

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

美 國 (地區) 申請專利，申請日期： 1998.06.05. 案號： 60/088,540 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

五、發明說明()

相關申請案

本案係在專利法 35 § 119(e)下請求於 1998 年 6 月 5 日申請以“環硼酸脯胺酸化合物”為名之美國臨時申請案 60/088,540 號之優先權，該案之全文係以參考文獻方式併於本文。

發明領域

本發明係關於一種可與 CD26 結合之實質上純的環形或線形環硼酸脯胺酸化合物。本發明也係關於一種使用這類化合物來刺激具 CD26 之細胞活化和/或增生，以便使造血代細胞能移動至胰臟及周邊系統的方法。

發明背景

CD26 是一種許多細胞類表面上都有的第 II 型跨膜蛋白質，這類細胞包括淋巴細胞(Marguet, D. et al., *Advances in Neuroimmunol.* 3:209-215(1993))、造血細胞(Vivier, I. et al., *J. Immunol.* 147:447-454 (1991); Bristol, et al., *J. Immunol.* 149:367 (1992))、胸腺細胞(Dang, N.H. et al., *J. Immunol.* 147:2825-2832 (1991); Tanaka, T. et al., *J. Immunol.* 149:481-486 (1992); Darmoul, D. et al., *J. Biol. Chem.* 267:4824-4833 (1992))、小腸刷狀緣膜、內皮細胞、纖維母細胞及基質細胞。連接在細胞表面之 CD26 乃是一種涎醣蛋白質，且其大半的質量均位於細胞外。

目前被研究的最清楚的是周邊 T 細胞上的 CD26，CD26 在此細胞上係作為 T 細胞活化時一種強力的共同刺激訊號(costimulatory signal)。當 T 細胞被活化時即可增加細

五、發明說明()

胞表面上 CD26 的表現(Dong, R.P. et al., *Cell* 9:153-162 (1996); Torimoto, Y. et al., *J. Immunol.* 147:2514 (1991); Mittrucker, H-W. et al., *Eur. J. Immun.* 25:295-297 (1995); Hafler, D. A. et al., *J. Immunol.* 142:2590-2596 (1989); Dang, N.H. et al., *J. Immunol.* 144:409 (1990))。目前也已知在嚙鼠動物之造血及淋巴發育上 CD26 是一個具調節功能、非常重要的細胞表面受體(Vivier, I. et al., *J. Immunol.* 147:447-454 (1991))。CD26 的一級結構在許多物種間的相似度很高(Ogata, S. et al., *J. Biol. Chem.* 264:3596-3601 (1998))。人類 CD26 被報導與調節胸腺細胞活化、分化及成熟有關(Dang, N.H. et al., *J. Immunol.* 147:2825-2832 (1991); Kameoka, J. et al., *Blood* 85:1132-1137 (1995))。

CD26 乃是一種外酵素，其活性與一種具高受質專一性的絲胺酸類的外胜肽，即二元胜肽基胜肱酶 IV (DPP-IV)相同。如果蛋白質上倒數第二的胺基酸是脯胺酸或是丙胺酸(某些情況下)的話，其可由蛋白質上將二元胜肽的 N-端切下(Fleischer, B. *Immunol. Today* 15:180 (1994))。

曾有人研發出一類低分子量、且對 CD26 具高親和性之合成的單體分子(G.R. Flentke, et al., Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function, *PNAS (USA)* 88, 1556-1559 (1991); W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin. Separation of L-Pro-DL-boroPro into its Component Diastereomers and Kinetic Analysis

五、發明說明 ()

of their Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV. A New Method for the Analysis of Slow, Tight-binding Inhibition, Biochemistry 32:8723-8731 (1993))。已知這類分子可明確有效的抑制與 CD26 連接之 DPIV 蛋白酶活性。

這些以過渡態性類似物爲主的抑制劑，即 Xaa-硼酸脯胺酸，爲底所合成出來的單體抑制劑之代表性結構包括脯胺酸-硼酸脯胺酸、丙胺酸-硼酸脯胺酸、纈胺酸-硼酸脯胺酸、及賴胺酸-硼酸脯胺酸。硼酸脯胺酸係指脯胺酸之羧基團爲硼酸基團($B(OH)_2$)所取代之類似物。脯胺酸-硼酸脯胺酸爲這類抑制劑中被研究的最清楚的一種化合物，其 K_i 值約爲 16 微微莫耳(pM)(W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin. Separation of L-Pro-DL-boroPro into Its Component Diastereomers and Kinetic Analysis of Their Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV. A New Method for the Analysis of Slow, Tight-binding Inhibition, Biochemistry 32:8723-8731 (1993))。而纈胺酸-硼酸脯胺酸之親和力甚至更高，其 K_i 值約爲 1.6 微微莫耳(pM)(W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin. Supra; R.J. Snow et al., Studies on Proline boronic Acid Dipeptide Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV: Identification of a Cyclic Species Containing a B-N Bond, J. Am. Chem. Soc. 116, 10860-10869 (1994))。因此，這些 Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑之效果較已知之下一個抑制劑好上 10^6 倍。

美國專利申請案第 4,935,493 號(Bachovchin'493)及第 5,462,928 號(Bachovchin'928)，兩案在此均以參考文獻方式

五、發明說明 ()

將其內容併入本文中。此兩案揭露了藉施用一能有效抑制二元胜肽基胜肽酶 IV(DP-IV)之可溶性胺基蛋白酶催化活性的蛋白酶抑制劑及過渡性類似物('493 專利)來治療發生移植排斥、關節炎、或系統性紅斑狼瘡(SLE)之患者(G.R. Flentke, et al., Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function, PNAS (USA) 88, 1556-1559 (1991))。

在 PCT 申請案 WO98/00439 中(Multivalent Compounds for Crosslinking Receptors and Uses Thereof)曾提及一種硼酸脯胺酸類的 CD26 抑制劑，無論在那一種 pH 值之水溶液下，均會以可緩慢達到平衡之兩種構型的混合物形式存在，該兩種構型分別是具抑制效果的開放鏈狀結構(活性物)及不具抑制效果的環形(非活性物)構型。低 pH 值較利於該開放、具活性、有抑制效果的物種存在，而高 pH 值則較利於該環形結構。由以上所述可知，WO98/00439 案曾建議需防止胜肽構型(即分子間環化)改變，係藉由建構一個內含一烯烴基團之二價或多價化合物來產生一種新穎的 CD26 抑制劑。依據 WO98/00439 案，"如果可防止環化，本發明者預測此將能提高在此所教導化合物之生物可利用性約 100 至 1000 倍"。

發明概述

本發明係植基於許多令人驚訝且意料之外的發現上。

五、發明說明 ()

意料之外，已知依據美專利申請案第 4,935,493 號 (Bachovchin'493)所述，讓患者口服環形-硼酸脯胺酸可治療線形分子能治療之相同症狀。一般相信環硼酸脯胺酸化合物在體內的酸性環境下(即胃內)曾經轉化反應而形成能選擇性的與 CD26(DP-IV)結合之線形反應產物。因此，依據此觀點，本發明之方法及組成物係關於一種可口服的、新穎的藥學前驅藥，即環硼酸脯胺酸化合物。本發明亦提供該新穎的藥學組成物中含本發明實質上純的環硼酸脯胺酸化合物之新穎組成物，該化合物係以水溶液形式及乾燥形式存在。

一般相信本發明之環狀化合物與其線形化合物同樣具有生物活性。因此，本發明也係關於在一受測動物體內，或試管內(亦即，挑出競爭性分子之篩選分析)當該環狀化合物尚未經可誘發其轉變為線形化合物情況下，於受測動物體內施用該環狀化合物的方法及組成物。因此，該環狀化合物可在有或無將其轉變成線形化合物情況下，以口服(其可有或無在胃酸下被轉變成線形)及注射型式施用。

依據本發明，有用的藥劑為環狀的式 I 化合物(示於圖 4)，每一 X_1 與 X_2 分別是一羥基或是在生理 pH 值下、於水溶液中可被水解成羥基的基團；且 X 代表一可模擬能被後-脯胺基裂解酵素(post prolyl cleaving enzyme)所認得之受質位置之胺基酸或胜肽側鏈。在較佳實施例中，該胺基酸為 L-型胺基酸(對甘胺酸而言，則無左右旋之分)；較好是與 B 鍵結的 C 乃是以 L-型構型進行鍵結。”與 B 鍵結的 C 乃是

五、發明說明 ()

以 L-型構型進行鍵結”一詞係指 C 的絕對構型與 L-型胺基酸類似。

可模擬後-脯胺基裂解酵素 DP-IV(在此亦指”CD26”)受質位置之胜肽詳述於美國專利申請案第 4,935,493 號(Bachovchin'493)及第 5,462,928 號(Bachovchin'928)中。

線形轉變至環形間的反應涉及脯胺酸的順反異構化反應及一新 N-B 鍵結的生成。因此，”環形”係指式 I 化合物的環狀結構，該式 I 化合物乃是二酮六氫吡咩之類似物。此轉換示於圖 3 中。

“實質上純的”一詞在此係指組成物中至少含約 90%之本發明環狀化物。在某些最佳實施例中，組成物中至少含 98%之環硼酸脯胺酸。

在某些實施例中，組成物中所含環硼酸脯胺酸化合物重量比係選自下列：至少 5%，至少 10%，至少 20%，至少 30%，至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，及至少 99.5%。

在這些及其他實施例中，組成物含一線形環硼酸脯胺酸化合物，該化合物重量比係選自下列：少於 95%，少於 90%，少於 80%，少於 70%，少於 60%，少於 50%，少於 40%，少於 30%，少於 20%，少於 10%，少於 5%，少於 4%，少於 3%，少於 2%，少於 1.0%，及少於 0.5%。

在本發明一特別佳的實施例中，該環硼酸脯胺酸化合物乃是纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物。”纈胺酸-硼酸脯胺酸化

五、發明說明 ()

合物”一詞在此係指式 I 化合物，即該硼酸脯胺酸化合物之羧基端係依標準胜肽化學以一胜 鍵連接至纈胺酸殘基上。一較佳實施例乃是環纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物，其可以是以下形式：L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸、L-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸、D-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸、及 D-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸。最好是，該化合物為 L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸或 L-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸。

依據本發明之另一觀點，也提供了製造該組成物之方法及藥學組成物。本發明之藥學組成物中含：(1)一種藥學上可接受的載體；及(2)一或多個本發明之環硼酸脯胺酸化合物。較好是，該藥學組成物係被配方成口服形式來施用，但是，也提供了可供口服或注射用之冷凍乾燥的環狀化合物。這類冷凍乾燥或乾燥之本發明化合物可於施用前於適當 pH 值下之緩衝溶液中重組。一般相信，含本發明環狀化合物之口服配方在施用後，亦即，當化合物遇到胃中酸性環境時，會進行構型改變而由環形轉成線形。因此，較佳之口服配方為藥錠、膠囊、或其他無腸衣包被之固體形式。該藥學組成物的製造方法涉及將本發明之環硼酸脯胺酸化合物置於一藥學上可接受的載體中，或是將環狀化合物配方成藥錠或其他適於口服的形式。

依據本發明之另一觀點，也提供了能調控免疫系統功能的方法。於亟需調控其免疫系統之受測動物體上施用一有效量能調控免疫系統功能之本發明化合物。及藥學組成物。可調控之免疫系統功能包括，但不限於，增加免疫功

五、發明說明()

能，例如藉由刺激具特定免疫功能之免疫細胞(諸如含 CD26 之細胞)增生以預防或治療與感染性疾病、癌症等相關之後果。依據本發明可明確治療的狀況為本發明之明確且獨特之處，將詳述於實施例中。藉施用本發明化合物而能治療之例舉性狀況包括：HIV 感染、贅瘤(其中淋巴細胞成為會溶解細胞的或是助手 T 細胞會攻擊贅瘤)、化療或放射性治療所引起的副作用(諸如肇因自免疫系統細胞數減少，如來自淋巴、紅細胞和或白細胞之數目減少)、腎衰竭(肇因自免疫系統細胞數減少)、因免疫不全所引起的骨髓病變、自體免疫、及免疫不全(肇因自免疫系統細胞數減少)。

更特別的是，本發明可刺激淋巴細胞及造血細胞的增生、分化及移動，並刺激由基質細胞所製造的細胞素，例如 IL-6、及 G-CSF，和能安定或活化 CD26/DPP-IV 蛋白酶受質之細胞素(亦即，末端胺基酸順序為 Xaa 脯胺酸之細胞素，其中 Xaa 乃是一個胺基酸，且其胺基酸序列可為 CD26/DPP-IV 所裂解)。因此，本發明對欲求刺激該免疫細胞增生、分化及移動，或刺激、安定或活化細胞素之製造上均非常有用。造血細胞移動的特點是骨髓內初期代細胞增生，及這些增生細胞會對可造成其移動的移動劑(諸如 G-CSF、GM-CSF 等)反應而被收集至周邊系統。依據本發明有用的試劑可治療淋巴細胞及造血細胞不足或使具該不足之該受測動物體內造血細胞及成熟血球細胞數目回到正常值。這類試劑也可和能在該受測動物體內補充或製造一

五、發明說明()

免疫系統之諸如骨髓或周邊血液植入物這類的造血細胞植入物一同使用。這類試劑更進而可被當作能刺激放大免疫系統之試劑來使用。這類試劑與培育供治療及研究目的之用的細胞在試管內一起使用也同樣有用。

刺激人類淋巴細胞、造血細胞或基質細胞活化或增生的方法。該方法涉及在體內或試管內，讓淋巴細胞、造血細胞和/或基質細胞與濃度足以活化或誘發增生之一或多個本發明環硼酸脯胺酸化合物接觸。在某些較佳實施例中，接觸係藉由讓亟需該治療之人類患者口服化合物來達成，亦即該患者係被診斷為具嚴重淋巴細胞或造血細胞濃度不足之醫療狀況的患者。或者也可以注射方式來對受測動物進行治療。如此所述，受測動物意指人類、及包括狗、貓、綿羊、山羊、馬、牛、豬及嚙齒動物在內的非人類靈長類動物。

本發明藥劑可單獨施用或與其他可提供治療之藥劑一起施用，如能刺激該淋巴細胞、造血細胞或基質細胞活化或增生的藥劑。讓淋巴細胞與本發明化合物接觸的步驟可於試管內或體內進行。

如此所述，本發明化合物意指上述化合物及其鹽類。

在本發明中所提及之所有的專利、專利申請書、參考文獻及其他文件，其內容均以參考文獻的方式併入本文中。

定義

五、發明說明 ()

“胺基酸”一詞係包括亞胺基酸在內。

“硼酸脯胺酸”係指脯胺酸之一 α -胺基硼酸類似物與另一胺基酸鍵結形成一個在 C-端帶有硼酸脯胺酸之二元胜。 “硼酸脯胺酸”係指脯胺酸之羧基團為硼酸基團($B(OH)_2$)所取代之類似物，其中 $(OH)_2$ 代表兩羧基團且 B 代表一硼原子。

“CD26 配體”意指任一能與 T 細胞受體 CD26 結合、且能提供一刺激性或抑制性訊號之蛋白質、醣蛋白質、脂蛋白質或多肽。

CD26、二元胜肽基胜肽酶 IV(DP-IV 或 DPPIV)及二元胜肽基胺基胜肽酶 IV，這些名詞係互通且可交替使用。CD26 為一種可明確將 Xaa-脯胺酸二元胜肽由多肽之 N-端移除之後-脯胺酸裂解酶(其中 Xaa 表示一胺基酸)。

一胺基酸之 α -碳原子乃是胺基酸上接了羧基之碳原子。所有天然胺基酸都屬 α -胺基酸或 α -亞胺基酸；意指胺基及羧基均接在同一碳原子上。可把每一個胺基酸想像成在一碳原子上接了一個羧基、一個胺基、一個稱為 R 之支鏈及一個氫原子，其中“R”是一支鏈；“ NH_2 ”是 α -胺基團；而與 NH_2 相接之第一個碳原子(C)上有一個氫原子(H)及一個 R 基團，其同時也是 α -碳原子；而與接了一個羥基並與氧形成雙鍵之碳原子則是 α -羧基團。

NH_2 及 $COOH$ 基團係用來在胺基酸彼此間形成共價鍵結。當兩胺基酸被鍵結在一起時，會移去由胺基酸羧基端上的羥基與 N-端上的一個氫原子所形成的一個水分子。蛋

五、發明說明 ()

白質形成時，藉由水分子的移除而使一胺基酸上的胺基與另一胺基酸上的羧基反應，所得的鍵結即稱一胜肽鍵。

“胜肽”意指一小分子，通常含 50 個以下的胺基酸且一般不具任何明確的三度空間結構。

藥學製劑及施用模式如此所述。

由以下發明詳述及申請專利範圍將可更了解本發明的其他特點及優點。

附圖簡單說明

圖 1 顯示環 PT-100 及 PT-100 之氫氨酸鹽和甲烷磺酸鹽之口服生物可利用性。

圖 2 顯示環 PT-100 及 PT-100 之氫氨酸鹽和甲烷磺酸鹽刺激經環磷醯胺處理後之老鼠嗜中性白血球細胞再生的效果。

圖 3 顯示 Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑(構型平衡之 Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑)之環形及線型結構。

圖 4 顯示式 I 化合物之結構。

圖 5 顯示所建議之硼酸脯胺酸合成路徑之反應流程圖。

圖 6 顯示 N-BOC-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-頻哪烯醇酯，IP068 之反應流程圖。

圖 7 顯示 H₂N-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-頻哪烯醇酯，HCl IP069 之反應流程圖。

圖 8 顯示環-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸，IP070 之反

五、發明說明 ()

應流程圖。

圖 9 顯示 $H_2N-(S)$ -纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-OH,HCl, FP020 之反應流程圖。

發明詳述

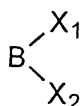
本發明係植基於許多令人驚訝且意料之外的發現上。意料之外，已知依據美專利申請案第 4,935,493 號 (Bachovchin'493) 所述，讓患者口服環形-硼酸脯胺酸可治療線形化合物能治療之相同症狀。一般相信環硼酸脯胺酸在體內的酸性環境下 (即胃內) 會轉變成能選擇性的與 CD26(DP-IV) 結合之線形結構。這些預期外的結果可供治療及研究上應用。因此，依據此觀點，本發明之方法及組成物係關於一種可口服的、新穎的藥學前驅藥，即環硼酸脯胺酸化合物。本發明也包括可在使用前於酸性緩衝液中重組以形成線形硼酸脯胺酸化合物之本發明環硼酸脯胺酸化合物之冷凍乾燥形式。該新穎的藥學組成物中含本發明實質上純的環硼酸脯胺酸化合物，本發明同時也提供了水溶液形式及乾燥形式的化合物。

依據本發明，有用的藥劑為環狀的式 I 化合物 (示於圖 4)，每一 X_1 與 X_2 分別是一羥基或是在生理 pH 值下、於水溶液中可被水解成羥基的基團；且 X 代表一可模擬能被後-脯胺基裂解酵素 (post prolyl cleaving enzyme) 所認得之受質位置之胺基酸或肽側鏈。在較佳實施例中，該胺基酸為 L-型胺基酸 (對甘胺酸而言，則無左右旋之分)；較好是與 B

五、發明說明()

鍵結的 C 乃是以 L-型構型進行鍵結。”與 B 鍵結的 C 乃是以 L-型構型進行鍵結”一詞係指 C 的絕對構型與 L-型胺基酸類似。

因此



基團與 C 間的關係就如 L-型胺基酸上羧基與 α -碳原子間的關係一樣。在某些實施例中，A 及 A₁ 分別是脯胺酸或丙胺酸殘基；m 是 0；X₁ 與 X₂ 是羥基；抑制劑是 L-丙胺酸-L-硼酸脯胺酸；且抑制劑是 L-脯胺酸-L-硼酸脯胺酸。

如此所述，本發明化合物係指前述化合物及其鹽類。

如美國專利申請案第 4,935,493 號、授予 Bachovchin 等人之”蛋白酶抑制劑”(Bachovchin'493)；及美國專利申請案第 5,462,928 號、授予 Bachovchin 等人之”第 IV 型二元胜肽基-胺基胜肽酶”(Bachovchin'928)；授予 Hanko 等人之”脯胺酸衍生物及組成物及以其作為 HIV 蛋白酶抑制劑之用途”(“Hanko'604”)；PCT/US92/09845 之”脯胺酸硼酸酯之製備方法”，及其美國優先權申請案(USSN 07/796,148 及 07/936,198)、申請人為 Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.(“Boehringer”)；及 PCT/GB94/02615 之”第 IV 型-絲胺酸蛋白酶抑制劑”、申請人為 Ferring V.V(“Ferring”)等案之內容所述，能抑制後-脯胺基裂解酵素之胜肽，若是能和一個

五、發明說明()

具反應性的官能基團在該後-脯胺基裂解酵素具反應性位置上以共價鍵結合形成一共價性複合物，則可有效的抑制後-脯胺基裂解酶。

本發明之環硼酸脯胺酸化合物可變化其構型成為可模擬後-脯胺基裂解酵素 DP IV(在此亦稱"CD26")之受質結合位置的線形化合物("線形硼酸脯胺酸化合物")。DP IV 乃是一種後-脯胺基裂解酵素，可專一性的將 Xaa-脯胺酸(Xaa代表任何一種胺基酸)之二元胜肽由受質多肽的胺基端移除。以過渡性類似物，即 Xaa-硼酸脯胺酸，為底所合成出來的單體抑制劑之代表性結構包括纈胺酸-硼酸脯胺酸、賴胺酸-硼酸脯胺酸、脯胺酸-硼酸脯胺酸及丙胺酸-硼酸脯胺酸，其中"硼酸脯胺酸"係指脯胺酸之羧基團為硼酸基團(B(OH)₂)所取代之類似物。

在本發明一特別佳實施例中，該環硼酸脯胺酸化合物乃是一纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物。一"纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物"係指一具有式 I 之化合物，其中該硼酸脯胺酸化合物之羧基端係依標準胜肽化學以一胜肽鍵連接至纈胺酸殘基上。該纈胺酸可選擇性的以一胜肽鍵與額外的胺基酸連接，前提是這些額外的胺基酸不會抑制纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物與 CD26 結合的能力。在一最佳之實施例中，本發明化合物乃是纈胺酸-硼酸脯胺酸(亦稱為"PT-100")。由於胺基酸殘基上的不對稱碳原子及與硼原子相接之碳原子亦屬不對稱碳原子，因此纈胺酸-硼酸脯胺酸可以多種異構物形式存在：(a)L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸，(b)L-纈胺酸-R-硼

五、發明說明 ()

酸脯胺酸，(c)D-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸，及(d)D-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸。最好是，該化合物為 L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸或 L-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸。同樣的，本發明之環硼酸脯胺酸化合物也可以多種異構物形式存在；但是，一般來說，較佳的化合物乃是胺基酸殘基上的不對稱碳原子為 L-構型，且硼酸脯胺酸為 R 或 S 之化合物。

在本案中，係以下述及詳述於教科書中、習知技藝人士所知之傳統技術來分辨這些異構物(參見 Principles in Biochemistry, eds. A.L. Lehninger, P.99-100, Worth Publishers, Inc. (1982) New York; Organic Chemistry, Morrison and Boyd, 3rd edition, chap 4, Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA (1978); Patent Cooperation Treaty published application WO93/10127, application no. PCT/US92/09845)。

所有的胺基酸，除甘胺酸外，均含有一個或一個以上的不對稱碳原子。胺基酸之不對稱 α -碳原子即被稱為一不對稱中心，且可以兩種不同的異構物形式存在。這些不同的異構物形式，除了所造成極性光平面轉動的方向不同外，均具有相同的化學及物理性質。因此這些胺基酸被稱為具“光學活性”，即這些胺基酸可轉動之極性光平面的轉動方向不同。

因此與 α -碳原子相接之四個不同取代基在空間上會出現兩種不同的排列。這些排列為彼此無法重疊的鏡像，因此稱其互為光學異構物、鏡像物、或立體異構物。若某一胺基酸之立體異構物溶液可將極性光平面朝左轉動，即稱

五、發明說明 ()

其為左旋異構物[以(-)表示]；該胺基酸之另一種立體異構物溶液則可將極性光平面朝右轉動，即稱其為右旋異構物[以(+)表示]。

一種用來區別並為立體異構物命名之較系統化的方法乃是以四個不同取代基在該不對稱碳原子(即 α -碳原子)上以四面體形式所形成之絕對構型來為其命名。為建立此系統，因此選擇了一種化合物(甘油醛)，其係為具有不對稱碳原子之最小的糖分子。依傳統方法，該甘油醛的兩種異構物分別被命為 L 或 D。其絕對構型可由 x 光繞射分析來確定。參考甘油醛之絕對構型，也可將胺基酸命為 L 或 D 形構型。因此，無論這些不對稱立體化合物其轉動極光平面的方向為何，凡具有與 L-甘油醛在空間排列上相同構型之不對稱化合物被稱為 L-形，而具有與 D-甘油醛在空間排列上相同構型之不對稱化合物被稱為 D-形。因此，L 或 D 的符號係指四個取代基在該不對稱碳原子(即 α -碳原子)上所形成之絕對構型。

一般來說，含有不對稱中心之天然化合物只會以一種立體異構物的形式存在，不是 L 就是 D。所有天然胺基酸均為 L 形胺基酸，但是，本發明也包括以 D 形胺基酸構型存在之立體異構物。

大部分蛋白質上的胺基酸都可明確無誤的以 L 或 D 之命名系統來命名。但是，具有 2 個或多個不對稱中心之化合物其可能的立體異構物數目可多達 2^n 個，其中 n 為不對稱中心的數目。這些立體異構物係以 RS 系統來命名以其

五、發明說明()

能更清楚的標示含多個不對稱中心之胺基酸的構型。舉例來說，諸如蘇胺酸、異亮胺酸這類含 2 個不對稱碳原子之化合物便具有 4 個立體異構物。含 2 個不對稱中心之化合物的異構物稱為非鏡像立體異構物(diastereomers)。在由 A.L. Lehninger 編輯之 Principles in Biochemistry 一書之 99-100 頁中，對 RS 命名系統有非常完整的介紹。簡述如下。

為了避免在為一內含 2 或多個不對稱中心之化合物命名時出現混淆，因此發明了 RS 命名系統。一般來說，系統係將繞著不對稱碳原子之四個取代基以原子序大小或價鍵密度來加以排序，並令原子序最小者或排序最低者位於觀察者最遠的位置。習知技藝人士應熟知這些排序的方法，該方法詳述於 Lehninger 一書之 99 頁。如果排序依順時針方向依序減少，該不對稱中心之構型即為 R；如果排序依反時針方向依序減少，該不對稱中心之構型即為 S。依此系統對每一個不對稱中心之構型命名。將此系統運用在蘇胺酸的命名上，習知技藝人士將可知依 RS 命名系統而言，L-蘇胺酸係指(2S,3R)-蘇胺酸。目前習知技藝人士已習慣且仍繼續在使用一種更傳統的 L-、D-、L-allo、及 D-allo 型式來命名蘇胺酸。但是，RS 命名系統愈來愈被廣泛使用於胺基酸的命名上，特別是內含一個以上不對稱中心之胺基酸。

“實質上純的”係指本發明之環硼酸脯胺酸化合物約佔組成物重量至少 90%。在某一實施例中，環硼酸脯胺酸化合物重量約佔組成物重量至少 5%，至少 10%，至少 20%，

五、發明說明()

至少 30%，至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%，及至少 99.5%。

在這些及其他實施例中，含線形環硼酸脯胺酸化合物之組成物中，該線形環硼酸脯胺酸化合物重量需少於 95%，少於 90%，少於 80%，少於 70%，少於 60%，少於 50%，少於 40%，少於 30%，少於 20%，少於 10%，少於 5%，少於 4%，少於 3%，少於 2%，少於 1.0%，及少於 0.5%。

依據本發明另一項觀點，也提供了製備這類藥學組成物之方法。本發明藥學組成物中含：(1)一藥學上可接受的載體；和(2)一或多種本發明之環硼酸脯胺酸化合物。在較佳實施例中，該環硼酸脯胺酸化合物是纈胺酸-硼酸脯胺酸。該藥學組成物較好是無菌狀態。”藥學上可接受的載體”一詞係指適於施用於人類或其他動物體上之一或多種可相容的固態或液態充填物、稀釋物或包埋物質。”載體”一詞係指一種有機或無機、天然或合成之成分，當與活性成分結合後可促進活性成分的施用。藥學組成物的成分也能與本發明分子及其彼此互相混合，且不會互相反應造而損害到使所欲求之藥學效用。

較好是，該藥學組成物被配方成適合口服或注射用，但是，吾人也提供了冷凍乾燥形式之環狀化合物。可於施用前將這類冷凍乾燥或其他乾燥形式之化合物於適當 pH 值及鹽濃度之緩衝溶液中重組。若是欲採口服或注射方式

五、發明說明()

施用，則可於施用前將本發明環狀化合物於酸性或中性緩衝溶液中重組。一般來說，重組係涉及將環狀化合物置於一緩衝液中，該緩衝液之 pH 值需能讓環狀化合物於重組(即口服或注射配方)時仍能保持其構型或能讓其構型由環形轉變為線形硼酸脯胺酸化合物(即口服或注射配方)。一般深信含本發明環硼酸脯胺酸化合物之口服配方，在施用後，亦即在消化道的酸性 pH 值情況下，其構型會由環形轉變為線形硼酸脯胺酸化合物。因此，本發明某些口服配方實施例中並未包括腸衣在內。

在與本發明相關的一項觀點中，提供了一種藥學組成物的製備方法。該方法涉及將本發明環硼酸脯胺酸化合物置於一藥學上可接受的載體中。該藥學上可接受的載體較好是適合口服用。更好是，該方法係涉及將組成物配方成不含腸衣的藥錠或膠囊。在另一實施例中，該藥學上可接受的載體較好是適合注射用，且該方法更涉及將該組成物冷凍乾燥成一冷凍乾燥式的製備。藉由在這類製備中加入一具酸性 pH 值之藥學上可接受的載體，形成一適於注射用之重組製備。或者，藉由在這類製備中加入一具中性 pH 值(即 pH 值約在 6-8 間，較好是界於 6.5-7.5 間)之藥學上可接受的載體，形成一適於口服用之重組製備。

依據本發明的另一項觀點，也提供了刺激人類淋巴細胞、造血細胞或基質細胞活化或增生的方法。該方法涉及讓該淋巴細胞或造血細胞在體內或試管內與濃度足以誘發細胞活化或增生之一或多種本發明環狀化合物接觸。在某

五、發明說明 ()

些較佳實施例中，係藉由讓亟需該治療之患者口服該化合物來達成接觸的目的，亟需該治療之患者即指被診斷出具淋巴細胞或造血細胞不足這類嚴重醫療狀況之患者。或者也可能讓該環狀化合物轉變成線形化合物的情況下，以注射方式來實施該治療方法。

本發明化合物可單獨使用，或與能治療該疾病狀況的其他藥劑一同施用，即能刺激該淋巴細胞或造血細胞活化或增生之不同藥劑。例如本發明化合物可與為達某特定目的所特別選用之外加生長因子及細胞激素一同使用。例如，若希望刺激某特定類型之造血細胞，則可使用能促進該特定類型之造血細胞增生及分化的生長因子及細胞激素。因此，已知包括 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13 及 IL-17 在內的白介素均與淋巴細胞的分化有關。白介素-3 及白介素-4 均與肥大細胞之分化有關。粒細胞巨噬細胞群落刺激生長因子(GMCSF)、白介素-3 及白介素-5 均與嗜伊紅血球之分化有關。GMCSF、巨噬細胞群落刺激生長因子(MCSF)及白介素-3 均與嗜中性白血球細胞的分化有關。GMCSF、白介素-3、白介素-6、白介素-11 及 TPO 均與血小板細胞的分化有關。Flt3 配體則與樹突狀細胞生長有關。GMCSF、白介素-3 及紅血球生成素則與紅血球分化有關。最後，能維持造血之原始、多功能代細胞的自我更新需要 SCF、Flt3 配體、G-CSF、IL-3、IL-6 及 IL-11 的存在。習知技藝人士應很清楚達成所欲求效果之各類組合方式。因依據本發明有

五、發明說明()

用的試劑可刺激原始、未定型之造血代細胞，因此這類試劑可與前述任一類別的試劑合用來刺激某一特定類型造血細胞的增生。習知技藝人士應熟悉前述這些因子，及大部分都是市面上買得到的。

依據另一實施例，本發明化合物與淋巴細胞的接觸可於試管內進行。舉例來說，可由患者或捐贈者身上取出下列任一種細胞並讓其在試管內與本發明線形化合物接觸：T-細胞、骨髓細胞、幹細胞或初期代細胞(early lineage progenitor cells)。較好是，在本發明化合物於試管內與這些分離出的細胞接觸前、或同時，將本發明化合物之 pH 值調整為中性，以促進線形硼酸脯胺酸化合物的形成。如此，環狀化合物可以環狀形式儲存一段較長的時間，因此可降低降解/促進使用前化合物的安定度。細胞係與足以有效刺激細胞量之本發明化合物接觸，之後再將這些處理過的細胞重新引入患者體內。

依據本發明的另一項觀點，也提供了能調控免疫系統功能的方法。於亟需調控其免疫系統之受測動物體上施用一有效量能調控免疫系統功能之本發明化合物。及藥學組成物。可調控之免疫系統功能包括，但不限於，增加免疫功能，例如藉由刺激具特定免疫功能之免疫細胞(諸如含 CD26 之細胞)增生以預防或治療與感染性疾病、癌症等相關之後果。依據本發明可明確治療的狀況為本發明之明確且獨特之處，將詳述於實施例中。藉施用本發明化合物而能治療之例舉性狀況包括：HIV 感染、贅瘤(其中淋巴細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明()

成為會溶解細胞的或是助手 T 細胞會攻擊贅瘤)、化療或放射性治療所引起的副作用(諸如肇因自免疫系統細胞數減少,如來自淋巴、紅細胞和或白細胞之數目減少)、腎衰竭(肇因自免疫系統細胞數減少)、因免疫不全所引起的骨髓病變、自體免疫、及免疫不全(肇因自免疫系統細胞數減少)。

藉由讓淋巴細胞於試管內或體內與濃度足以誘發細胞活化之本發明化合物接觸來刺激淋巴細胞的活化或增生。該方法較好是涉及在體內施用該化合物,該化合物係與一諸如無菌生理食鹽水之藥學上可接受之載體混合。患者可以是任何身受淋巴細胞活化或濃度不足之患者。這類情況包括 HIV 感染、腎衰竭、癌症(特別是伴隨有化療所造成之淋巴細胞不足的癌症)、因淋巴細胞不足所引起的骨髓病變。本化合物較好是以口服方式施用至患者身上。或者,本發明化合物可於試管內來刺激淋巴細胞的活化或增生,亦即當患者自體之淋巴細胞被移除後,來刺激淋巴細胞活化和/或增生,並將其重新引入患者體內。本方法可用來增加專門攻擊患者腫瘤之 T-細胞數目或感染 HIV 患者體內 T-細胞數目。

本發明之一重要觀點是,當受測者之造血細胞或成熟血球細胞低於正常值以下,以足以使其造血細胞或成熟血球細胞數目回到一預設正常值或預設值之有效量來施用該藥劑。該藥劑較好是以 18 小時內至少 2 劑量的方式施用於受測動物上。本發明對回復嗜中性白血球、紅血球細胞或

五、發明說明()

血小板細胞數目回到一正常或預設值的應用上非常有用。最佳之藥劑為環硼酸脯胺酸化合物。

依據本發明的另一項觀點，也提供了能縮短或去除受測動物因使用造血抑制劑而使體內造血細胞或成熟血球細胞低於正常值以下之時間的方法。以能增加受測動物體內造血細胞或成熟血球細胞數目之一有效量在亟需該治療之動物身上施用該藥劑，其中該藥劑係在造血抑制劑施用前或與其幾乎同時被施用至受測動物體內。該藥劑及較佳藥劑如前述。在一重要實施例中，造血細胞抑制劑會造成受測動物體內造血細胞或成熟血球細胞低於一預設之正常值以下。較好是，該藥劑較好是以 18 小時內至少 2 劑量的方式施用於受測動物上。在一重要實施例中，本發明對回復嗜中性白血球細胞、紅血球細胞或血小板細胞數目回到一正常或預設值的應用上非常有用。較佳之藥劑有效量如前述。

本發明的另一項目的是提供一種方法，為準備接受造血細胞抑制劑之受測動物體作準備。該方法涉及在受測動物體接受造血細胞抑制劑前，將一有效量能刺激受測動物製造生長因子之試劑施用至動物體身上。該試劑及較佳的試劑如上述。在一重要實施例中，該生長因子是粒細胞群落生成刺激因子。在其他實施例中，該生長因子係選自由 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-11、IL-17、TPO、EPO、MCSF、GMCSF、FLT-3 配體和幹細胞因子所組成的族群中。施用至受測動物體上的量較好是低於每天每公斤體重

五、發明說明()

1 毫克。同時該劑量較好是於 18 小時內以至少 2 次劑量施用至受測動物體上。

本發明的另一項目的是提供一種方法，以增加一受測動物體中的造血細胞數目或成熟血球細胞數目。在亟需治療的受測動物體上施用一有效量試劑，以增加該受測動物體身上之造血細胞數目或成熟血球細胞數目，其中該試劑係以 18 小時內 2 或 3 劑量的第一種服法(regimens)被施用至動物體身上。該試劑及較佳的試劑如上述。在一重要實施例中，該試劑係以 18 小時內 2 或 3 劑量的第二種服法被施用至動物體身上，其中該第二種服法與第一種服法之間有時間區隔。在另一實施例中，該試劑係以 18 小時內 2 或 3 劑量的第三種服法被施用至動物體身上，其中該第三種服法與第一、二種服法之間有時間區隔。在另一實施例中，該試劑係以第四、第五、第六、或第七種服法被選擇性的施用，其中每一種服法都是以 18 小時內 2 或 3 劑量組成，且其中每一種服法均與前種服法之間有時間區隔。在其他實施例中，受測動物體內的紅血球細胞與血小板細胞數目都遠低於正常值。較佳的劑量、試劑及類似物均如上述。在重要實施例中，劑量不可多於六個服法、不可多於五個服法、不可多於四個服法、不可多於三個服法、甚至不可多於二個服法。

本發明的另一個目的涉及恢復或預防一受測動物體內造血細胞數目不足。這類不足可肇因於諸如基因異常、疾病、壓力、化療(例如以具細胞毒性之藥物、類固醇、免疫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明()

抑制藥物等來進行治療)及輻射照射治療。

本發明廣泛來說係關於可使因使用造血細胞抑制劑所引起的血球細胞不足現象恢復至正常。造血細胞抑制劑乃是一種外加之藥劑(諸如一種藥物或輻射治療)，會導致受測動物之造血細胞數目或成熟血球細胞數目下降。

在此所指的造血細胞係指粒細胞(如前骨髓細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅白血球細胞及嗜鹼性白血球)、紅血球、網狀細胞、血小板(如巨核細胞、可生成血小板之巨核細胞及血小板)、淋巴細胞、單核白血球、樹突狀細胞及巨噬細胞。成熟血球細胞包括成熟的淋巴細胞、血小板、紅血球、網狀細胞、粒細胞及巨噬細胞。在本發明的某些重要觀點中，依據本發明有用的試劑可增加嗜中性白血球、紅血球及血小板細胞數目。與嗜中性白血球有關，本發明試劑可用來治療除藥物或輻射照射所引起之嗜中性白血球減少、慢性自發性嗜中性白血球減少及週期性嗜中性白血球減少症。

基質細胞包括纖維母細胞、巨噬細胞、內表皮細胞、造骨細胞，及其他習知技藝人士熟知且詳述於免疫學教科書上的細胞。

本發明的一個重要目的係使該受測動物體內造血細胞數目回到一“正常值”或“保護值”。在此所指之一“正常值”係指一處於控制狀態下的細胞數量，較好是包括與受測動物有類似特徵的其他受測動物，比如說年齡。“正常值”也可以指一個範圍，比如說，以一群細胞來獲得該受測動物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 ()

所屬特定族群之基礎值。也可將族群分組，比方說分成四組，最低的一組內乃是由具有最少造血細胞之個體所組成，而最高的一組內乃是由具有最多造血細胞之個體所組成。因此，”正常值”可視所選特定族群而有所不同。較好是，正常值係指那些從未罹患造血細胞異常且看起來健康的受測動物體內的細胞數目。這種”正常值”，可當作預設值，作為考量一受測動物該屬於那一類別之用。習知技藝人士可藉由一般常規的實驗即可定出適當的範圍及類別。可以該範圍內之平均值或其他預選值作為一正常的預設值。同樣的，也可以受測動物在以造血抑制劑處理前之值作為一預設值。

一般來說，嗜中性白血球的正常值約在每微升 1800-7250 個細胞間(平均值為 3650)；嗜鹼性白血球細胞的正常值約在每微升 0-150 個細胞間(平均值為 30)；嗜伊紅血球細胞的正常值約在每微升 0-700 個細胞間(平均值為 150)；巨噬細胞的正常值約在每微升 200-950 個細胞間(平均值為 430)；淋巴細胞的正常值約在每微升 1500-4000 個細胞間(平均值為 2500)；紅血球細胞的正常值約在每微升 $4.2 \times 10^6 - 6.1 \times 10^6$ 個細胞間；血小板細胞的正常值約在每微升 $133 \times 10^3 - 333 \times 10^3$ 個細胞間。前述範圍可信度均在 95% 以內。

醫界已針對某些狀況定出其合理的預設值應為多少。例如，輕微嗜中性白血球減少症的特點是每微升約有 1000-2000 個細胞，中度嗜中性白血球減少症特點是每微升約有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

500-1000 個細胞，嚴重嗜中性白血球減少症特點則是每微升含 500 個以下的細胞。同樣的，以成人來說，當淋巴細胞數低於 1500 時即被視為一種醫療上不欲見到的狀況。對兒童而言，該數值則是 3000 以下。習知技藝人士應能很輕易的推出其他預設值。依據本發明有用的試劑可用來建立或重建這類包括正常值在內的預設值。

造血細胞的保護值乃是指可確保患者臨床利益所需的細胞數目。所需細胞數目可等於或低於“正常值”。習知技藝人士應很清楚這類所需細胞數目。例如，嗜中性白血球的保護值應高於 1000，較好是至少有 1500。

一般來說，本發明化合物或組成物對調節免疫反應療效上非常有用，可(1)治療特徵為免疫抑制之疾病，即 AIDS 或與 AIDS-相關之併發症、其他由病毒或環境誘發之疾病及某些先天性免疫缺乏症狀；(2)增加因使用免疫抑制藥物所受損之免疫功能；(3)治療系統性紅斑狼瘡、風濕性關節炎、及多重硬化症。

本發明環狀或線狀化合物，或其組成物可用來刺激培育中之造血細胞的生長。可將這類細胞移植到諸如人類之哺乳動物身上，以強化或加大造血系統、免疫系統或兩者之功能。也可以這些化合物來治療因疾病或造血細胞不足之患者，例如 AIDS 患者；因接受化療之患者和/或因癌症接受輻射治療之患者，及接受骨髓移植之患者。

當本發明組成物被施用於諸如人類之哺乳動物身上，可提高被壓抑之免疫系統的細胞重生，這些細胞即 CD4 和

五、發明說明()

T-細胞。因此，本發明化合物可以一有效量單獨施用，或與一藥學上可接受的載體、佐劑、或稀釋劑一起，以單一劑量的形式施用至諸如人類之哺乳動物身上。可採傳統之藥學方法來提供可施用於受免疫抑制、或免疫不足或 AIDS 症狀之苦之患者適當的配方或組成物。可採任何適當的施用途徑，例如注射、血管內、皮下、肌肉內、囊內、脊椎內、池內、腹膜內、鼻腔內、氣態噴霧、或口服方式施用。藥學配方可以是溶液態或懸浮液態；口服用之藥學配方可以是藥錠或膠囊；鼻內用藥學配方可以是粉末、鼻滴劑或氣態噴霧劑。如上述，因消化道中酸性環境之故，口服用化合物無需在施用前將其 pH 值調至可形成線形化合物之酸性 pH 值。

本發明化合物或組成物可用來控制 T 細胞的活化過程，因此可用來防止不欲求之免疫反應出現。

本發明化合物或組成物可用來促進回憶抗原(recall-antigen)之專一性免疫反應。大部分感染 HIV 的人的淋巴細胞都有一種缺陷，即其對回憶抗原的反應出現缺陷(A.S. Fauci. The human immunodeficiency virus:ingectivity and mechanisms of pathogenesis. Science 239, 617-722 (1988))。這種缺陷在感染初期及帶有 CD4+之 T-細胞數目開始下降前即會出現。因此，一般相信這些化合物對 AIDS 的治療相當有用。因此，其刺激活性藉由改善在感染初期出現之回憶抗原的反應，及增加帶有 CD4+之 T-細胞數目，來改善感染 HIV 的人之功能。

五、發明說明()

因一般深信，本發明環狀或線狀化合物，對 CD26 有很高的親和力及專一性，因此他們對選擇性的傳送其他藥學治劑至帶有 CD26 之細胞(即帶有 CD4+之 T-細胞)上非常有用。因此，本發明化合物可用來將一般無法穿透細胞之藥學藥物傳送至帶有 CD26 之細胞內。例如，已有許多 HIV 蛋白酶強力抑制劑被發展出來，雖說其對 HIV 蛋白酶具有非常高的親和力，但因其無法進入帶有 CD26 之細胞內，因此其在體內阻礙 HIV 的能力變得極有限。這些 HIV 蛋白酶抑制劑可連接在本發明化合物上(即，藉由共價鍵連接在一胺基酸側鏈上或非與 CD26 結合部分之官能基團上)，前提是該連接反應不會影響本發明化合物在中性 pH 值下環化及進入帶有 CD26 之細胞內的能力。就算是一種藥物能進入帶有 CD26 之細胞內，本發明化合物可用來將帶有 CD26 之細胞內之該藥物濃縮，使欲求之藥學活性達到最大，並使其對其他細胞之不欲求的細胞毒性降至最低。因此，此種傳遞載體提供了一種藉由將 AZT 送至帶有 CD26 之細胞內，而可防止受 HIV 感染細胞被溶解的機制。因此，在此所揭露之化合物將 CD26 包入細胞內之活性，可用來當成一種可運送並濃縮其他藥劑至帶有 CD26 之細胞內之載體。

本發明化合物或其組成物可單獨使用，或彼此合用，或與其他藥劑一起合用。例如，可以一或多種本發明化合物及多種傳統藥物一起來治療免疫系統異常。

本發明藥學製劑係以藥學上可接受之量於藥學上可接

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 ()

受之組成物中來施用。這類製劑可常規性的含有鹽、緩衝劑、防腐劑、相容之載體、及其他藥劑。當用於藥物上時，鹽類需為藥學上可接受的，但可輕易的以非藥學上可接受的鹽來製備此藥學上可接受之鹽類則仍在本發明範疇內。這類藥理上及藥學上可接受的鹽類包括，但不限於，那些由下列酸所製成之鹽類：氯酸、溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、順丁烯二酸、醋酸、水楊酸、檸檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。藥學上可接受的鹽類也可以用鹼金屬或鹼土金屬的鹽類來製備，諸如其鈉鹽、鉀鹽或鈣鹽。或然率，該藥學組成物也可含諸如殺藻胺、氯化丁醇、對苯物(parabens)、硫柳汞(thimersol)等之適當防腐劑。適於口服、皮下注射、靜脈注射、肌肉注射等方式施用之載體配方可在 Mack Publishing Co.(Easton, PA)公司出版之 Remington's Pharmaceutical Sciences 一書中找到。

有許多施用途徑都可用來治療受測動物。特定之施用模式將視所選用之特定化合物、欲治療狀況之嚴重性及所需欲求療效之劑量而定。一般來說，本發明方法可以任何醫學上可接受的模式來施用，即在可產生效量活性物、且不會產生臨床上不欲求效應之任何模式。這類施用模式包括口服、直腸、表面塗抹、鼻用、皮內、或注射。這類模式也包括由患者身上取得 T 細胞或骨髓細胞、幹細胞或初期代細胞，並讓這些分離出的細胞在活體外 (*ex vivo*) 與本發明化合物接觸，而後再將這些經處理後的細胞重新引入患者體內。可以此領域中眾所周知之任何方式將處理後

五、發明說明 ()

的細胞重新引入患者體內。

最好是採口服。適合口服之組成物可以不連續之分離單元存在，如膠囊、藥錠、藥片。每一種單元內均含有一預定量之本發明化合物。其他組成物包括在水溶液或非水溶液之懸浮液，如糖漿、甘香酒劑或乳化劑。因需要將本發明環狀化合物曝露於消化道中的酸性 pH 值使其轉變成線型化合物之故，因此口服配方較好是不含腸衣。

如此所述，"注射"係包括皮下、靜脈、肌肉、或灌注。適於注射用之組成物至少包括本發明化合物之無菌溶液，其張力較好是與欲接受該溶液之血液張力相同。可依已知方法以適當分散液或濕潤劑及懸浮劑來為該溶液製備進行配方。此無菌注射製備物也可是溶於無菌之注射用稀釋物或溶劑，如 1,3-丁烷二醇，之無菌注射液或懸浮液。在這些藥學可接受載體及溶劑中可包括水、林格氏液 (Ringer's solution)、及等張之氯化鈉溶液。此外，也可用無菌之固定油作為溶劑或懸浮基質。可使用任何品牌之合成的單一或二甘油醛。此外，也可以諸如油酸之脂肪酸來製備注射用配方。對長效治療及預防目的而言，靜脈及肌肉注射並不適合。這些方法較適合緊急狀況時用。口服配方因其方便使用及劑量流程，因此適合預防及其他治療之用。

藥學組成物可以單一劑量形式存在，並可以藥界習知之方法來製備。該方法包括讓本發明化合物與構成該組成物之一或多種載體接觸的步驟。一般來說，組成物係藉由

五、發明說明 ()

讓本發明化合物均勻的、且緊密的與一液態載體、一切得極細之固態載體、或兩者一起接觸，之後將其成形。

其他的傳送系統可包括時間釋、延長釋放或持久性釋放之傳送系統。這類系統可避免重複施用該試劑，增加受測動物及醫師的方便。可用的釋放傳送系統有許多種且均為習知技藝人士所熟知。他們包括諸如聚(糖交酯)、草酸酯共聚物、聚己內酯、聚酯醯胺、聚鄰酯類、聚羥基丁酸及聚酞等之聚合物為底的系統。含藥物之前述聚合物微膠囊如美國專利申請案 5,075,109 中所述。傳送系統也包括非聚合物式的系統：含諸如膽固醇、膽固醇酯類之固醇物及諸如單-、雙-及三酸甘油酯類之脂肪酸的油脂；水性凝膠釋放系統；sylasted system；及以胜肽為底之系統；蠟塗覆物；以傳統結合劑及輔劑壓縮成之藥錠；部分融合之植入物等類似物。特定範例包括，但不限於：(a)腐蝕性系統，其中之藥劑係包含於一種如美國專利申請案第 4,452,775、4,667,014、4,478,034 及 5,239,660 號所述之基質中，和(b)二擴散系統，其中一活性成份係以一控制速率由諸如美國專利申請案第 3,832,253 及 3,854,480 號所述之聚合物中擴散出去。此外，也可採用幫浦式的硬體傳送系統，某些適合當做植入物使用。

對慢性病的治療而言，長期持久性的釋放系統可能特別適合。如此所述之”長期釋放”，意指該植入物係被建構並安排成可傳送治療有效量的活性成份至少 30 天，且較好是 60 天。習知技藝人士應熟悉所謂的長期持久性釋放系

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 ()

統，此包括上述之釋放系統。

如上述之化合物係以有效量的方式被施用。有效量視施用模式、治療狀況及欲求效果而定。如上述也將視階段狀況、受測動物身體狀況及年齡、同時施用之治療性質，及一般醫療執業人員熟知的因素而有所不同。例如，一能刺激 T 細胞活化或造血之有效量係指藉由測量所增加之細胞數或 T 細胞活性，可知 T 細胞活化或造血已增加至一具統計顯著性之藥量。也可藉由測定受測動物體免疫功能(即所增加之 B 細胞反應、所增加之具細胞毒性的 T 細胞反應、刺激骨髓增生、增加白血球或紅血球細胞數目、或減緩、停止、或預防感染或癌症)的改變來測量刺激一欲求免疫反應之有效量。能治療自體免疫異常或過敏性異常之有效量乃是足以減輕或抑制與該異常相關之免疫或過敏反應之有效劑量，以減緩或停止該異常之惡化。因此，需知本發明化合物可用來預防性的治療一可能會發展出該免疫反應之受測動物體(如接受移植前之個體)上的自體免疫異常現象(如移植排斥)。如申請專利範圍中所用的"抑制"一詞包括所有前述現象。同樣的，一能治療免疫異常之有效量係指能減緩或完全停止與該免疫系統異常相關之症候以預防異常之量。一般較好是使用最大劑量，亦即依據可靠的醫學判斷所能使用之最高安全劑量。

一般來說，本發明活性化合物劑量範圍約從每天每公斤體重 0.001 毫克至每天每公斤體重 1000 毫克間。適合的劑量範圍約從每天每公斤體重 0.001 毫克至每天每公斤體

五、發明說明()

重 100 毫克間，較好是每天口服一或多次。採用其他諸如靜脈注射之施用模式將會使劑量降低。可採用許多施用途徑。一般來說，當受測動物接受了初期劑量後的反應並不充分時，可使用患者可容忍之較高劑量(或以一種不同、更能局部傳送途徑來造成較高的有效劑量)。可考慮每天施用多重劑量。

在本案中所引用的所有專利、專利申請案、參考文獻及其他文件，其內容均以參考文獻的方式併入文中。

實施例

實施例顯示本發明一代表性環狀化合物之生物可利用性及該化合物再體內刺激淋巴細胞增生之活性。這些實施例係爲了闡述本發明之用，本發明並不因此受到限制。實施例中所用的爲本發明一特別佳之化合物，即環硼酸脯胺酸化合物(“PT-100”)。

在此案中，詳述了每一實施例及附圖。需知在此所揭露之任一反應基團可用來取代附圖中及特定實施例中之特定反應基團(如硼酸基)。可藉 NMR 來評估環狀化合物的生成。

實施例 1 化合物之一般合成方法

本發明化合物係以類似的化學法合成。這些化合物被設計成可專一性的與 CD26 受體結合。線狀硼酸脯胺酸化合物的合成詳見 Bachovchin'493 案。藉由將線狀硼酸脯胺

五、發明說明（ ）

酸化合物置於中性 pH 值中(約 pH 6 至約 pH 8，更好是約 pH 6.5 至約 pH 7.5 間)一段足以使構型改變的時間，使線狀硼酸脯胺酸化合物轉變為環硼酸脯胺酸化合物。相反的，在酸性情況下，環狀化合物會轉變成線形化合物。一般相信，環狀及線狀化合物均具生物活性(與 CD26 受體結合)，不見得一定需要變成線形才具生物活性或結合活性。因此，可在毋需先誘發構型改變的情況下來施用環狀化合物。

一般係採胜肽直接連接來製備線狀硼酸脯胺酸化合物。本發明所用之胜肽直接連接法乃眾所周知的。採用該法的書包括，但不限於，如 P.D. Bailey, An Introduction to Peptide Chemistry, Ed.: John Wiley & Sons, 1990; Miklos Bodansky, Peptide Chemistry: A Practical Textbook, Ed.: Springer-Verlag, 1988; Miklos Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, "Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry," Volume 16, Ed.: Springer-Verlag, 1984; and Miklos Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, "Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry," Volume 21, Ed.: Springer-Verlag, 1984.

可以 WO98/00439 中所教導之 H-硼酸脯胺酸來開始合成。使用 H-硼酸脯胺酸僅是為闡述之用，本發明之範疇並不因此受到限制。

依據 WO98/00439 之教導，H-硼酸脯胺酸係依前述已知之合成途徑來製備(G.R. Flentke, et al., "Inhibition of

五、發明說明 ()

dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function”, PNAS (USA) 88, 1556-1559 (1991); 同時也詳述於美國專利案第 5,462,928 中)。或者，依一新程序來製備 H-硼酸脯胺酸(Kelly, T.A., et al., “The efficient synthesis and simple resolution of a proline boronate ester suitable for enzyme inhibition studies”, Tetrahedron 49, 1009-1016 (1993))。兩種合成途徑均可產生互為消旋物之 H-硼酸脯胺酸滌烷二醇。

依據 WO98/00439 之教導，Z-賴胺酸-硼酸脯胺酸之純 L、L 及 L、D 型之非鏡像立體異構物之製備係先經結晶將光學活性基團保護起來而將 H-硼酸脯胺酸消旋物加以分開，接著再將純 L-硼酸脯胺酸及 D-硼酸脯胺酸連接在純的賴胺酸異構物上(參見美國專利案第 5,462,928)。或者，賴胺酸-硼酸脯胺酸之純 L、L 及 L、D 型之非鏡像立體異構物之高光學活性製備係以 L-賴胺酸連接 H-硼酸脯胺酸消旋物，並將所得 Z-賴胺酸-硼酸脯胺酸之非鏡像立體異構物以前述將脯胺酸-硼酸脯胺酸分開之逆相 HPLC 分開成其 L、D 及 L、L 型非鏡像立體異構物來進行製備(W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin, “Seperation of L-Pro-DL-boroPro into Its Component Diastereomers and Kinetic Analysis of Their Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV. A New Method for the Analysis of Slow, Tight-Binding Inhibition”, Biochemistry 32, 8723-8731 (1993))。實施例 7 提供了可獲得本發明化合物之

五、發明說明 ()

一明確的流程。

實施例 2 環化反應

能抑制水溶性 CD26(DP IV)之活性(開鏈)及非活性(環狀)單元化合物之鑑別

該抑制劑無論在那一種 pH 值之水溶液中，均以兩種構型之平衡混合物存在：一為抑制性(具活性)的開鏈結構(線形硼酸脯胺酸化合物)，及另一非抑制性(不具活性)的環形結構(環硼酸脯胺酸化合物)。參見圖 3，該圖顯示 Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑(Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑之構型平衡物)之開鏈及環形結構。該開鏈、具活性之抑制劑較喜在低 pH 值的環境，而該環形結構則較喜在中性 pH 值的環境。該反應乃完全可逆：在低 pH 值的環境下，主要物種為開鏈化合物。由開鏈轉至環狀的反應涉及脯胺酸之順反異構物間的轉變及一新的 N-B 鍵之形成。該環狀結構為一二酮六氫吡咩之硼酸類似物，該物乃是胜肽化學中常見的一種產物。環化可釋出一當量的 H^+ ，因此可解釋為什麼環化反應需要鹼，而開鏈反應則需要酸。環狀結構在高 pH 值的水溶液下相當安定。

長期在高 pH 值的環境下進行培育，從未使 DPIV 對所檢測之任一 Xaa-硼酸脯胺酸之抑制性活性消失。此乃是該活性抑制劑係與其非抑制性物種間處於一種構型平衡、而非進行了一不可逆的去活化反應之首要證據。由環狀結構重新生成開鏈結構之半生期相當低。因此，可結論在水溶

五、發明說明()

液中喪失抑制活性係由於與 pH 值相關之構型平衡所致、而非降解反應之故。

任一 Xaa-硼酸脯胺酸抑制劑之抑制活性都絕對不會低到零的程度，即使經過長期培育也一樣；加上環狀至開鏈結構之可逆反應，這些事實顯示應可藉由測定平衡時之表面 K_i 值(apparent K_i)並與實際 K_i 值比較而得到構型平衡時之平衡常數。已知[環形]:[線形]之比例在中性 pH 值下，對脯胺酸-硼酸脯胺酸而言是 156:1；而對纈胺酸-硼酸脯胺酸而言則是 1130:1(W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin, Separation of L-Pro-DL-boroPro into Its Component Diastereomers and Kinetic Analysis of Their Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV. A New Method for the Analysis of Slow, Tight-Binding Inhibition, *Biochemistry* 32, 8723-8731 (1993))。此表示有低於 1%之脯胺酸-硼酸脯胺酸、及低於 0.1%之纈胺酸-硼酸脯胺酸在中性 pH 值下、會以抑制性的開鏈結構存在。但是，在這些情況下，這些抑制劑分別表現的有如其 K_i 值為 2.5 nM 及 1.8 nM。此”完全去活化”物種之表面 K_i 值仍然較目前其他已被報導過的 DP IV 抑制劑來得好(~1000 倍)。

本發明者相信本發明環狀化合物能與 CD26 進行專一性的結合。因此，本發明者預測在口服本發明環狀化合物後，亦即在體內(在胃酸的影響下)讓構型變成線形，本發明環狀化合物之生物功能將會顯著的增加(約 100-1000 倍)。因此，如果線形結構是必需的，其可於體內完成，且

五、發明說明 ()

可於循環系統中產生具療效濃度之物種，因此一般相信本發明化合物之生物活性將會增加約 100-1000 倍。此外，一般相信本發明環硼酸脯胺酸化合物之冷凍乾燥及固體形式可延長保存期限，因此對本發明化合物知應用有貢獻。依上述所製備之每一種化合物可以 HPLC 純化並以 NMR 光譜鑑別，胺基酸組成物或質譜儀都是必需的。

藉由調整 pH 值至酸性 pH 值(pH 值範圍：1-3)可將本發明環狀化合物轉變成線形，且其線形硼酸脯胺酸化合物抑制 CD26 蛋白酶之強度可以傳統酵素分析(範例詳述於下)來進行測定。此外，本發明化合物調控免疫系統的影響可藉由習知技藝人士熟知之動物模型體內試驗及細胞培育試管內試驗來預測該化合物的體內活性。

實施例 3 功能活性評估

本發明化合物至少具有下列性質：(i)結合位置為 DP IV 之活化位置；及(ii)表現出可跨越物種之專一性。

用來評估功能性的試驗包括：DP IV(亦指"DPPIV")活性，口服生物可利用性及嗜中性白血球細胞增生分析，均詳述如下。在進行活性分析前可將環狀化合物轉變為線形或無需轉變過程直接進行分析。

實施例 4 標準 CD26(DP IV)活性之測定

可於本發明化合物上執行測定 CD26(DP IV)活性之分析試驗。測量小胜肽抑制劑與 CD26 或 DP IV，及 CD26 與

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

諸如 HIV Tat 蛋白質類之大配體間反應之定性方法已被開發出來(W.G. Gutheil and W.W. Bachovchin, Separation of L-Pro-DL-boroPro into Its Component Diastereomers and Kinetic Analysis of Their Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV. A New Method for the Analysis of Slow, Tight-Binding Inhibition, *Biochemistry* 32, 8723-8731 (1993); Gutheil, W.G, and W. B. W. Kinsq, A Matlab Program for Fitting Kinetics Data with Numerically Integrated Rate Equations and Its Application to the Analysis of Slow, Tight-Binding Inhibition, *Analytical Biochemistry* 223, 13-20 (1994); Gutheil, W.G., et al., HIV-1 Tat Binds to DP IV (CD26): A possible Mechanism for Tat's Immunosuppressive Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6594-6598 (1994))。這些方法中都使用了丙胺酸-脯胺酸-硝化苯甲醯苯胺(AppNA)這種有色的受質，及丙胺酸-脯胺酸-7-胺基-4-三氟甲基香豆素(AP-AFC)這種螢光受質。AppNA 及 AP-AFC 在市面上均有販售(即酵素系統公司，Dublin, CA)。

實施例 5 口服生物可利用性之測定

此試驗的數據示於圖 1 中。

將各種 PT-100 樣品以 0.2 毫升溶於 0.9%生理食鹽水之溶液以如第 1 圖 X 軸所示劑量經口導管倒入 BALB/c 老鼠體內。兩小時後由每隻老鼠尾部抽取血液樣品，並以螢光分析測定每一樣品中 DPPIV 活性。數據以相對於未接受化

五、發明說明()

合物處理之 0.2 毫升生理食鹽水控制組，所收集血清樣品能抑制 DPPIV 活性之百分比顯示於第 1 圖之 Y 軸上。所示每一數據點均為三隻動物之樣品平均值及其標準偏差。

實施例 6 刺激嗜中性白血球細胞增生

此試驗的數據示於圖 2 中。

6-8 週大之 BALB/c 雌鼠於第 0 天，由腹膜中注射每公斤體重 220 毫克之環磷醯胺。正常控制組則只接受了水的注射。由第 3 天開始，並持續至第 7 天，每天兩次經口導管餵食每次每隻老鼠 $2\mu\text{g}$ 巰胺酸-硼酸脯胺酸(VBP)。所用不同形式之 VBP 為：HCl=線形，HCl 鹽；環狀=自由鹼，無鹽；及 MeSO_4 =線形，甲基磺酸鹽。所用不同形式之 VBP 係以 0.1N HCl 配製分裝成小管並冷凍儲存於 -20°C 下。於第 3 天將每一種形式之分裝溶液分別解凍一瓶，並於整個劑量持續時間將解凍後液體保持於 4°C 下。正常生理食鹽水控制組在同樣劑量處理期間則只接受生理食鹽水處理。實驗中每一形式 VBP 之每一劑量及控制組均採取四重複。於第 7 天，由老鼠尾部採集血液樣品並置於內含 EDTA 的微量管中。數據為絕對嗜中性細胞之平均值($\pm$ 標準偏差)，其係由不同周邊血液抹片經 Wright Giemsa 染色後計數而得之數值，白血球總數則是以 0.5%醋酸將紅血球溶解後以細胞計數器計算而得之數值。

實施例 7 明確的合成流程

五、發明說明 ()

此實施例之反應流程示於圖 5 中。

實施例 7A 所建議之硼酸脯胺酸合成路徑

此流程之反應程序示於圖 5 中，其中反應試劑及條件如下：i. 二-三級丁基二碳酸鹽，二氯甲烷；ii. S-丁基鋰四甲乙基亞乙二胺；iii. 三烷基硼酸鹽(烷基=甲基、乙基、或丁基)，醚；iv. 稀釋之氯酸水溶液；v. 蒎烷二醇，醚；vi. 無水氫氯酸，乙酸乙酯；vii. 再結晶。

參考文獻：

S.J. Couttes et al., *J. Med. Chem.* 1996 39, 2087; Kelly et al., *Tetrahedron Letters* 1993 49, 1009; Beak et al., *Tetrahedron Letters* 1989 30, 1197; and F. R. Bean et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 1932 54,4415.

實施例 7B N-BOC-(S)-纈胺酸-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-蒎烷二醇酯, IP068

此流程之反應程序示於圖 6 中。

起始物，(1S,2S,3R,5S)-蒎烷二醇吡咯啉-2R*-硼酸酯氯化氫，之質量等於“A”。此流程之反應程序如下：

1. 充滿 CH_2Cl_2 (A x 20 ml/g)
2. 充滿 BOC-纈胺酸 (A x 0.761 g/g)
3. 冷卻至 $0-5^\circ\text{C}$
4. 充滿羥基苯基疊氮 (A x 0.473 g/g)
5. 充滿 EDCI (A x 0.874 g/g) FW=191.71 (EDCI 是 "1-(3-

五、發明說明 ()

二甲胺丙基)-3-乙碳二亞胺氯化氫“)

6.於 0-5°C 下攪拌 30 分鐘

7.充滿(1S,2S,3R,5S)-羧烷二醇吡咯啉-2R*-硼酸酯氯化氫(量=A)

8.充滿 4-甲基嗎啉(A x 0.722 ml/g)

9.讓其緩慢回溫至室溫

10.隔夜攪拌

11.水洗(A x 9.5 ml/g)

12.以 1M KH_2SO_4 清洗(A x 9.5 ml/g)

13.以飽和碳酸鈉溶液清洗(A x 9.5 ml/g)

14.以硫酸鎂乾燥

15.以矽膠過濾，並以 EtOAc 洗出(A x 0.1 L/g)

16.濃縮乾燥

17.理論值=Ax1.57g/g，期望值=理論值 x (95-98%)

所得產率：84%

實施例 7C $\text{H}_2\text{N}-(\text{S})$ -纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-羧烷二醇酯,氯化氫 IP069

此流程之反應程序示於圖 7 並如下示：

1.將燒瓶充滿 1M 溶於 Et_2O 之 HCl (A x 37.2 ml/g)

2.於溶液中通入 HCl 10 分鐘

3.冷卻至 0-5°C

4.充滿 BOC-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-羧烷二醇醚，IP068 (量=A)

五、發明說明（ ）

5.隔夜攪拌，讓混合物緩慢回溫至室溫

6.濃縮乾燥

7.理論值= $A \times 0.858$ g/g，期望值~100%

所得產率：106%

實施例 7D 環-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸，IP070

此流程之反應程序示於圖 8 並如下示：

1. 將燒瓶充滿 H_2N -(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-(1S,2S,3R,5S)-蒎烷二醇酯，氯化氫(量=A)
2. 充滿水($A \times 25$ ml/g)
3. 以 1N HCl 調整 pH 至 2(如果需要的話)
4. 充滿己烷($A \times 25$ ml/g)
5. 衝滿苯基硼酸($A \times 0.333$ g/g)
6. 劇烈攪拌
7. 30 分鐘後將己烷層傾出，並以新鮮己烷取代
8. 60 分鐘後再次以新鮮己烷取代
9. 90 分鐘後再次以新鮮己烷取代
10. 120 分鐘後再次以新鮮己烷取代
11. 隔夜攪拌
12. 分層
13. 將水層載入 Dowex 50-X2-100 離子交換樹脂管柱(H*型)中
14. 以水沖洗直到呈中性
15. 以 1：50 之 NH_4OH ： H_2O 沖洗

五、發明說明 ()

16.將適當分餾部分冷凍乾燥

17.理論值= $A \times 0.556$ g/g，期望值~ 90-95%

所得產率：83%

*TLC：1：50 之 NH_4OH ：MeOH，產物可於碘氣室中以肉眼進行觀察。

實施例 7E $\text{H}_2\text{N}-(\text{S})$ -纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸-OH，FP020

此流程之反應程序示於圖 9 並如下示：

1.於環-(S)-纈胺酸-(R)-硼酸脯胺酸，IP070 中注入 51.4 ml/g 之 0.1N HCl

2.攪拌 10 分鐘

3.將產物冷凍乾燥

理論值=IP070 克數 $\times 1.17$ g/g，期望值~ 100%

所得產率：106%

其他實施例見以下申請專利範圍。

本發明已藉實施例詳加描述，習知技藝人士應知在不悖離本發明精神範疇下，本發明可作許多修改或變化。此類修改、變化或等效替換均應仍視為落在本發明專利申請範圍內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

四、中文發明摘要（發明之名稱：

)

環硼酸脯氨酸化合物

所提供的乃是可以環狀或線狀形式與 CD26 結合之實質上純的環硼酸脯氨酸化合物之製備。亦提供了以該環狀化合物來刺激免疫細胞之活化和/或增生的方法，以使這些細胞數目能在體內達到一預設之正常值。同時亦提供了一較佳環狀化合物，纈氨酸-脯氨酸硼酸(ValboroPro)，之口服生物可利用性及活性之證據。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

英文發明摘要（發明之名稱：

)

CYCLIC BOROPROLINE COMPOUNDS

Substantially pure preparations of cyclic boroProline compounds that bind, in cyclic or linear form, to CD26 are provided. Methods for using the cyclic compounds to stimulate the activation and/or proliferation of immune cells to achieve preselected normal in vivo levels of these cells also are provided. Evidence of the oral bioavailability and activity of a preferred cyclic compound, valine-prolineboronic acid (ValboroPro), also is provided.

線

六、申請專利範圍

型胺基酸之胜肽。

5.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物係選自 L-X-S-硼酸脯胺酸及 L-X-R-硼酸脯胺酸所組成之族群中。

6.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物代表組成物重量之高於 90%。

7.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

8.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

9.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

10.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

11.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

12.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 10%。

13.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

14.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

15.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

六、申請專利範圍

16.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

17.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

18.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 5%。

19.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

20.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

21.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

22.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

23.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

24.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 1%。

25.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

26.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

27.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

28.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

29.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

30.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.5%。

31.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

32.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

33.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

34.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

35.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

36.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.1%。

37.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

38.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

39.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

六、申請專利範圍

40.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

41.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

42.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.05%。

43.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

44.如申請專利範圍第 2 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

45.如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

46.如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

47.如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

48.如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中該線狀硼酸脯胺酸化合物代表該組成物重量之低於 0.01%。

49.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物是纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物。

50.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物是纈胺酸-硼酸脯胺酸。

51.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 90%之 L-胺基酸且硼酸脯胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

酸係以 R 或 S 構型存在。

52.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 90%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

53.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 90%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

54.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 94%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

55.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 94%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

56.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 94%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

57.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 96%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

58.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 96%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

59. 如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 96%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

或 S 構型存在。

60.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 98%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

61.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 98%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

62.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 98%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

63.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

64.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

65.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

66.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99.5%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

67.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99.5%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以

六、申請專利範圍

R 或 S 構型存在。

68.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物含至少 99.5%之 L-胺基酸且硼酸脯胺酸係以 R 或 S 構型存在。

69.如申請專利範圍第 1-48 項中任一項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

70.如申請專利範圍第 49 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

71.如申請專利範圍第 50 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

72.如申請專利範圍第 51 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

73.如申請專利範圍第 52 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

74.如申請專利範圍第 53 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

75.如申請專利範圍第 54 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

76.如申請專利範圍第 55 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

77.如申請專利範圍第 56 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

78.如申請專利範圍第 57 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

六、申請專利範圍

79.如申請專利範圍第 58 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

80.如申請專利範圍第 59 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

81.如申請專利範圍第 60 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

82.如申請專利範圍第 61 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

83.如申請專利範圍第 62 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

84.如申請專利範圍第 63 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

85.如申請專利範圍第 64 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

86.如申請專利範圍第 65 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

87.如申請專利範圍第 66 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

88.如申請專利範圍第 67 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

89.如申請專利範圍第 68 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

90.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物是環狀的纈胺酸-硼酸脯胺酸。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

91.如申請專利範圍第 90 項之組成物，其中該碳-硼鍵係以 L 構型存在。

92.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物係被配製成口服施用。

93.如申請專利範圍第 1 或 92 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物是纈胺酸-硼酸脯胺酸化合物。

94.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物係被配製成非經腸道施用。

95.如申請專利範圍第 94 項之組成物，其中該組成物係被冷凍乾燥。

96.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物是用於刺激人類淋巴細胞或造血細胞之活化或增生，其中該淋巴細胞或造血細胞係與誘發活化或增生之濃度的化合物接觸。

97.如申請專利範圍第 96 項之組成物，其中該接觸步驟係藉由口服施用該化合物至需要該治療之人類患者中而達成，其中該患者係被診斷出具有特徵為淋巴細胞或造血細胞活化或濃度不足之病況。

98.如申請專利範圍第 96 項之組成物，其中該接觸步驟係藉由將該環硼酸脯胺酸化合物之冷凍乾燥組成物於具酸性之藥學上可接受的載體中重組，形成一重組酸性製劑，並將該重組製劑以非經腸道方式施用於患有淋巴細胞或造血細胞活化或濃度不足為特徵的病況之人類患者中。

99.如申請專利範圍第 97 或 98 項之組成物，其中該化

六、申請專利範圍

合物與能刺激該淋巴細胞或造血細胞活化或增生之第二種不同的藥劑一同施用。

100.如申請專利範圍第 98 項之組成物，其中該淋巴細胞與該化合物之接觸係於試管內（*in vitro*）進行。

101.如申請專利範圍第 100 項之組成物，其中該接觸步驟包括由個體中取得 T 細胞、骨髓細胞、幹細胞、基質細胞、或初期代細胞(early lineage progenitor cells)，讓該等分離出的細胞於活體外（*ex vivo*）與一能刺激細胞有效量之化合物接觸後，且將該等細胞重新引入個體內。

102.如申請專利範圍第 97 項之組成物，其中該病況為

- (a) HIV 感染；
- (b) 腫瘤，且該淋巴細胞為細胞溶解或助手 T 細胞；
- (c) 因化療或放射線治療所引起的副作用，該副作用之一為造血系統細胞不足所致結果，該造血系統細胞係選自衍生自淋巴系統、紅血球系統及骨髓系統之細胞所組成的族群中；
- (d) 腎衰竭導致造血細胞不足或造成免疫不全之骨髓疾病；
- (e) 自體免疫疾病；或
- (f) 因免疫系統細胞不足所致之免疫不全症狀。

103.一種製備如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物的方法，該方法包括：

將具有下式 I 結構的環硼酸脯胺酸化合物置於一藥學上可接受的載體中，

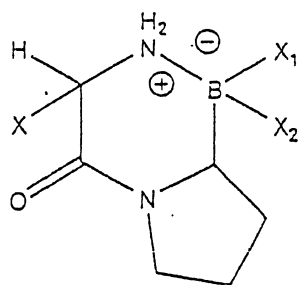
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍



其中每一 X_1 與 X_2 獨立為一羥基或是在生理 pH 值下、於水溶液中可被水解成羥基的基團；且 X 代表一可模擬能被後-脯胺基裂解酵素(post prolyl cleaving enzyme)所認得之受質位置之胺基酸或胜肽側鏈。

104.如申請專利範圍第 103 項之方法，其中該藥學上可接受的載體乃是適於口服施用。

105.如申請專利範圍第 104 項之方法，其進而包括將組成物配製成不含腸衣之藥錠或膠囊之步驟。

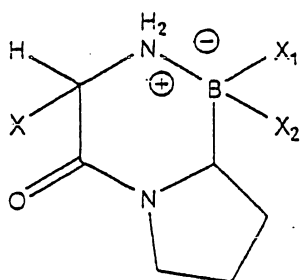
106.如申請專利範圍第 103 項之方法，其中藥學上可接受的載體乃是適於非經腸道施用。

107.如申請專利範圍第 106 項之方法，其進而包括將組成物冷凍乾燥以製成冷凍乾燥製劑之步驟。

108.如申請專利範圍第 107 項之方法，其進而包括將組成物於具酸性 pH 值之藥學上可接受的載體中重組形成一重組製劑的步驟。

109.一種刺激人類淋巴細胞或造血細胞活化或增生的方法，該方法包括於試管內 (*in vitro*) 讓該淋巴細胞或造血細胞與誘發活化或增生之濃度之具下式 I 結構的環硼酸脯胺酸化合物接觸，

六、申請專利範圍



其中每一 X_1 與 X_2 獨立為一羥基或是在生理 pH 值下、於水溶液中可被水解成羥基的基團；且 X 代表一可模擬能被後-脯胺基裂解酵素(post prolyl cleaving enzyme)所認得之受質位置之胺基酸或胜肽側鏈。

110. 如申請專利範圍第 109 項之方法，其中該接觸步驟之進行係藉由將該環硼酸脯胺酸化合物之冷凍乾燥組成物於酸性之藥學上可接受的載體中重組，形成一重組酸性製劑，並將該重組製劑與該淋巴細胞或造血細胞接觸。

111. 如申請專利範圍第 110 項之方法，其中該該淋巴細胞或造血細胞係由患有淋巴細胞活化或濃度不足或造血細胞活化或濃度不足為特徵的病況之人類患者中分離出。

112. 如申請專利範圍第 110 項之方法，其中該化合物係與能刺激該淋巴細胞或造血細胞活化或增生之第二種不同的藥劑併用。

113. 如申請專利範圍第 111 項之方法，其中係將分離自個體之 T 細胞、骨髓細胞、幹細胞、基質細胞或初期代細胞(early lineage progenitor cells)，與一能刺激細胞有效量之化合物於活體外 (*ex vivo*) 接觸。

114. 如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該病況為

六、申請專利範圍

HIV 感染。

115.如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該病況為腫瘤，且該淋巴細胞為細胞溶解或助手 T 細胞。

116.如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該病況為因化療或放射線治療所引起的副作用，該副作用之一為造血系統細胞不足所致結果，該造血系統細胞係選自衍生自淋巴系統、紅血球系統及骨髓系統之細胞所組成的族群中。

117.如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該病況是腎衰竭導致造血細胞不足或造成免疫不全之骨髓疾病。

118.如申請專利範圍第 111 項之方法，其中該病況是自體免疫疾病。

119.如申請專利範圍第 118 項之方法，其中該病況是因免疫系統細胞不足所致之免疫不全症狀。

裝

訂

線

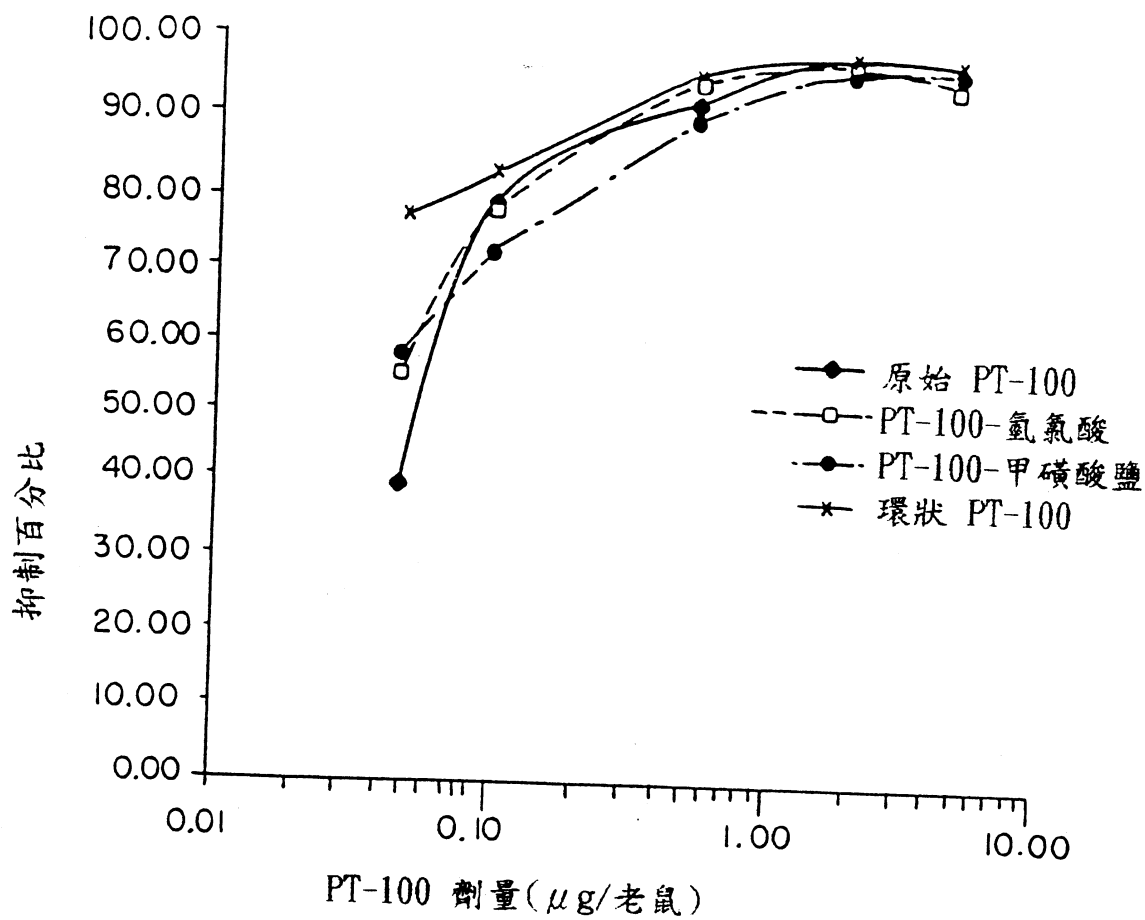


圖 1

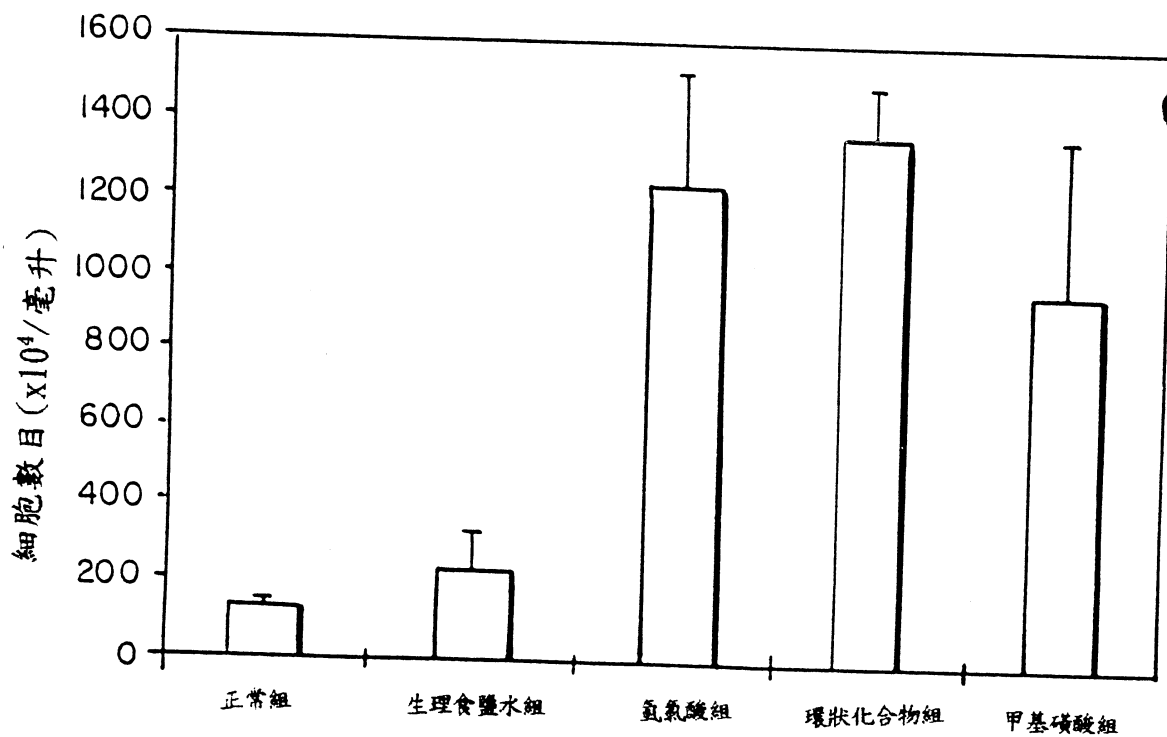
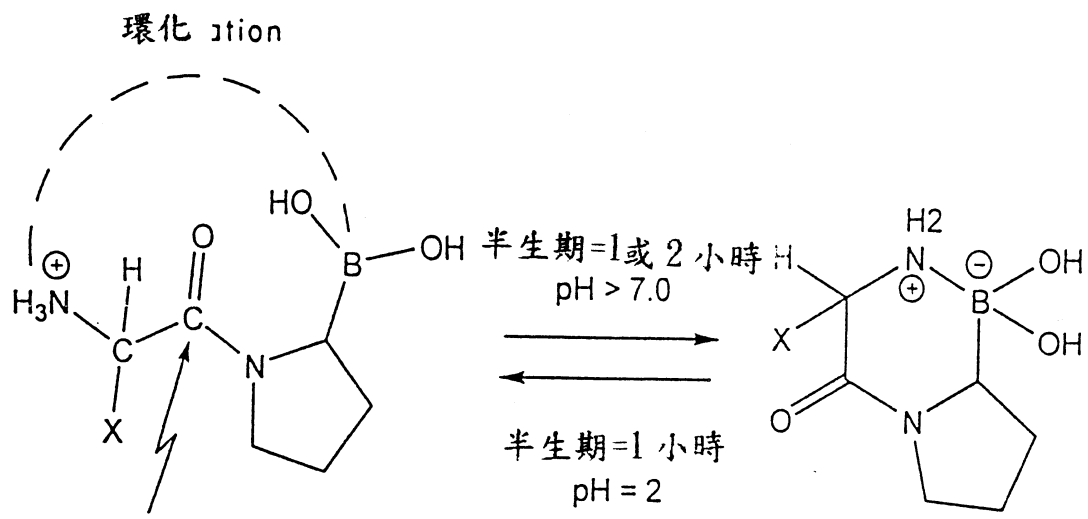


圖 2

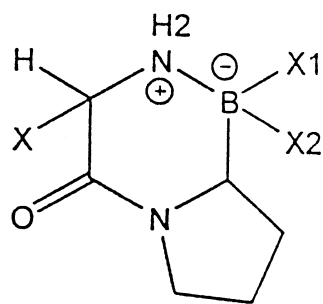


環化反應須順式組態

開鏈形式(反式)

環形(順式)

圖 3



環形(順式)

式 I

圖 4

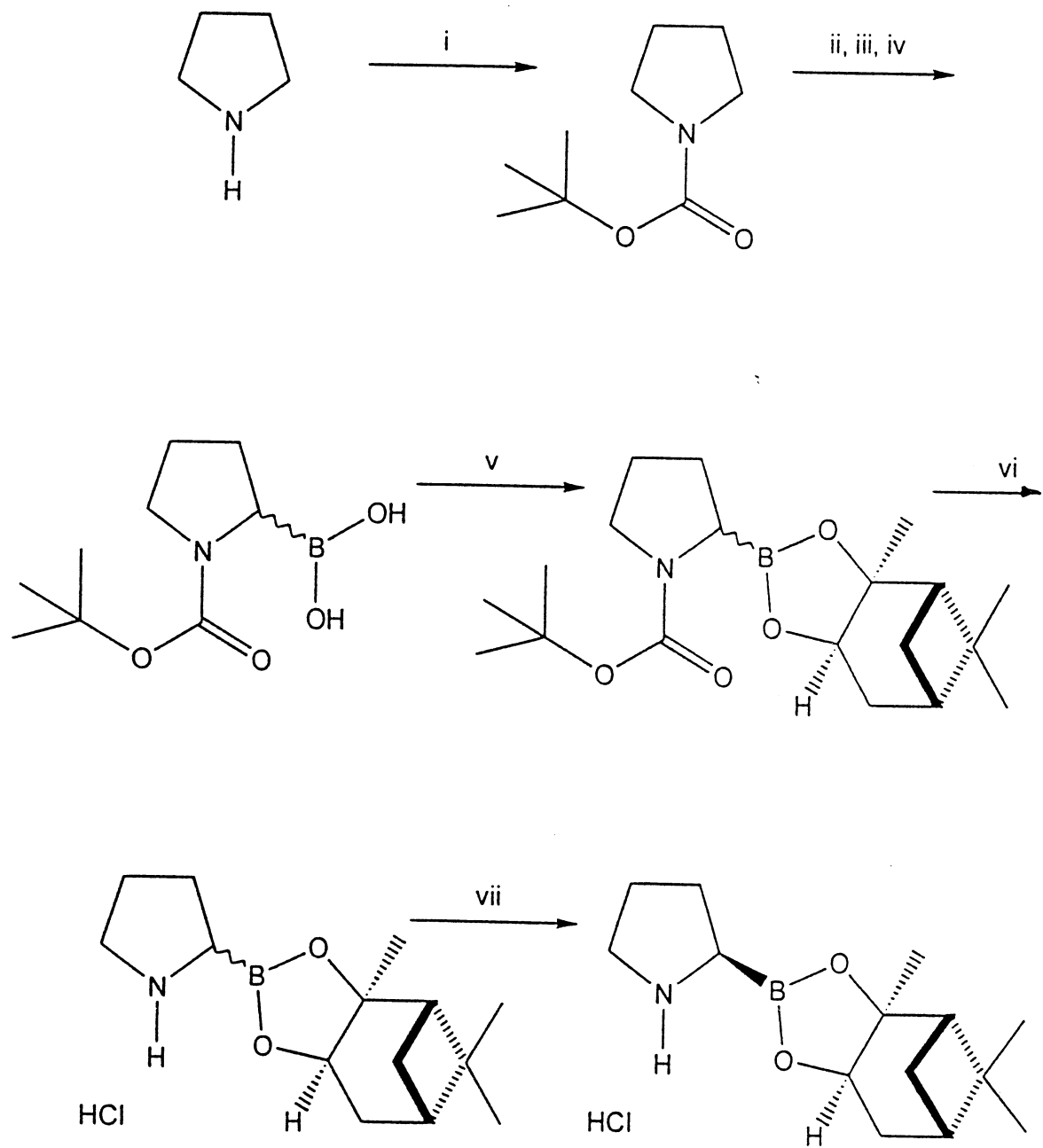


图 5

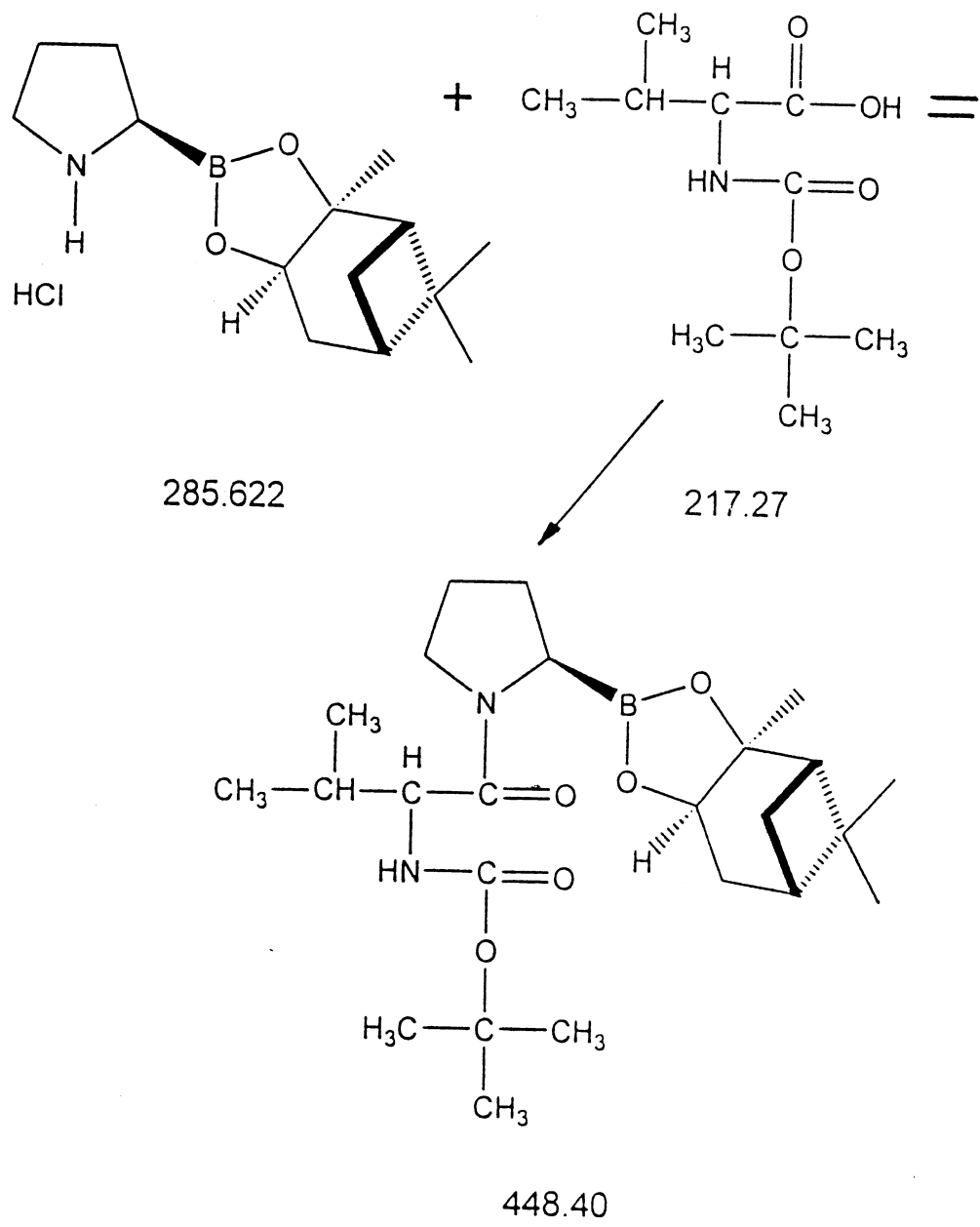


圖 6

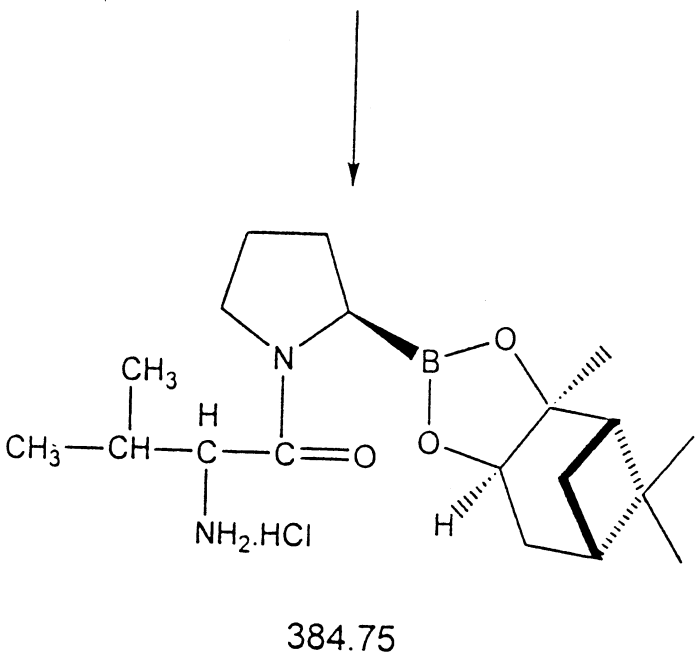
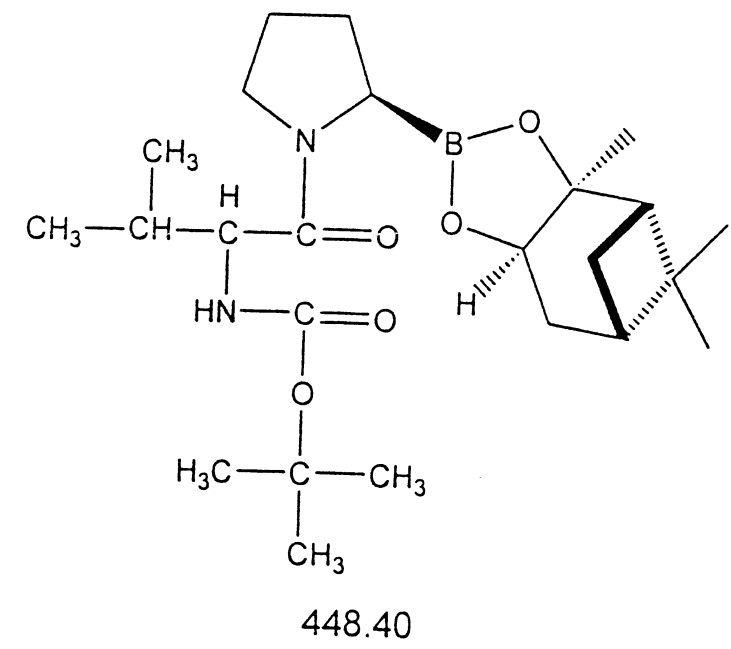


圖 7

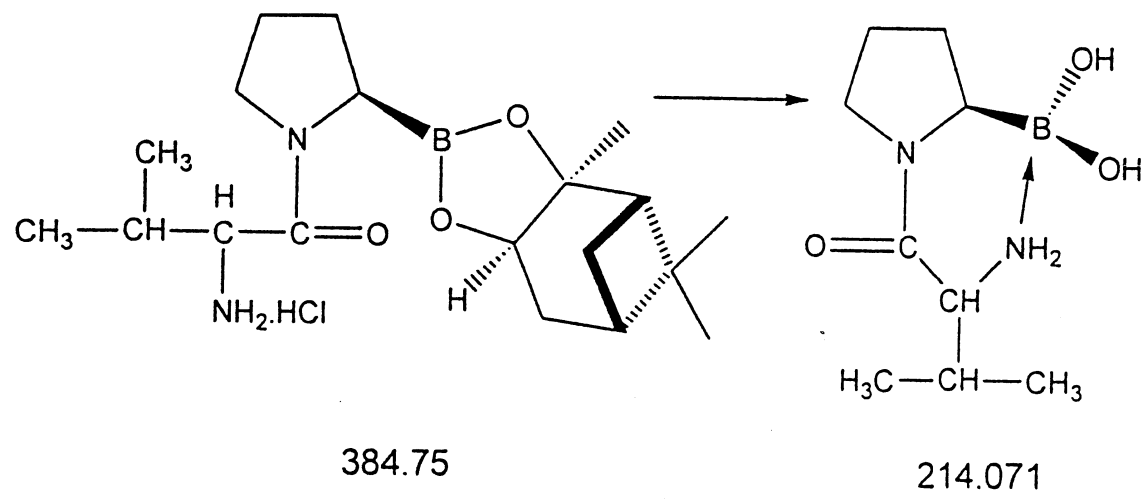


圖 8

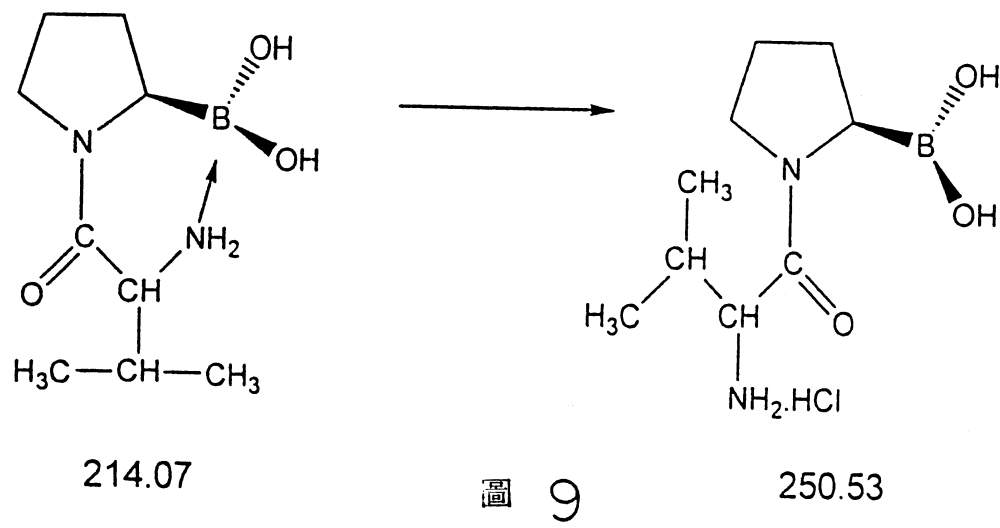


圖 9

公告本

申請日期	88.5.28
案號	88108803
類別	C07F 5/2, A61K 31/69

92.3.11	修正 A4 充
---------	---------------

(本)

(以上各欄由本局填註)

575574

發明專利說明書

一、發明 名稱	中文	環硼酸脯胺酸化合物
	英文	CYCLIC BOROPROLINE COMPOUNDS
二、發明 創作人	姓名	巴巴拉 P. 沃納
	國籍	美國
	住、居所	美國.麻州 02193.衛斯坦.箭頭路 64 號
三、申請人	姓名 (名稱)	尖端治療公司
	國籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國.麻州 02111.波士頓.尼爾蘭德街 75 號
	代表人 姓名	巴巴拉 P. 沃納

裝

訂

線

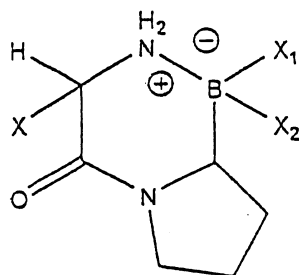
公告本

修正
補充

六、申請專利範圍

1.一種調控免疫系統功能之藥學組成物，其包括：

(1)一種實質上純的環硼酸脯胺酸化合物之製劑，該化合物具有式 I 之結構，



其中每一 X_1 與 X_2 獨立為一羥基或是在生理 pH 值下、於水溶液中可被水解成羥基的基團；且 X 代表一可模擬能被後-脯胺基裂解酵素(post prolyl cleaving enzyme)所認得之受質位置之胺基酸或胜肽側鏈；及

(2)一種藥學上可接受的載體。

2.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物係選自 L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸、L-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸、D-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸、及 D-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸所組成之族群中。

3.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物係選自 L-纈胺酸-S-硼酸脯胺酸及 L-纈胺酸-R-硼酸脯胺酸所組成之族群中。

4.如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該環硼酸脯胺酸化合物係選自 L-X-S-硼酸脯胺酸、L-X-R-硼酸脯胺酸、D-X-S-硼酸脯胺酸、及 D-X-R-硼酸脯胺酸所組成之族群中，其中 L-X 是一以 L 構型存在之胺基酸或一內含 L