾燥，過濾並將溶劑蒸發。殘餘物在矽凝膠(Cartridge 15-40 微米 30g)上以正相純化，移動相(96% DCM，4% MeOH)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 0.092 克(6.5%)之化合物 7 及 0.030 克(2.0%)之化合物 8。

實施例 B7

製備化合物 9

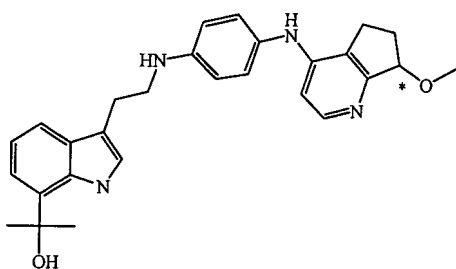


將中間產物 27(0.41 毫莫耳)及 4-氯-6,7-二氫-5H-環戊[b]吡啶-7-醇(0.46 毫莫耳)於 125°C 加熱 2

小時，殘餘物在矽凝膠上以管柱層析純化(洗提液 90/10/0.1 DCM/MeOH/NH₄OH)。收集純的濾份並將溶劑蒸發，產生 58 克之化合物 9。

實施例 B8

製備化合物 24 及 25



Co.No.24 : *S

Co.No.25 : *R

*意指相對立體化學(絕對之立體化學並未知)。因此，若化合物 24 為 S 對映異構物，則化合物 25 為 R 對映異構物，或若化合物 24 為 R 對映異構物，則化合物 25 為 S 對映異構物。

反應在 N₂ 氣壓下進行，將含中間產物 47(11.31 毫莫耳)、中間產物 4(12.44 毫莫耳)、Pd(dba)₂(1.13 毫莫耳)、BINAP(1.13 毫莫耳)及 tBuONa(22.62 毫莫耳)之甲苯(100 毫升)混合物於回流攪拌隔夜。過濾混合物，以 MeOH 洗滌，並以高效能液體層析(管柱 Synergi 50*250 毫米，10 微米；洗提液：CH₃CN/H₂O(0.1%三氟乙酸)，15% CH₃CN 梯度於時間 0 分鐘至 40% CH₃CN 於時間 25 分鐘)純化。收集所欲濾份，並將溶劑於真空中蒸發，殘餘物以 DCM 萃取，以 NaHCO₃ 水溶液洗滌，在 Na₂SO₄ 上乾燥，

過濾並蒸發，獲得化合物 8(3.8 克，98%純度，65%產率)，其分離係經由超臨界液體層析 Chiralcel OJ, 20 微米，250 毫米* 20 毫米；超臨界 CO₂：異丙醇 (0.05%二乙基胺)，40：60 v/v, 70 毫升/分鐘)，獲得二種濾份；

1000.79 毫克 (19%) 之化合物 24，熔點 110.5-111.6°C，

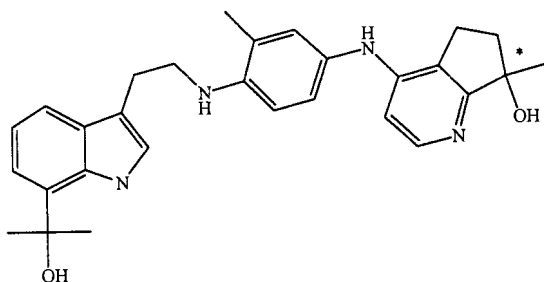
(ee%=99%， $[\alpha]_D^{20} = +5.034^\circ$ ，(波長=589，20°C 於甲醇中，濃度 10.33 毫克/毫升)

及 939.19 毫克 (18%) 之化合物 25，熔點 111.4-113.3°C。

(ee%=99%， $[\alpha]_D^{20} = -3.443^\circ$ ，(波長=589，20°C 於 MeOH，濃度 10.74 毫克/毫升)

實施例 B9

製備化合物



Co.No. 26：*S

Co.No. 27：*R

*意指相對立體化學(絕對之立體化學並未知)。因此，若化合物 26 為 S 對映異構物，則化合物 27 為 R 對映異構物，或若化合物 26 為 R 對映異構物，則化合物 27 為 S 對映異構物。

反應在 N_2 氣壓下進行，將含中間產物 11(9.25 毫莫耳)、中間產物 2(9.25 毫莫耳)、 $tBuONa$ (18.5 毫莫耳)、 $Pd(dba)_2$ (0.93 毫莫耳)及 $BINAP$ (0.93 毫莫耳)之甲苯(40 毫升)混合物於回流加熱並攪拌 3 小時。將所產生之混合物冷卻至室溫並過濾，於真空中蒸發濾液，並將殘餘物以高效能液體層析(管柱 Synergi 50*250 毫米，10 微米；洗提液： CH_3CN/H_2O (0.1%三氟乙酸)，梯度 10% CH_3CN 於時間 0 分鐘至 40% CH_3CN 於時間 25 分鐘)純化。收集所欲濾份，並調整至 $pH > 7$ 。濃縮溶劑，並以乙酸乙酯萃取(3 次 100 毫升)，所欲之有機層以鹽水洗滌，在 Na_2SO_4 上乾燥，過濾並將溶劑於真空中蒸發，獲得 2.5 克(57%)之化合物 1，其以超臨界液體層析分離(AD 250 毫米*20 毫米，20 微米；超臨界 CO_2 ：異丙醇(0.05% 二乙基胺) 40：60，v/v，70 毫升/分鐘)，獲得 2 種濾份。

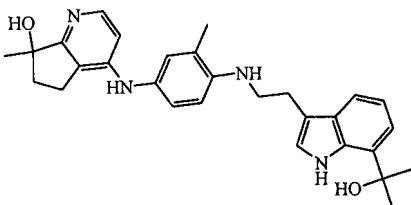
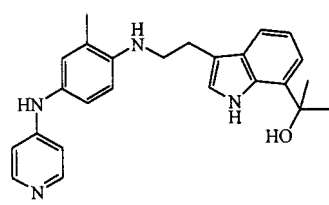
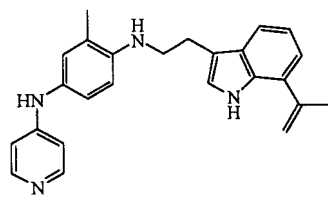
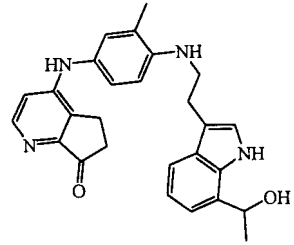
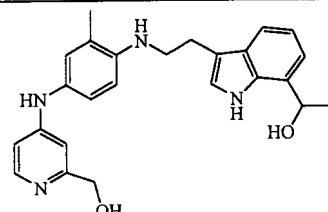
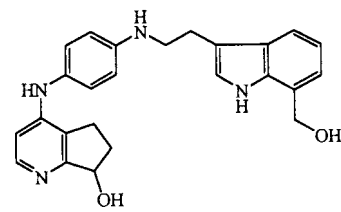
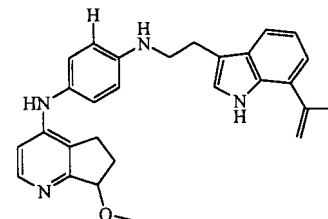
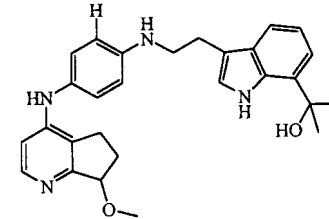
濾份 1 (1 克)進一步以高效能液體層析純化(管柱 Synergi 50*250，10 微米；洗提液： CH_3CN/H_2O (0.1%三氟乙酸)，梯度 10% CH_3CN 於時間 0 分鐘至 40% CH_3CN 於時間 25 分鐘)，獲得 0.88 克(20%)化合物 26，熔點 $122.3-124^{\circ}C$ ，(ee=100%)。

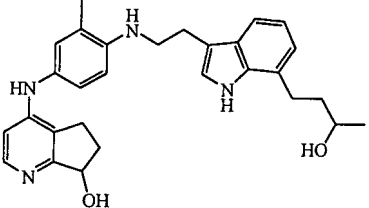
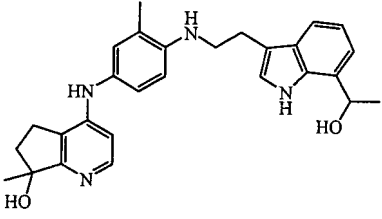
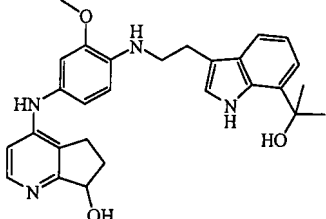
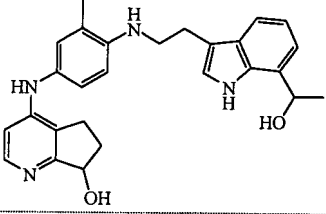
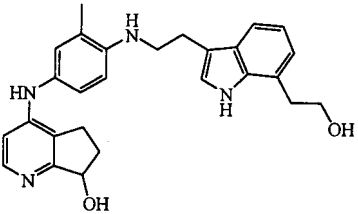
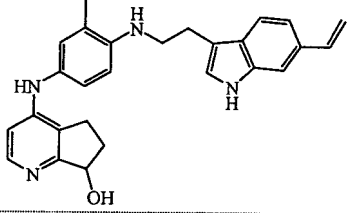
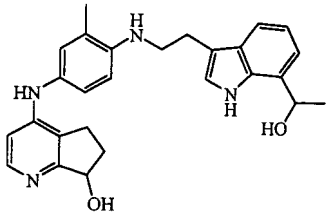
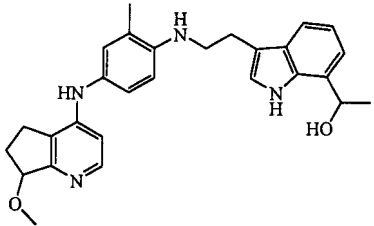
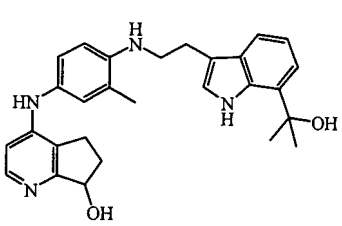
濾份 2(1 克)進一步以高效能液體層析純化(管柱 Synergi 50*250，10 微米；洗提液： CH_3CN/H_2O (0.1%三氟乙酸)，梯度 10% CH_3CN 於時間 0 分鐘至 40% CH_3CN 於時間 25 分鐘)，獲得 0.96 克(22%)之化合物 27，熔點 $121.4-122.6^{\circ}C$ ，

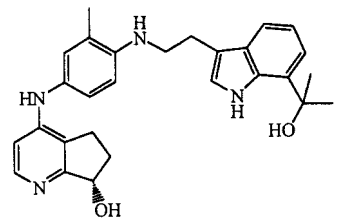
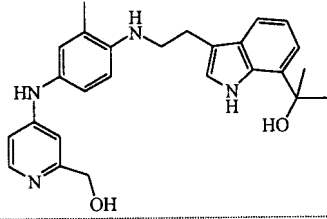
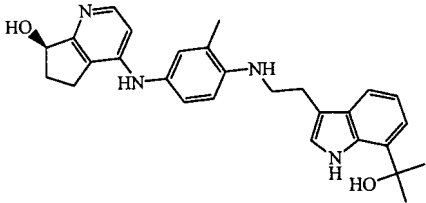
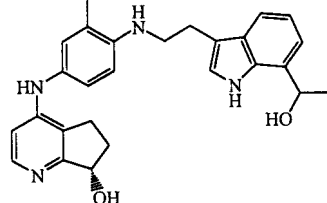
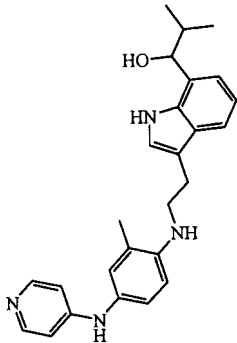
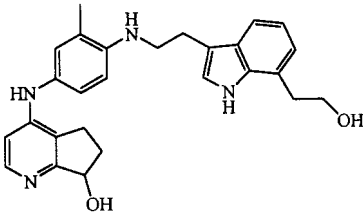
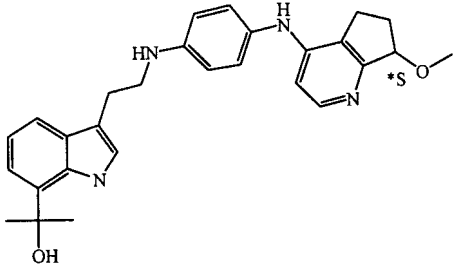
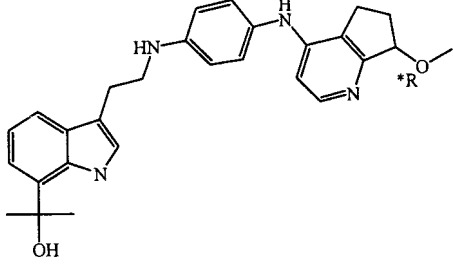
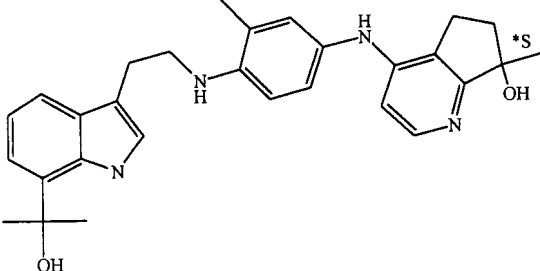
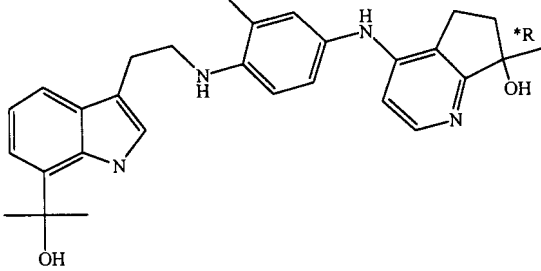
(ee=99%) .

表 1 列出根據上述實施例之一者製備之化合物。

表 1

	
Co. No. 1 ; Ex. [B1]	Co. No. 2 ; Ex. [B2]
	
Co. No. 3 ; Ex. [B2]	Co. No. 4 ; Ex. [B3]
	
Co. No. 5 ; Ex. [B4]	Co. No. 6 ; Ex. [B5]
	
Co. No. 7 ; Ex. [B6]	Co. No. 8 ; Ex. [B6]

	
Co. No. 9 ; Ex. [B7]	
	
Co. No. 10 ; Ex. [B1]	Co. No. 11 ; Ex. [B1]
	
Co. No. 12 ; Ex. [B1]	Co. No. 13 ; Ex. [B1]
	
Co. No. 14 ; Ex. [B1]	Co. No. 15 ; Ex. [B1]
	
Co. No. 16 ; Ex. [B1]	Co. No. 17 ; Ex. [B1]

	
Co. No. 18 ; Ex. [B1] ;	Co. No. 19 ; Ex. [B1] ;
	
Co. No. 20 ; Ex. [B1]	Co. No. 21 ; Ex. [B1]
	
Co. No. 22 ; Ex. [B2]	Co. No. 23 ; Ex. [B1]
	
Co. No. 24 ; Ex. [B8]	Co. No. 25 ; Ex. [B8]
	
Co. No. 26 ; Ex. [B9]	Co. No. 27 ; Ex. [B9]

Co. No. 28 ; Ex. [B8,9]	Co. No. 29 ; Ex. [B8,9]
Co. No. 30 ; Ex. [B8,9]	Co. No. 31 ; Ex. [B8,9]

*表示相對立體化學

化合物特性

熔點：

數值為峰值或熔化範圍，且其之獲得具有實驗不確定度，通常與其分析方法有關。

Kofler

對於化合物4，以凱氏加熱座(Kofler hot bench)獲得熔點，由具有線性溫度梯度之加熱板、游標及攝氏溫標組成。

WRS-2A

對於化合物11、24、25、26、27、28、29、30、

31，熔點以 WRS-2A 熔點儀決定，其購自 Shanghai Precision and Scientific Instrument Co. Ltd.。熔點以 $0.2-5.0^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 之線性加熱速率測定，報告值為熔化範圍，最大溫度為 300°C 。

DSC

對於化合物 1，熔點以 DSC(微差掃描熱量測定法；differential scanning calorimetry)決定，熔點以 $10^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 之溫度梯度測定，最大溫度為 350°C ，數值為峰值。

LCMS

對於本發明化合物之 LCMS-定性，使用下列程序。

一般程序 A

使用包含具脫氣機之四級泵浦、自動取樣機、二及陣列探測器(DAD)及管柱之 Alliance HT 2795(Waters)系統進行 HPLC 測量，具體說明於下列各別之方法，管柱保持於溫度 30°C 。來自管柱之流被分流至 MS 光譜儀，MS 探測器配有電噴灑離子化源。毛細管針頭之電壓為 3 kV，且在 LCT 上之來源溫度維持在 100°C (Time of Flight Zspray™ 質譜儀，Waters)。使用氮氣作為噴霧器氣體，以 Waters-Micromass MassLynx-Openlynx 數據系統進行數據之取得。

一般程序 B

使用包含具脫氣機之二元泵浦、自動取樣機、二及陣列探測器(DAD)及管柱之 UPLC(超效能液體

層析) Acquity(Waters)系統進行 LC 測量，具體說明於下列各別之方法，管柱保持於溫度 40°C。來自管柱之流被分流至 MS 光譜儀，MS 探測器配有電噴灑離子化源。毛細管針頭之電壓為 3 kV，且在 Quattro 上之來源溫度維持在 130°C(三連式四極質譜儀，Waters)。使用氮氣作為噴霧器氣體，以 Waters-Micromass MassLynx-Openlynx 數據系統進行數據取得。

一般程序 C

使用包含泵浦、自動取樣機、二及陣列探測器 (DAD) (波長使用 220 奈米)及管柱加熱器及管柱之 Agilent 1100 模式進行 HPLC 測量，具體說明於下列各別之方法。來自管柱之流被分流至 Agilent MSD Series G1946C 及 G1956A，MS 探測器配有 API-ES (大氣壓電噴灑離子化)。經由 100 至 1000 之掃描獲得質譜。毛細管針頭之電壓用於正離子化模式為 2500 V，而用於負離子化模式為 3000 V。碎裂電壓(fragmentation voltage)為 50 V，乾燥氣體溫度維持在 350°C，流速 10 公升/分鐘。

方法 1

除了一般程序 A 之外：逆相 HPLC 進行於 Xterra-MS C18 管柱(5 微米，4.6 x 150 毫米)，流速 1.0 毫升/分鐘。二種移動相(移動相 A：100% 7 mM 乙酸銨；移動相 B：100%乙腈)，用於進行梯度條件由 85% A，15% B(保持 3 分鐘)，在 5 分鐘內至 20% A、80% B，保持在 20% A 及 80% B 6 分鐘，

以起始條件再平衡 3 分鐘。使用注射體積為 20 微升。錐口電壓(cone voltage)用於正離子化模式為 20 V，而用於負離子化模式為 20 V。使用 0.08 秒之內掃描延遲(interscan delay)，經由在 0.8 秒之 100 至 900 之掃描獲得質譜。

方法 2

除了一般程序 B 之外：逆相 HPLC 進行於 Waters Acquity BEH(橋接乙基矽氧烷/二氧化矽混合源) C18 管柱(1.7 微米，2.1 x 100 毫米)，流速 0.35 毫升/分鐘。二種移動相(移動相 A：95% 7 mM 乙酸銨/5%乙腈；移動相 B：100%乙腈)，用於進行梯度條件由 90% A 及 10% B(保持 0.5 分鐘)，在 3.5 分鐘內至 8% A、92% B，保持 2 分鐘，並在 0.5 分鐘內回到起始條件，保持 1.5 分鐘。使用注射體積為 2 微升。錐口電壓用於正及負離子化模式為 20 V。使用 0.1 秒之內掃描延遲，經由在 0.2 秒之 100 至 1000 之掃描獲得質譜。

方法 3

除了一般程序 C 之外：逆相 HPLC 進行於 YMC-Pack ODS-AQ, 50x2.0 毫米 5 微米管柱，流速 0.8 毫升/分鐘。使用二種移動相(移動相 A：具有 0.1%TFA 之水；移動相 B：具有 0.05%TFA 之乙腈)。首先，90% A 及 10% B 保持 0.8 分鐘，然後施用梯度在 3.7 分鐘內至 20% A 及 80% B 並保持 3 分鐘。使用一般注射體積為 2 微升。烘箱溫度為 50°C。(MS 極性：正)。

表 2：LCMS 數據及熔點(滯留時間： R_t 以分鐘計)， $(MH)^+$ 尖峰，LCMS 程序表示用於 LCMS 之方法。

化合物編號	LCMS			熔點
	R_t	$(MH)^+$	程序	
1	3.39	471	2	209°C
2	3.35	401	2	
4	3.19	441	2	121°C
5	2.97	417	2	
6	7.47	415	1	
7	3.94	439	2	
8	3.45	457	2	
9	8.51	471	1	
10	3.05	457	2	
11	3.01	473	3	221.0-222.5°C
12	3.07	443	2	
13	3.00	443	2	
14	3.49	425	2	
15	8.22	443	1	
16	3.34	457	2	
17	3.32	457	2	
18	8.68	457	1	

化合物編號	LCMS			熔點
20	8.62	457	1	
21	8.2	443	1	
22	8.95	415	1	
23	2.93	443	3	
24				110.5-111.6°C
25				111.4-113.3°C
26				122.3-124°C
27				121.4-122.6°C
28				98.3-100°C
29				96.8-99°C
30				111.5-112.3°C
31				112.7-113.6°C

旋光度

使用偏極計量測旋光度， $[\alpha]_D^{20}$ 指出以鈉之D-線波長(589奈米)之光，於溫度20°C量測旋光度，晶格光徑為1分米(dm)。實際值之後，述及濃度及用於量測旋光度溶液之溶劑。

表3：旋光度

化合物編號	$[\alpha]_D^{20}$	濃度	溶劑
18	-37.4°	0.516 w/v%	DMF
20	+36.87°	0.575 w/v%	DMF

化合物編號	$[\alpha]_D^{20}$	濃度	溶劑
21	-39.68°	0.378 w/v%	DMF
24	+5.03°	10.30毫克/毫升	MeOH
25	-3.44°	10.70毫克/毫升	MeOH
26	-13.74	8.59毫克/毫升	氯仿
27	+11.89	9.00毫克/毫升	氯仿
30	-5.25	4.00毫克/毫升	MeOH
31	+7.99	4.00毫克/毫升	MeOH
28	-4.90	10.00毫克/毫升	MeOH
29	+5.69	9.89毫克/毫升	MeOH

C. 藥理實施例：

本化合物保存 p53 於 A2780 細胞之能力以 p53 酵素連結免疫吸附分析量測。p53 分析為一種應用二種多株抗體之“三明治式”酵素免疫分析。多株抗體，對於 p53 蛋白質特異性，已被免疫固定於塑膠小孔之表面，存在於欲分析之樣本的任何 p53 將結合至捕捉抗體。生物素標記偵測劑多株抗體亦認識 p53 蛋白質，並將結合至任何已被捕捉抗體保留之 p53。之後，偵測抗體經由經辣根過氧化酶結合之鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)結合。辣根過氧化酶催化顯色基質 o-二胺苯之轉變，其之強度與結合至板上之 p53 蛋白質的量成比例。呈色反應產物使用分光光度計定量。使用已知濃度的純化重組 HIS

標示 p53 蛋白質，經由標準曲線之濃度達成定量(詳見實施例 C.1.)。

C.1. p53 ELISA

A2780 細胞 (ATCC) 以補充 10% 胎牛血清 (FCS)、2 mM L-麩醯胺及健他黴素(gentamycin)之 RPMI 1640，培養於 37°C、濕潤、備有 5% CO₂之培養箱中。

A2780細胞以每孔 20,000個細胞接種於 96孔盤中，培養 24小時，並以化合物在 37°C、於濕潤培養箱中處理 16小時。培養後，細胞以磷酸鹽緩衝食鹽水洗滌一次，並於每孔添加 30微升之低鹽 RIPA緩衝液 (20 mM tris, pH7.0, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P40, 0.5% DOC, 0.05% SDS, 1mM PMSF, 1微克/毫升抑肽酶 (aprotinin) 及 0.5μ/微升亮肽素 (leupeptin)。將培養盤置於冰上 30分鐘，以完全分解。使用下述之三明治 ELISA 檢測溶解產物中之 p53 蛋白質。

高結合聚苯乙烯 EIA/RIA 96孔盤 (Costar 9018) 以濃度為含 1微克/毫升之塗覆緩衝液 (0.1M NaHCO₃ pH8.2) 的捕捉抗體 pAb1801 (Abcam ab28-100) 塗覆每孔 50微升。使抗體於 4°C 黏附隔夜。經塗覆之盤以磷酸鹽緩衝食鹽水 (PBS)/0.05% Tween 20 清洗，並添加 300微升之阻斷緩衝液 (PBS, 1%牛血清白蛋白 (BSA))，於室溫培養 2小時。在阻斷緩衝液中稀釋純化重組 HIS 標示 p53 蛋白質，範圍為 3-200 奈克/毫升，並作為標準液。

盤以 PBS/0.05% Tween 20 清洗二次，並以 80 微升/每孔添加阻斷緩衝液或標準液。在標準液中，添加 20 微升溶解緩衝液。以 20 微升溶解產物/每孔，添加樣本至其他孔中。於 4°C 隔夜培養後，將盤以 PBS/0.05% Tween 20 清洗二次。整倍數之 100 微升第二多株抗體 p53 (FL-393) (Tebubio, sc-6243)，以含 1 微克/微升之阻斷緩衝液的濃度添加至各孔中，並使其於室溫粘附 2 小時。將盤以 PBS/0.05% Tween 20 清洗三次。偵測抗體抗兔 HRP(sc-2004, Tebubio)，其以含 0.04 微克/毫升之 PBS/1% BSA 濃度添加，並於室溫培養 1 小時。盤以 PBS /0.05% Tween 20 清洗三次，並添加 100 微升之基質緩衝液(基質緩衝液子使用前立即製備，其經由添加 1 錠 10 毫克 o-二胺苯(OPD, Sigma)及 125 微升 3% H₂O₂ 至 25 毫升 OPD 緩衝液：35 mM 檸檬酸、66 mM Na₂HPO₄，pH5.6)。5 至 10 分鐘之後，經由每孔添加 50 微升終止緩衝液(1M H₂SO₄)停止呈色反應。使用 Biorad 微盤讀取機量測在雙波長 490/655 奈米之吸光度，然後分析結果。

對於每一實驗，對照組(不包含藥劑)及空白培養組(不包含細胞或藥劑)平行進行。所有對照組及樣本之值減去空白值。對於各樣本，p53 之值(以吸光度單位)表示為存在於對照組之 p53 之值的百分比。百分比維持高於 140%被定義為顯著。本文中測試化合物之效果表示為最低劑量給予存在於對照組之 p53 之值的至少 140%(LAD)(詳見表 4)。

在一些實驗中，分析適於並用於 384-孔培養盤。

表 4：測試於上述 p53 ELISA 規則 (A2780 細胞) 之化合物的結果

化合物編號	p53-elisa LAD [microM]
6	1.0
17	0.10
12	0.10
13	1.00
19	0.10
2	0.10
5	0.10
22	3.00
15	0.10
20	0.03
18	0.03
21	1.0
9	1.0
11	0.30
14	1.0
4	0.10

化合物編號	p53-elisa LAD [microM]
10	1.0
7	0.30
8	0.10
16	0.30
23	3.00
1	0.10
27	0.10
24	0.03
25	0.10
31	0.10
26	0.10
30	0.10
29	0.03
28	0.10

C.2 增殖分析

人類 A2780 卵巢癌細胞係來自 Dr. T.C. Hamilton (Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, U.S.A.)之令人感激的禮物。細胞培養於補充 2 mM L-麩醯胺、50 微升/毫升健他黴素及 10%胎牛血清

之 RPMI 1640 培養基。

使用於阿爾瑪藍分析(Alamar Blue assay)之試劑

刃天青(resazurin)購自 Aldrich(Prod. No. 199303)。氰亞鐵酸鉀、鐵氰化鉀、 KH_2PO_4 及 K_2HPO_4 購自 Sigma (各為 Prod. Nos. P9387、P8131、P5655 及 P8281)。

磷酸鉀緩衝液 0.1M(PPB)如下製備：將 2.72 克 KH_2PO_4 及 13.86 克 K_2HPO_4 溶於 500 毫升 milli-Q H_2O ，pH 調整至 pH 7.4，且體積以 milli-Q H_2O 帶至 1 公升；緩衝液過濾消毒，並儲存於室溫。刃天青儲備液(PPB-A)經由溶解 45 毫克刃天青於 15 毫升 PBS 中新鮮製備。30 mM 鐵氰化鉀(PPB-B)經由溶解 0.987 克鐵氰化鉀於 100 毫升 PPB 中而製備。30 mM 氰亞鐵酸鉀(PPB-C)經由溶解 1.266 克氰亞鐵酸鉀於 100 毫升 PPB 而製備。

PPB-A、PPB-B 及 PPB-C 之混合物經由混合等量之各溶液而製備。刃天青工作溶液(本文稱為“阿爾瑪藍(Alamar Blue)”溶液)經由稀釋該混合物 $20\times(\text{vol/vol})$ 於 PPB 中並過濾消毒而製備；阿爾瑪藍溶液可保持於 4°C 最長 2 週。

阿爾瑪藍分析之程序

關於實驗於 384 孔盤，細胞以 5×10^3 細胞/毫升之密度接種於具 45 微升培養基之 Falcon 384 孔培養盤(Life Technologies, Merelbeke, Belgium)，黑色具透明底部。使細胞黏附於塑膠 24 小時，預先稀

釋測試化合物(1/50 於培養基)，並添加 5 微升預先稀釋之化合物至小孔中。之後培養 4 日，添加 10 微升阿爾瑪藍溶液至各小孔，且細胞於 37°C 進一步培養 5 小時(A2780)。以螢光盤讀取機(Fluorskan, Labsystems, 540 奈米激發及 590 奈米放射)量測每一小孔之螢光強度。

抗增殖活性計算為在治療相對對照(未治療細胞)條件中，仍發育細胞之百分比。在實驗中，每一實驗條件之結果為 3 個平行實驗小孔之平均。當適當時，重複實驗以建立完全的濃度-反應曲線。當適當時，使用用於等級資料之機率單位分析(probit analysis)(Finney, D.J., Probit Analyses, 2nd Ed. Chapter 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962)，估算 IC₅₀-值(降低細胞生長至對照組之 50%所需的藥劑之濃度)。本文中，測試化合物之效果表示為 pIC₅₀(IC₅₀-值(M)之負數對數值)(詳見表 5A)。

表 5A：測試於上述細胞增殖規則之化合物的結果(A2780 細胞)

化合物編號	A2780 細胞增殖抑制 pIC ₅₀
6	6.67
17	7.40
12	7.20
13	6.90

化合物編號	A2780 細胞增殖抑制 pIC ₅₀
19	7.34
2	7.38
5	7.28
22	6.26
15	7.27
20	7.29
18	7.47
21	6.85
9	6.85
11	6.55
14	6.43
4	6.74
10	6.70
7	6.96
8	7.06
16	6.87
23	6.52
1	6.94
27	6.85
24	7.18

化合物編號	A2780 細胞增殖抑制 pIC_{50}
31	6.84
26	7.11
30	7.04
29	7.14
28	6.89

化合物亦根據上述規則測試，但使用其他細胞株：結腸直腸癌細胞株 HCT116、非小細胞肺癌細胞株 H1299、人類前列腺癌細胞株 DU145。結果報導於表 5B。

表 5B

化合物 編號	HCT116 細胞增 殖抑制 pIC_{50}	H1299 細胞增殖 抑制 pIC_{50}	DU145 細胞增殖 抑制 pIC_{50}
6	5.39	5.03	
17	7.05	6.18	6.17
12	6.06	5.2	
13	5.61	<5	
19		5.46	5.74
2		5.94	6.16
5	6.46	5.23	5.56
22		5.09	5.07
15	6.69	5.82	

化合物 編號	HCT116 細胞增 殖抑制 pIC_{50}	H1299 細胞增殖 抑制 pIC_{50}	DU145 細胞增殖 抑制 pIC_{50}
20		5.72	5.73
18	7.27	6.38	6.40
21	6.83	6.12	5.22
9	6.02	5.17	5.26
11	6.67	5.81	6.21
14	<5	5.40	5.14
4	6.00	5.43	5.29
10	6.47	5.68	5.65
7	7.00	6.39	6.60
8	7.06		
16	6.68	6.73	5.98
23	5.53	5.61	5
1	6.82	6.06	5.92
27	7.08	5.99	6.00
24	7.42	6.63	6.53
31	6.94	5.84	6.04
26	7.26	6.27	6.18
30	7.19	6.02	6.14
29	7.37	6.67	6.58

化合物 編號	HCT116 細胞增 殖抑制 pIC ₅₀	H1299 細胞增殖 抑制 pIC ₅₀	DU145 細胞增殖 抑制 pIC ₅₀
28	7.11	6.73	6.52

C.3.P450 分析

CYP P450(E.coli 表現)蛋白質(3A4、2D6、2C9、1A2 & 2C19)轉變其特異性基質成為螢光分子^{1 2}。使用螢光盤讀取機量測螢光分子，化合物抑制酵素反應將造成螢光信號之降低。

經個別的 cDNA 表現細胞色素 P450 同功酶調控之轉變

基質	酶	螢光分子
CEC	CYP1A2	CHC
MFC	CYP2C9	7-HFC
CEC	CYP2C19	CHC
AMMC	CYP2D6	AHMC
BFC	CYP3A4	7-HFC
DBF	CYP3A4	螢光素
7-BQ	CYP3A4	喹啉酚

縮寫：

CEC：7-乙氧基-3-氰基香豆素(coumarin)；CHC：3-氰基-7-羥基香豆素，

MFC：7-甲氧基-4-三氟甲基香豆素；7-HFC：7-羥基-三氟甲基香豆素，

CEC：7-乙氧基-3-氰基香豆素；CHC：3-氰基-7-羥基香豆素，

AMMC：3-[2-(N,N-二乙基-N-甲基胺基)乙基]-7-甲

氧基-4-甲基香豆素；

AHMC: 3-[2-(N,N-二乙基胺基)乙基]-7-羥基-4-甲基香豆素鹽酸鹽，

BFC: 7-苯甲基氧基-三氟甲基香豆素；

DBF: 二苯甲基螢光素, 7-BQ: 苯甲基氧基喹啉。

輔因子混合物:(對於所有 CYP 酵素,除了 CYP 2D6 之外)

	工作溶液		最終濃度
G-6-P	8.25 mM	25.10 mg	3.3 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 μ l	0.4 U/ml
0.5M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	8.25 mM	165.0 μ l	3.3 mM
NADP	3.25 mM	25.59 mg	1.3 mM
溶解於 0.1 M Na-K-磷酸鹽緩衝液		10 ml	

縮寫: G-6-P: 葡萄糖-6-磷酸鹽; G-6-P-DH: 葡萄糖-6-磷酸鹽-去氫酶。

輔因子混合物:(對於 CYP2D6)

	工作溶液		最終濃度
G-6-P	1.025 mM	3.12 mg	0.41 mM
G-6-P-DH	1 U/ml	14.29 μ l	0.4 U/ml
0.5M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.025 mM	20.5 μ l	0.41 mM
NADP	20.5 μ M	0.161 mg	8.2 μ M
溶解於 0.1 M Na-K-磷酸鹽緩衝液		10 ml	

CYP P450 酵素溶液:

<u>CYP1A2</u> :	(CEC)	最終濃度 5 pmol P450/ml
<u>CYP2C9</u> :	(MFC)	最終濃度 60 pmol P450/ml
<u>CYP2C19</u> :	(CEC)	最終濃度 2.5 pmol P450/ml
<u>CYP2D6</u> :	(AMMC)	最終濃度 42 pmol P450/ml
<u>CYP3A4</u> :	(BFC)	最終濃度 83 pmol P450/ml
	(DBF)	最終濃度 5 pmol P450/ml
	(7-BQ)	最終濃度 20 pmol P450/ml

將所有這些 CYP 酵素溶於 0.01 M Na-K-磷酸鹽緩衝液+1.15% KCl，並保持在冰上直到使用。CYP P450 酵素儲存於-80°C。

化合物及參考抑制劑稀釋：

化合物及參考抑制劑被運送至部門，作為含 5 mM 之 DMSO 溶液。經由使用乙連續稀釋製作 $5 \cdot 10^{-4}$ M 之工作溶液，最終化合物濃度為 10^{-5} M 用於初級篩選，且最終溶劑濃度為 2%。在濃度 10^{-5} M 初級篩選後，被選擇之有效抑制劑之 IC_{50} 值於 $3 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-5} M 之濃度範圍測試。在初級篩選中，所有化合物測試三次。

參考抑制劑於 10^{-9} - 10^{-4} M 之濃度範圍測試。

參考抑制劑

夫拉茶鹼 (Furafylline)	(超細化學物質)	用於 CYP1A2
磺胺苯唑 (Sulfaphenazole)	內部	用於 CYP2C9
反苯環丙胺 (Tranylcypromine)	內部	用於 CYP2C19
奎尼丁 (Quinidine)	內部	用於 CYP2D6
酮康唑 (Ketoconazole)	內部	用於 CYP3A4

受質溶液：

CEC (CYP1A2 受質)	6.25 μ l 20 mM CEC 溶液/5ml 總體積	5 μ M
MFC (CYP2C9 受質)	200 μ l 25mM MFC 溶液/5ml 總體積	200 μ M
CEC (CYP2C19 受質)	31.25 μ l 20mM CEC 溶液/5ml 總體積	25 μ M
AMMC(CYP2D6 受質)	150 μ l 0.5 mM AMMC 溶液/5ml 總體積	3 μ M
BFC (CYP3A4 受質)	750 μ l 5 mM BFC 溶液/5ml 總體積	150 μ M
DBF (CYP3A4 受質)	12.5 μ l 2 mM DBF 溶液/5ml 總體積	1 μ M
7-BQ (CYP3A4 受質)	60 μ l 25 mM 7-BQ 溶液/5ml 總體積	60 μ M

將受質儲備液溶於乙腈，並儲存於-20°C，將最終工作溶液溶於 0.1 M Na-K-磷酸緩衝液 pH 7.4，且此溶液總是在開始分析前新鮮製備。

資料分析

盤之製備、資料連結、資料分析、結果確認及認可與資料上載以 Lexis-Laplace 軟體 (Laplace-DLM-RVAM) 半自動執行。

計算所使用之方程式為：

$$\% \text{活性} = (100 / (\text{陽性對照平均} - \text{陰性對照平均})) \times (\text{樣本平均} - \text{陰性對照平均})$$

$$\% \text{抑制} = 100 - \% \text{活性}$$

當計算時，經由在 RVAM 之圖解外推法 (graphical extrapolation)，基於與 50% 對照軸相交，自動產生 IC₅₀ 值。

方法

分析進行於黑色 96 孔 Costar 盤，每孔分析包含：40 微升 CYP P450 酵素溶液(於陰性對照樣本 40 微升之 0.1M Na-K-磷酸緩衝液 pH 7.4，無酵素添加)；40 微升輔因子混合；2 微升化合物或參考抑制劑用於陰性對照樣本或溶劑用於陽性對照樣本。於 37°C 在震盪培養箱中預培養 5 分鐘後，添加 20 微升受質溶液。將盤於 37°C 培養 10 分鐘 (CYP3A4/DBF)、15 分鐘 (CYP1A2)、30 分鐘 (CYP2C9、CYP3A4/BFC 及 CYP3A4/7-BQ & CYP2C19) 及 45 分鐘 (CYP2D6)。反應經由添加 200 微升乙腈而終止。對於 CYP3A4/DBF，反應經由添加 200 微升 2M NaOH 而終止。對於 CYP3A4/7-BQ，反應經由添加 40 微升 Tris/乙腈 (1:5) (V:V，之後於 2000 rpm 離心 10 分鐘)。經由螢光 Victor2 (Wallac)

或 Fluoroskan(Labsystems)讀取機偵測螢光信號。不同酵素及其特異性基質之激發及放射波長敘述於表 6。

表 6：激發及放射波長

酵素	受質	激發波長	放射波長
CYP1A2	CEC	410 奈米	460 奈米
CYP3A4	BFC	405 奈米	535 奈米
CYP3A4	DBF	485 奈米	538 奈米
CYP3A4	7-BQ	405 奈米	535 奈米
CYP2C9	MFC	405 奈米	535 奈米
CYP2C19	CEC	410 奈米	460 奈米
CYP2D6	AMMC	390 奈米	460 奈米

參考資料

[1] Microtiter Plate Assays for Inhibition of human, Drug-Metabolizing Cytochromes P450

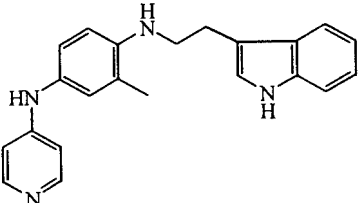
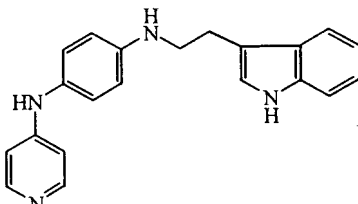
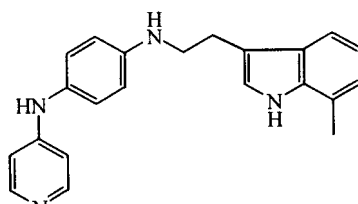
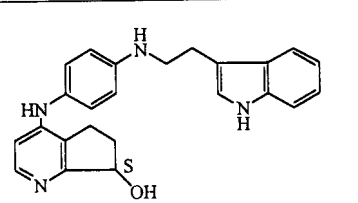
Charles L. Crespi, Vaughn P. Miller, Bruce W. Penman(Gentest)
Analytical Biochemistry 248, 188-190(1997) Article n°
AB972145

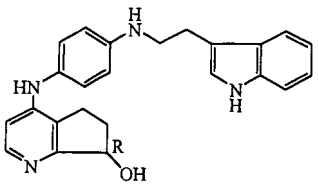
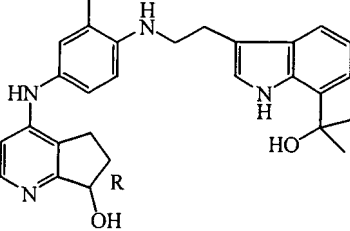
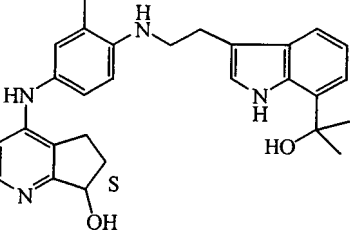
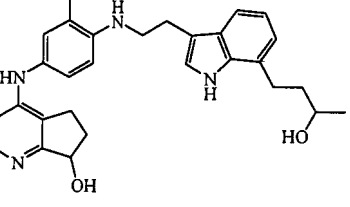
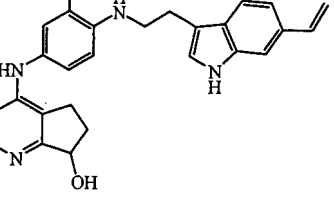
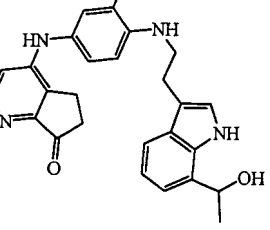
[2] Novel High Throughput fluorescent P450 assays

V.P. Miller, J. Ackermann, D.M. Stresser, C.L. Crespi
Gentest Internet site.

表 7 提供當與先前技術之化合物比較時，測試於 7 個試驗之本發明化合物(化合物編號 18、20、9、14 及 4)的數據。如上所述，測試五種 P450 酵素，其中之一在三種不同基質上(因此總計 7 個試驗)。在表 7 中指出在多少 P450 試驗中，化合物顯示具有 $IC_{50} < 1.00E-06$ 之抑制活性。

表 7：CYP 抑制上之比較資料

化合物	P450 影響 IC_{50}
 EP1809622 之化合物 47	7 次 $<1.00E-06$
 EP1809622 之化合物 36	3 次 $<1.00E-06$
 EP1809622 之化合物 197	7 次 $<1.00E-06$
 EP1809622 之化合物 195	0 次 $<1.00E-06$

化合物	P450 影響 IC ₅₀
 EP1809622 之化合物 229	0 次 <1.00E-06
 化合物編號 20	0 次 <1.00E-06
 化合物編號 18	0 次 <1.00E-06
 化合物編號 9	0 次 <1.00E-06
 化合物編號 14	1 次 <1.00E-06
 化合物編號 4	0 次 <1.00E-06

C.4. Ro-4-1284 在小鼠之拮抗作用^{3,4,5}

試驗係修改 Colpaert et al.(1975)³ 所述之程序，雄性 NMRI 小鼠(22±3 克)圈養於 macrolon 觀察籠(L x W x H：11x12x17 公分；n=每籠 3 隻)。在開始實驗時，緊接投與測試化合物之前，以經由插入電子溫度計(Comark)之熱感應探針(直徑 1.0 毫米)至食道 3 公分之固定深度，直到獲得穩定之讀數，量測小鼠之起始體溫至精確度 0.1°C。以刻度顯微鏡量測右眼瞳孔直徑，並以 1/24 毫米單位表示。投與測試化合物 15 分鐘後，以 Ro-4-1284(10 毫克/公斤，s.c.)考驗小鼠，Ro-4-1284 為一種類蛇根鹼(reserpine-like)囊泡膜上轉運(vesicular monoamine transport；VMAT-2)抑制劑，其快速地耗盡分泌囊泡。^{3, 4} 在考驗 15、30 及 60 分鐘後，將小鼠之眼瞼張開(0、1、2、3、4、5)及移動活動力(-1、0、1、2、3)記分。於 60 分鐘之間隔，緊接在記分明顯的行為後，再次量測右眼瞳孔直徑及食道溫度。紀錄反常現象，例如密集吸氣、咀嚼、豎直、充血、豎毛、流涎、顫抖、抽搐及死亡(當發生在 Ro-4-1284 投與之前時，亦紀錄後面現象)。對於藥物引發效果之判定標準：反覆眼瞼下垂：眼瞼張開積分>1 在 15、30 或 60 分鐘(各為 2.7、0.5 及 0%偽陽性對照；n > 350)；誘發虛脫：積分-1 於運動 15、30 或 60 分鐘(未見於對照組)；反覆運動減弱：積分>0 於運動 15、30 及 60 分鐘(各為 2.2、0.8 及 0%偽陽性對照)；反覆瞳孔縮小：瞳孔直徑>5 單位，於 60 分鐘

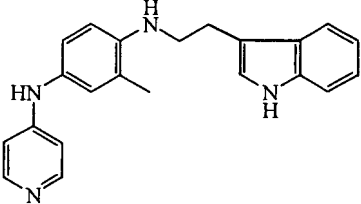
(0.8%偽陽性)；加強低體溫效力：溫度降低(超過小時時間間隔) $>9.0^{\circ}\text{C}$ (1.4%偽陽性)；反覆體溫降低：溫度降低 $<3.0^{\circ}\text{C}$ (1.8%偽陽性)。

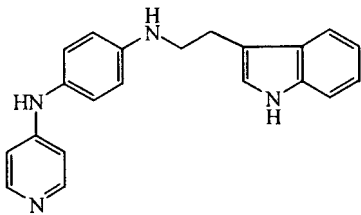
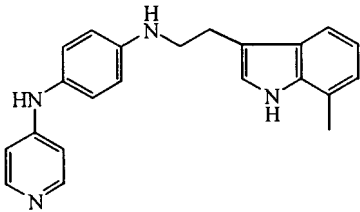
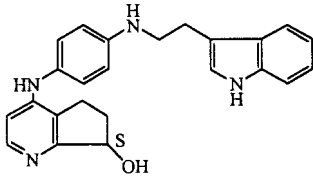
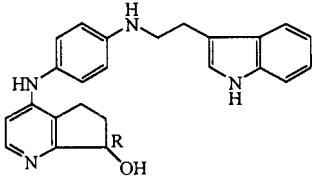
根據標準程序，R0-4-1284 依皮下注射或口服投與 15 分鐘，並開始觀察 15 分鐘。劑量開始給予 3 隻動物，當 3 隻動物中至少 2 隻對於至少一種觀察顯示活性，則化合物被認為是有效的。在其他情況，化合物在特定時間-路徑-劑量攝生法被認為是無效的，並歸類為完成。

化合物編號 20、18、1、27、24、25、31、30、7、29、28、26 及 17 依口服投與濃度 80 毫克/公斤各測試於 3 隻動物，且其並未顯示在反覆瞳孔縮小、反覆眼瞼下垂、反覆體溫降低上之活性。化合物 4 僅測試 40 毫克/公斤，且並未顯示在反覆瞳孔縮小、反覆眼瞼下垂、反覆體溫降低上之活性。

EP 1809622 之化合物亦於相同試驗中測試，且結果顯示於下表 8。

表 8：比較數據

化合物	藥劑誘導神經學副作用
 EP1809622 之化合物 47	是

化合物	藥劑誘導神經學副作用
 EP1809622 之化合物 36	是
 EP1809622 之化合物 197	是
 EP1809622 之化合物 195	是
 EP1809622 之化合物 229	是

參考資料

- [3] Colpaert, F.C., Lenaerts, F.M., Niemegeers, C.J.E., Janssen, P.A.J. : "A critical study on Ro-4-1284 antagonism in mice.", Arch. Int. Pharmacodyn. 215 40-90(1975).
- [4] Colzi, A., D'Agostini, R., Cesura, A.M., Borroni, E., Da Prada, M. : "Monoamine oxidase-A inhibitors and dopamine metabolism in rat caudatus : evidence that an increased cytosolic level of dopamine displaces reversible monoamine

oxidase-A inhibitors in vivo.", J. Pharmacol. Exp. Ther. 265 103-111(1993).

[5] Filinger, E.J.: "Effect of a reserpine-like agent on the release and metabolism of [^3H]NA in cell bodies and terminals.", Gen. Pharmacol. 25 1039-1043(1994).

C.5膜片鉗制試驗(patch-clamp test)-在HEK293細胞之經HERG調控K⁺電流之抑制

使用穩定表現HERG鉀通道之HEK293細胞進行實施例，細胞於37°C及5% CO₂之培養瓶中，生長於補充10%熱去活化胎牛血清、1% L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素-溶液、1%非必要胺基酸(100x)、1%丙酮酸鈉(100 mM)及0.8%遺傳黴素(Geneticin)(50毫克/毫升)之MEM培養基。使用前，將細胞再次培養於不含5毫升L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素之MEM培養基。用於自動化膜片鉗制系統PatchXpress 7000A(Axon Instruments)，將細胞收取以獲得單一細胞之細胞懸浮液。

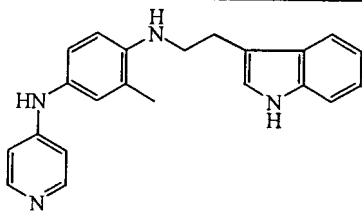
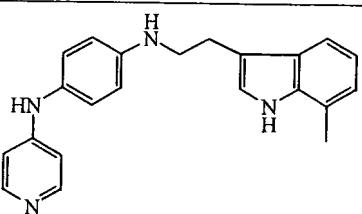
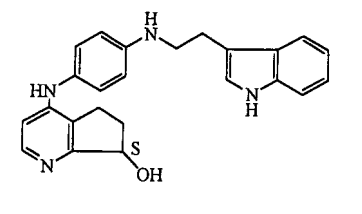
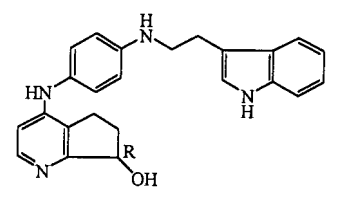
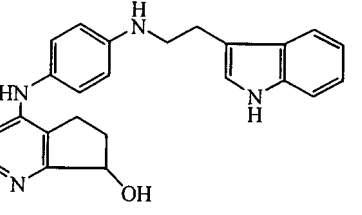
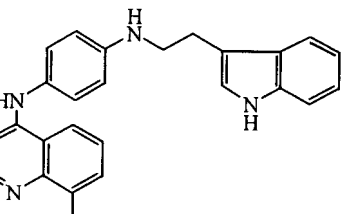
細胞外溶液包含(mM)：150 NaCl、4 KCl、1 MgCl₂、1.8 CaCl₂、10 HEPES、5 葡萄糖(pH 7.4以NaOH調整)。吸量管溶液包含(mM)：120 KCl、10 HEPES、5 EGTA、4 ATP-Mg₂、2 MgCl₂、0.5 CaCl₂(pH 7.2以KOH調整)。

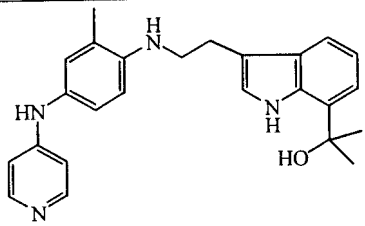
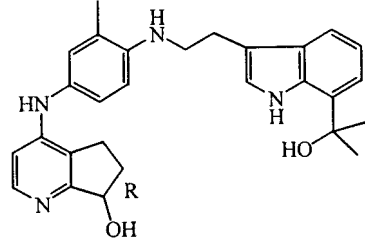
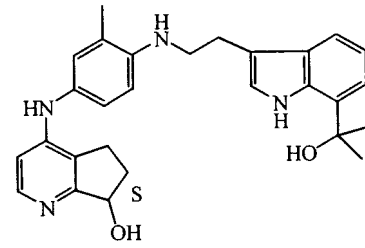
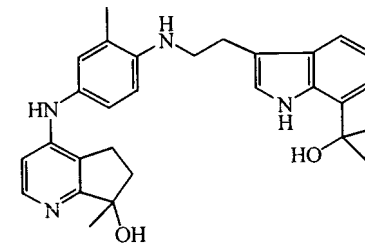
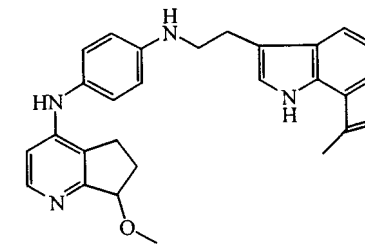
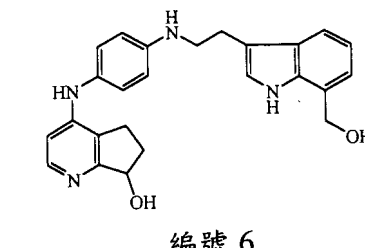
膜片鉗制實驗在電壓-鉗模式進行，且全細胞電流以利用PatchXpress 7000A系統(Axon Instruments)

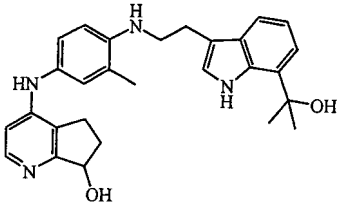
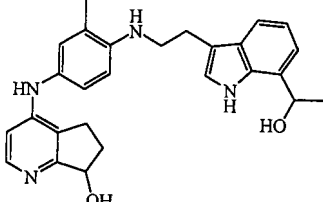
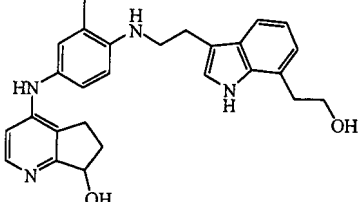
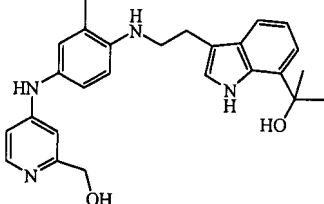
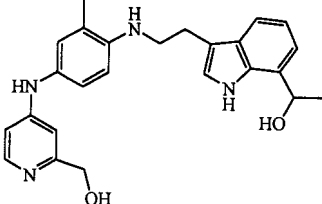
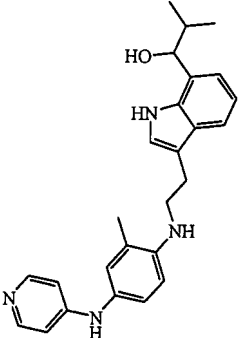
之自動化膜片鉗制分析記錄。經由Multiclamp放大器放大及數位化電流信號，經由PatchXpress、DataXpress軟體及Igor 5.0(Wavemetrics)儲存及分析。

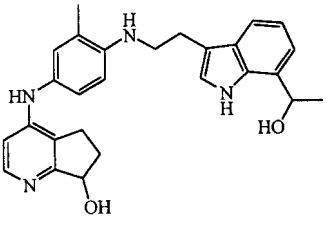
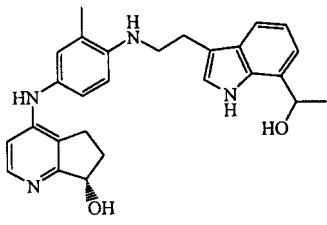
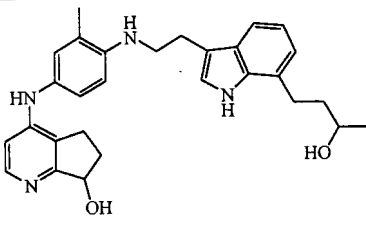
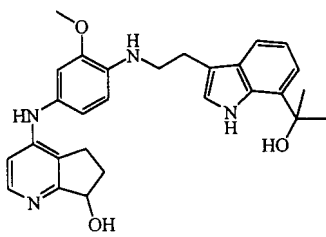
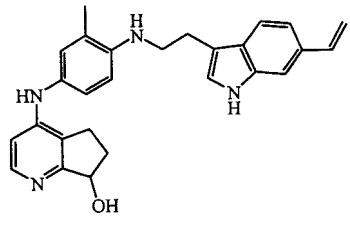
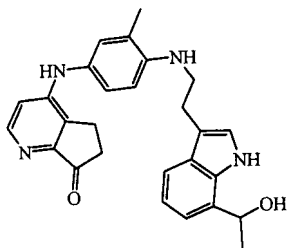
鉗制電位(holding potential)為-80 mV，在2秒去極化至+60 mV後，確定HERG電流(K⁺-選擇性流出電流)為最大尾電流於-40 mV。脈動循環率為15秒。在各試驗脈動前，獲得由鉗制電位至-60 mV之短暫脈動(0.5秒)，以確定(線性)漏流(leak current)。在建立全細胞組態及穩定期後，施用媒劑5分鐘，之後經由 10^{-7} M、 3×10^{-7} M及 3×10^{-6} M之漸增濃度施用測試物質。各測試物質之濃度施用二次，各濃度之效果以5分鐘後3個連續電壓脈動之平均電流確定。為了確定阻斷的程度，將殘餘電流與預測試之媒劑相比較。數據(表9)以相較於對照組(對照組為100%)之百分比抑制的平均值(如果可得，±平均值之標準差(SEM))呈現。

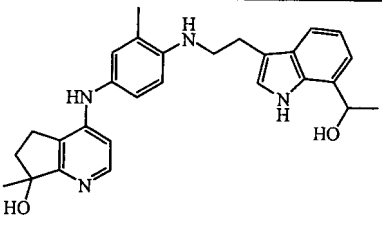
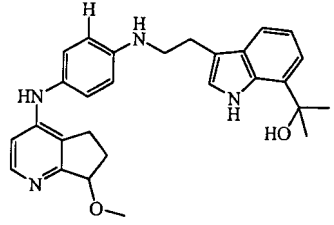
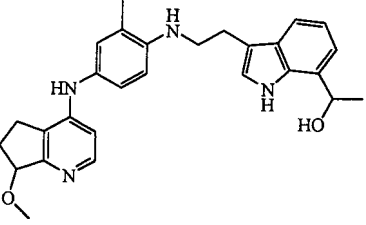
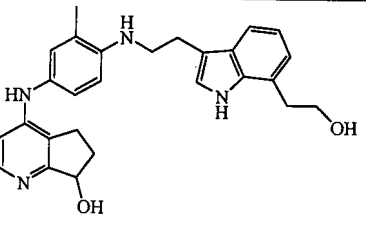
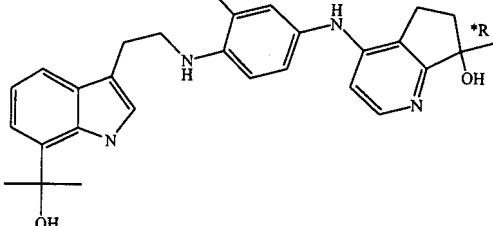
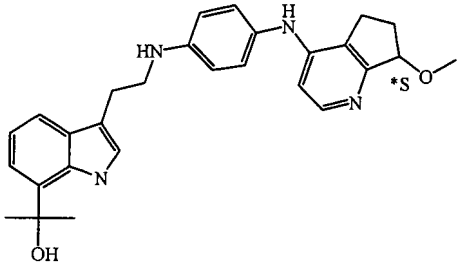
表9：於HEK293細胞之經HERG調控K⁺電流之抑制

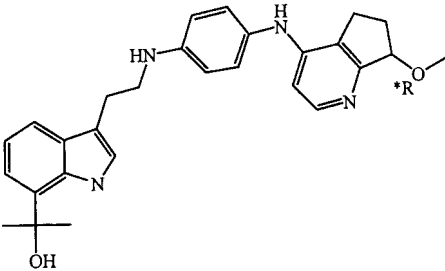
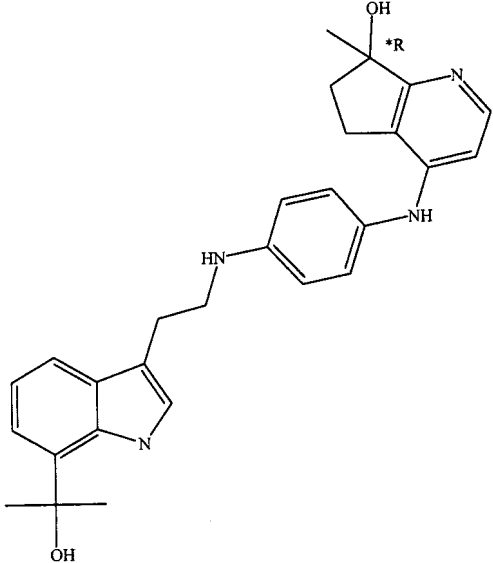
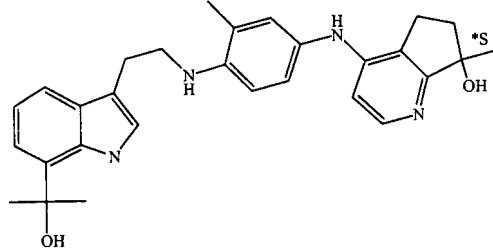
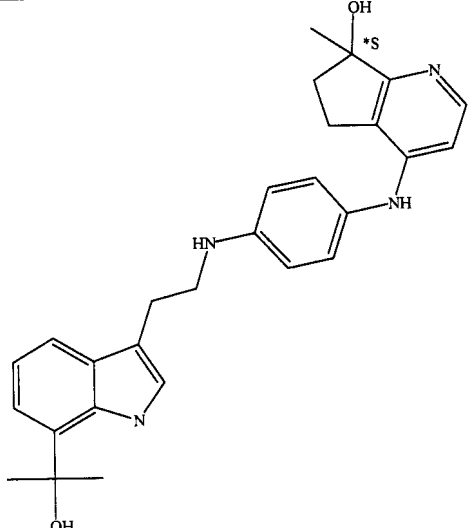
化合物	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 EP1809622 之化合物 47	76	58	13
 EP1809622 之化合物 187	68	36	5
 EP1809622 之化合物 195	80	65	19
 EP1809622 之化合物 229	81	63	18
 EP1809622 之化合物 110	86	66	22
 EP1809622 之化合物 21	35	8	0
EP1809622 之化合物 112	74	45.7	5.7

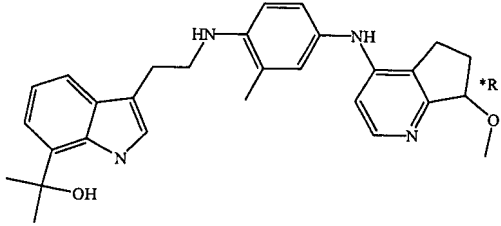
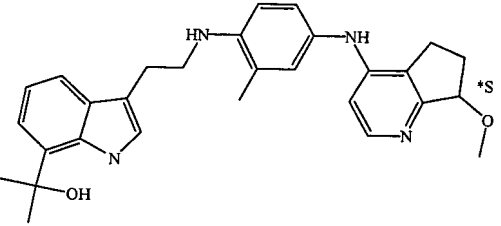
化合物	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 化合物編號 2	89	75	18
 化合物編號 20	88	76	26
 化合物編號 18	90	82	41
 化合物編號 1(n=4)	86 ± 2.5	82 ± 1.1	69 ± 5.1
 化合物編號 7(n=3)	86 ± 2.9	53 ± 6.8	2 ± 0.3
 編號 6	89	87	69

化合物	1.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁶ M
 編號 17	84	70	21
 編號 12	87	78	58
 編號 13	91	85	75
 編號 19	89	72	26
 編號 5	89	74	33
 編號 22	76	49	9

化合物	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 編號 15	93	88	66
 編號 21	91	86	65
 編號 9	87	72	47
 編號 11(n=3)	90 ± 8.7	80 ± 7.2	43 ± 3.3
 編號 14	84	57	10
 編號 4(n=3)	89 ± 4.2	85 ± 1.7	66 ± 3.3

化合物	1.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁶ M
 編號 10(n=3)	82 ± 2.1	72 ± 2.6	62 ± 1.8
 編號 8(n=3)	93 ± 7.3	83 ± 6.4	25 ± 5.4
 編號 16(n=3)	89 ± 6.0	74 ± 7.9	34 ± 4.4
 編號 23(n=3)	92 ± 1.0	87 ± 2.0	72 ± 0.4
 編號 27(n=3)	90 ± 1.8	75 ± 3.3	53 ± 8.1
 編號 24(n=3)	88 ± 3.2	77 ± 4.2	29 ± 2.9

化合物	1.10^{-7} M	3.10^{-7} M	3.10^{-6} M
 編號 25(n=3)	82 ± 1.7	65 ± 2.8	27 ± 2.7
 編號 31(n=3)	91 ± 0.9	82 ± 2.3	55 ± 3.8
 編號 26(n=3)	87 ± 1.7	78 ± 1.8	51 ± 5.9
 編號 31(n=3)	98 ± 1.6	93 ± 6.3	80 ± 7.2

化合物	1.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁶ M
編號 30(n=3)			
	89 ±2.3	82 ±3.9	39 ±0.8
編號 29(n=3)			
	84 ±4.4	79 ± 8.8	60 ± 6.4
編號 28(n=4)			

令人驚訝地，本化合物顯示優異之活體外活性，其兼備對於P450酵素低親合性及無活體內藥劑誘導神經學效果及低心血管效果。

C.6. 活體內抗腫瘤效果

活體內抗腫瘤活性可如下試驗：

NCI標準參考資料：

Bissery, M-C., and Chabot, G.G. History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro. Bull. Cancer. 1991, 78 : 587-602.

動物模式：

免疫缺陷(無胸腺)小鼠 NMRI(Nu/Nu)裸鼠(20-25克，獲自Janvier, France)用於這些研究，初始體重接近23至34克。所有動物維持在SPF“完全隔離”與自由取用食物及飲水條件之下。將小鼠分組圈

養於12小時白日：黑夜循環(光照於06：00小時)、溫度於19至22°C及濕度35至40%之Techniplast第3型IVC籠中。小鼠飼養標準實驗室飼料。所有實驗依據 European Communities Council Directives(86/609/EEC)進行，且必須經由地方倫理委員會核准。為了建立腫瘤異體移植模式(腫瘤體積~200毫米³)，根據腫瘤體積，以每一測試組10至14隻小鼠隨機化小鼠。

測試系統：

人類 U87 神經膠質瘤腫瘤細胞株由 44 歲女性白種人病患取得，細胞於 37°C、濕潤氣壓(5% CO₂，95%空氣)，培養於補充 2 mM L-麩醯胺酸、2.0 mM 丙酮酸鈉、25 單位/毫升青黴素/25 微克/毫升鏈黴素及 10%胎牛血清之 DMEM 培養基中。使用下列程序，以每 T175 瓶 3×10⁶ 個細胞，每週繼代二次，將細胞維持在單層細胞培養。簡而言之，在添加胰蛋白酶-EDTA 至培養瓶之前，細胞以 PBS(不含 Mg²⁺、Ca²⁺)洗滌。細胞分離後，以添加完整培養基將胰蛋白酶-EDTA 去活化。然後將細胞懸浮液轉移至 50 毫升 Falcon 試管，並以 1200 rpm 離心 3 分鐘。吸出培養基，且細胞再懸浮於適當體積之完整培養基中。於血球計數器中計數細胞，且以 0.25%剛果藍(trypsin blue)排除法估計其發育能力。然後將適當體積之細胞懸浮液添加至含新鮮培養基之新的 T175 培養瓶或滾瓶中。為了 U87 腫瘤細胞大規模生長，在接種於小鼠前，以 0.5 至 1×10⁷ 個細胞接種於適

15%起始體重時被認為為臨床毒性，且將動物自研究中移除並予以犧牲。腫瘤生長之時間進程以中位數值表示，或標準化成為開始治療之日之起始腫瘤體積，並表示為平均值 $\pm$ 平均值之標準差(SEM)(每組 7 至 10 隻動物)。關於預先建立之腫瘤，計算各小鼠之相對腫瘤體積(被治療腫瘤體積/第 0 日之腫瘤體積)，且對於每一治療組別表示為平均值 $\pm$ SEM。最後處理之 24 小時後，將動物犧牲，切除腫瘤並秤重。經由 Wilcoxon-Mann-Whitney 分析之單邊 p -值(魏克森等級和檢定；Wilcoxon rank sum test)表示統計之顯著性，且 $p < 0.05$ 被認為為具有統計上之意義。使用 NCI 標準，根據最終相對腫瘤體積計算測試/對照(T/C)比例，T/C 比例之有效標準為 42%。

D. 組成物樣本：膜衣錠

錠劑核心之製備

將 100 克式(I)化合物、570 克乳糖及 200 克澱粉之混合物充份混合，之後以含 5 克十二基硫酸鈉及 10 克聚乙烯吡咯酮於約 200 毫升之水的溶液潤濕。將濕性粉末混合物過篩、乾燥並再次過篩，然後添加 100 克微晶纖維素及 15 克氫化蔬菜油。將整體充份混合，並壓製成錠劑，獲得 10,000 顆錠劑，各含 10 毫克之式(I)化合物。

塗覆

在含 10 克甲基纖維素之 75 毫升變性乙醇溶液中，添加含 5 克乙基纖維素之 150 毫升二氯甲烷溶

當數量之滾瓶 1 週。在此期間充填培養基二次，且最後充填日係在細胞注射之前。除了離心後之外，如上所述收集細胞，細胞再懸浮於冷的(4°C)無血清培養基中。小鼠於鼠蹊部位以總計 1×10^7 個細胞之 200 微升體積注射。

研究設計：

於第 0 日(D0)，將人類 U87 神經膠質瘤細胞直接注射於雄性 NMRI 裸鼠之鼠蹊部位(1×10^7 個細胞/200 微升/動物)。於第 8 日(D8)，當腫瘤體積已達約平均 200 毫米³，根據腫瘤體積，以每一測試組 10 至 14 隻小鼠隨機化小鼠。然後以媒劑(10% HP- β -CD)或含測試化合物之媒劑強迫投與(p.o.)體積 10 毫升/公斤體重，將小鼠每日測試一次(QD)，計 21 日。腫瘤大小及體重每週量測二次，並在治療期間，每日監視小鼠毒性之臨床症狀。毒性之臨床症狀包括(但不限於)持續食慾不振或脫水、臥姿、垂死、昏睡、體溫下降及/或用力呼吸(根據用於實驗腫瘤形成之動物福利之 UKCCCR 指南(The UKCCCR(UK Coordinating Committee on Cancer Research)(July 1997)；及 Workman, P. *et al.* UKCCCR guideline. *Br. J. Cancer.* 1998, 77: 1-10)。

資料分析：

對於每一個別動物，體重及腫瘤大小[使用通常認可的方程式：腫瘤體積(毫米³) = $(a \times b^2)/2$]；其中‘a’代表長度，而‘b’代表經測徑器量測所決定之腫瘤寬度]在研究期間每週監測 2 次。持續體重減少大於

液。然後添加 75 毫升二氯甲烷及 2.5 毫升 1,2,3-丙三醇，將 10 克聚乙二醇融化並溶解於 75 毫升二氯甲烷，將後述溶液添加至前者中，然後添加 2.5 克十八酸鎂、5 克聚乙烯吡咯酮及 30 毫升濃縮著色懸浮液，並將整體均質化。在塗覆裝置中錠劑核心以此所得之混合物塗覆。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99/03103

C07D 401/12 (2006.01)

※申請日： 99-02-02 ※IPC 分類：

C07D 401/10 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

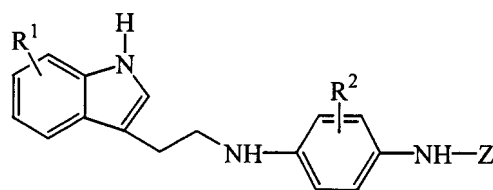
用作抗癌劑之吲哚衍生物

A61P 35/00 (2006.01)

INDOLE DERIVATIVES AS ANTICANCER AGENTS

二、中文發明摘要：

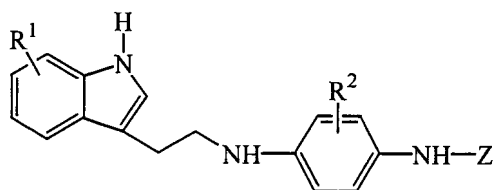
本發明提供式(I)化合物、其於治療癌症上之用途、及包含該式(I)化合物之醫藥組成物。



(I)

三、英文發明摘要：

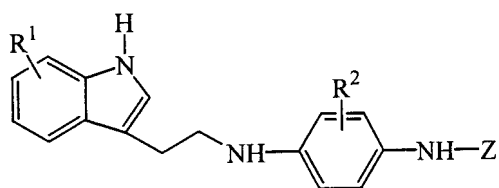
The present invention provides compounds of formula (I), their use for the treatment of cancer as well as pharmaceutical compositions comprising said compounds of formula (I).



(I)

七、申請專利範圍：

1. 一種式(I)化合物，



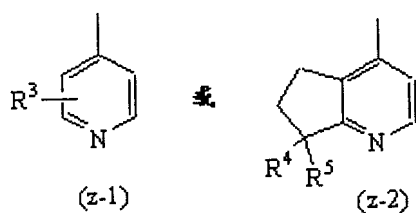
(I)

包括其任何立體化學異構型式，其中

R^1 為羥基 C_{1-6} 烷基或 C_{2-6} 烯基；前提為 R^1 取代基位於吲哚部分的位置 6 或 7；

R^2 為氫或 C_{1-4} 烷基；

Z 為選自下列之基



R^3 為氫或羥基 C_{1-4} 烷基；

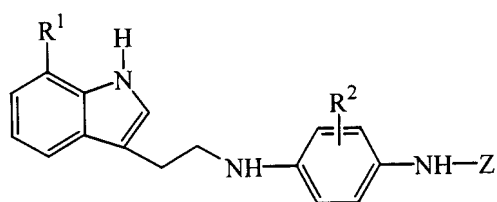
R^4 為羥基或 C_{1-4} 烷氧基；

R^5 為氫或 C_{1-4} 烷基；或

R^4 及 R^5 一起形成酮基；

其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物具有下式

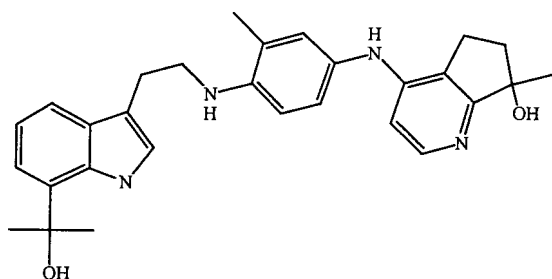


(I-a)

。



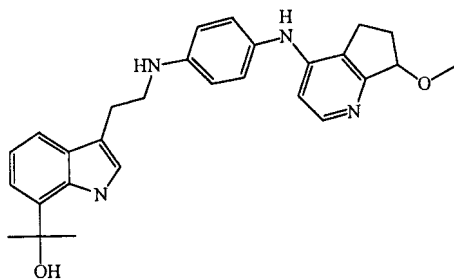
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物，其中 R^1 為羥基 C_{1-6} 烷基。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之化合物，其中 R^2 為 C_{1-4} 烷基。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之化合物，其中 Z 為式(z-1)之基。
6. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之化合物，其中 Z 為式(z-2)之基。
7. 如申請專利範圍第 6 項之化合物，其中 R^4 為羥基且 R^5 為氫。
8. 如申請專利範圍第 6 項之化合物，其中 R^4 為羥基且 R^5 為 C_{1-4} 烷基。
9. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物為具有下式之對映異構物，



且具有左旋旋光性，其以鈉(589 奈米)之 D-線波長的光，於溫度 20°C ，及晶格路徑長度 1 公寸，在濃度 8.59 毫克/毫升之氯仿中量測；或

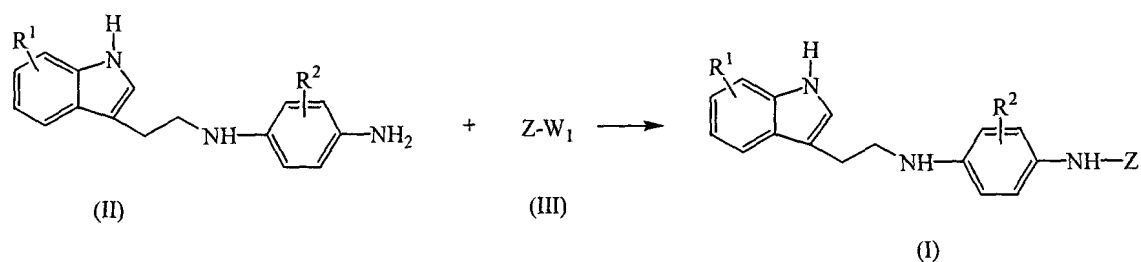
其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

10. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該化合物為具有下式之對映異構物，



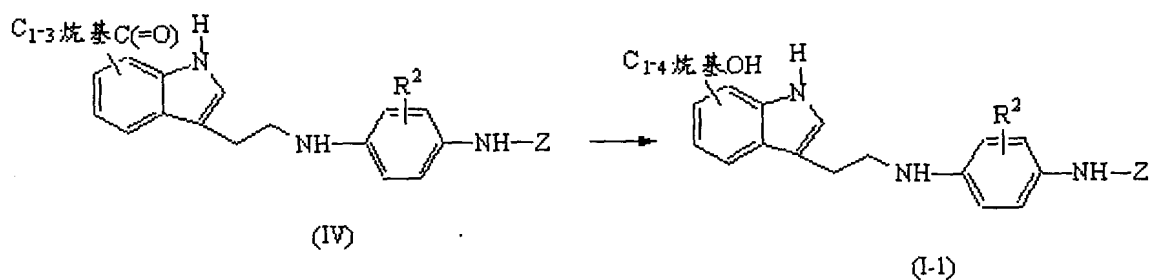
且具有右旋旋光性，其以鈉(589 奈米)之 D-線波長的光，於溫度 20°C，及晶格路徑長度 1 公寸，在濃度 10.33 毫克/毫升之甲醇中量測；或其醫藥可接受性鹽或其溶劑化物。

11. 一種使用作為藥劑之申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項之化合物。
12. 一種醫藥組成物，其包含醫藥上可接受載劑及治療上有效量之作為活性成分的申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項之化合物。
13. 一種申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項之化合物於製造治療癌症藥劑上之用途。
14. 一種一或多種抗癌劑與申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項之化合物之組合物。
15. 一種製備申請專利範圍第 1 項之化合物之方法，其特徵在於
 - a) 於任意地有鹼存在之反應-惰性溶劑中，將式(II)中間產物與式(III)中間產物反應，其中 W_1 為適當之離去基，或在適當之催化劑、適當之配位基、適當之鹼及適當的溶劑存在下，將式(II)中間產物與式(III)中間產物反應，其中 W_1 為適當之離去基，



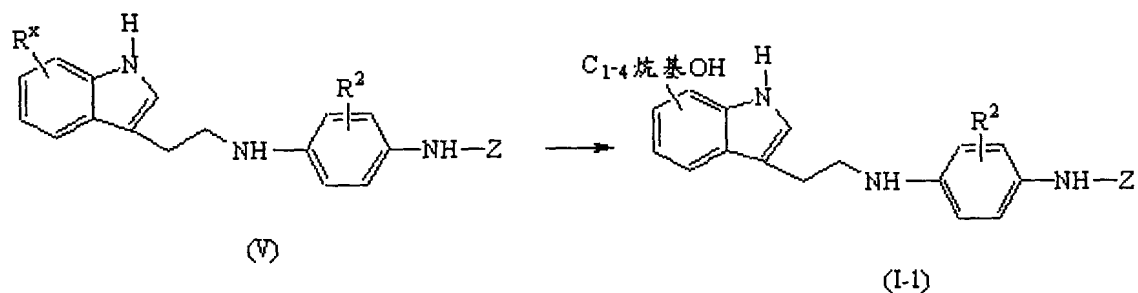
且 R^1 、 R^2 及 Z 如申請專利範圍第 1 項之定義；

b) 在適當之還原劑及適當之溶劑存在下，反應對應之式(IV)羰基衍生物，



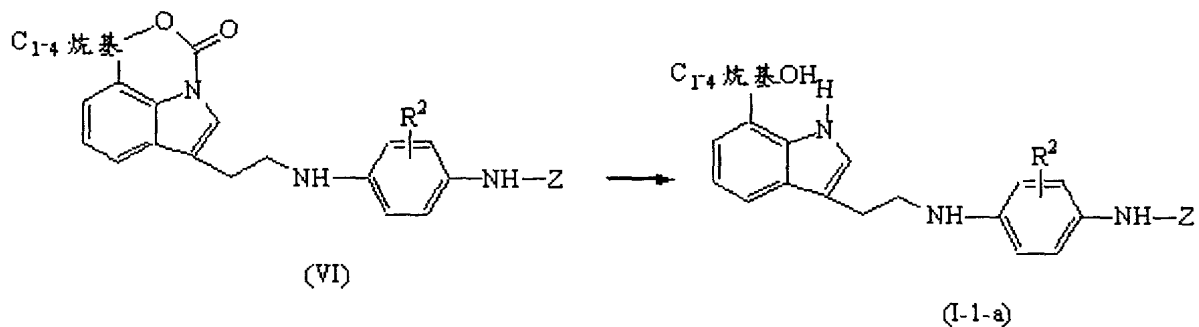
且 R^2 及 Z 如申請專利範圍第 1 項之定義；

c) 在適當之還原劑及適當之溶劑存在下，反應相對應之式(V)酯衍生物，其中 R^x 代表 $-C_{1-3}$ 烷基 $C(=O)OC_{1-4}$ 烷基，



且 R^2 及 Z 如申請專利範圍第 1 項之定義；

d) 在適當之溶劑存在下，以適當之鹼水解式(VI)中間產物，



且 R^2 及 Z 如申請專利範圍第 1 項之定義；

或如果需要，以技術中已知之轉換方法將式(I)化合物相互轉換，或如果需要，經由以酸處理將式(I)化合物轉換成治療上活性無毒性酸加成鹽，或經由以鹼處理將式(I)化合物轉換成治療上活性無毒性鹼加成鹽，或相反地，經由以鹼金屬處理將酸加成鹽形式轉換成游離鹼，或經由以酸處理將鹼加成鹽轉換成游離酸；或如果需要，製備其立體化學異構型式或溶劑化物。

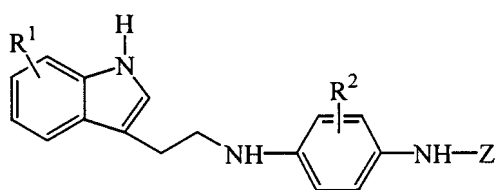
四、指定代表圖：

(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：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(I)