



(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 201505630 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：103106905

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl. : A61K31/451 (2006.01)

C07D211/76 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/02/28 美國

61/770,901

(71)申請人：安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：柳耀习 REW, YOSUP (KR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：0 共 71 頁

(54)名稱

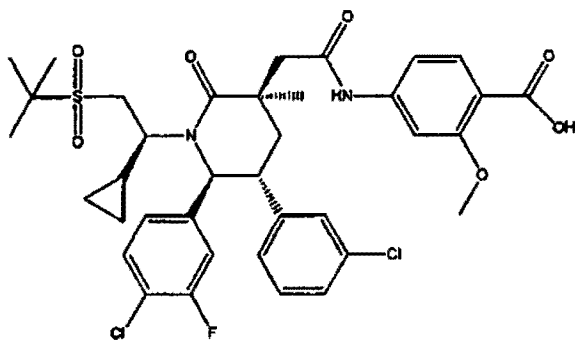
用於治療癌症之苯甲酸衍生物MDM2抑制劑

A BENZOIC ACID DERIVATIVE MDM2 INHIBITOR FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57)摘要

本發明提供一種MDM2抑制劑化合物或其醫藥上可接受之鹽，該化合物可用作尤其用於治療癌症之治療劑。本發明亦係關於含有該MDM2抑制劑之醫藥組合物。

The present invention provides a MDM2 inhibitor compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, which compound is useful as a therapeutic agent, particularly for the treatment of cancers. The present invention also relates to pharmaceutical compositions that contains the MDM2 inhibitor.



201505630

發明摘要

※ 申請案號：103106905

※ 申請日：103.2.27

※IPC 分類：A61K 31/451 (2006.01)

C07D 211/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

用於治療癌症之苯甲酸衍生物MDM2抑制劑

A BENZOIC ACID DERIVATIVE MDM2 INHIBITOR FOR THE
TREATMENT OF CANCER

【中文】

本發明提供一種MDM2抑制劑化合物或其醫藥上可接受之鹽，該化合物可用作尤其用於治療癌症之治療劑。本發明亦係關於含有該MDM2抑制劑之醫藥組合物。

【英文】

The present invention provides a MDM2 inhibitor compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, which compound is useful as a therapeutic agent, particularly for the treatment of cancers. The present invention also relates to pharmaceutical compositions that contains the MDM2 inhibitor.

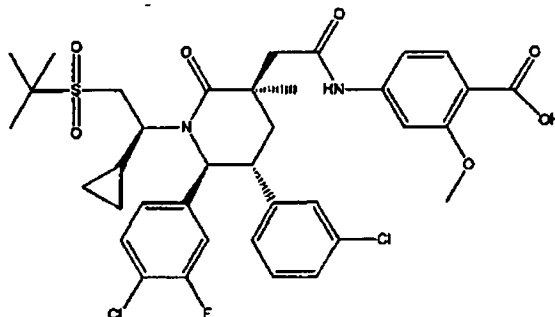
【代表圖】

【本案指定代表圖】：(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於治療癌症之苯甲酸衍生物MDM2抑制劑

A BENZOIC ACID DERIVATIVE MDM2 INHIBITOR FOR THE
TREATMENT OF CANCER

【技術領域】

本發明係關於一種MDM2抑制劑，其可用作尤其用於治療癌症之治療劑。本發明亦係關於含有MDM2抑制劑之醫藥組合物。

【先前技術】

p53係腫瘤阻抑因子及轉錄因子，其藉由活化涉及細胞週期停滯、細胞凋亡、衰老及DNA修復之許多基因之轉錄來對細胞應力作出反應。與正常細胞(其很少引起p53活化)不同，腫瘤細胞處於來自各種損傷(包含缺氧及促凋亡癌基因活化)之持久性細胞應力下。因此，鈍化腫瘤中之p53路徑具有極大選擇性優點，且已提出消除p53功能可能為腫瘤存活之先決條件。為證實此觀點，三組研究者使用小鼠模型顯示不存在p53功能係維持確立腫瘤之持續需求。在研究者恢復具有失活p53之腫瘤之p53功能時，腫瘤消退。

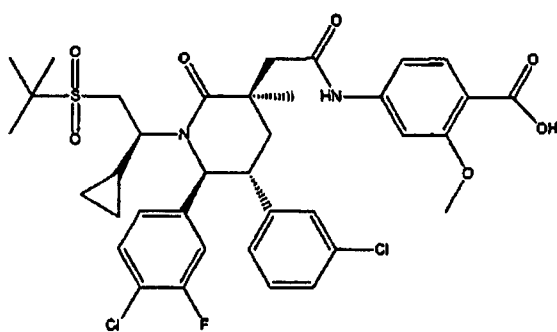
在50%之實體腫瘤及10%之液體腫瘤中，p53因突變及/或損失而失活。p53路徑中之其他關鍵成員在癌症中亦在遺傳上或表觀遺傳上有所改變。MDM2 (致癌蛋白)抑制p53功能，且其以據報導高達10%之發生率由基因擴增活化。另外，MDM2由另一腫瘤阻抑因子p14ARF抑制。人們已提出，p53下游之改變可導致至少部分地鈍化p53^{WT}腫瘤中之p53路徑(p53野生型)。為證實此觀念，一些p53^{WT}腫瘤似乎展現減小之細胞凋亡能力，但其發生細胞週期停滯之能力保持完整。一種癌症

治療策略涉及使用結合MDM2且中和其與p53之相互作用之小分子。MDM2藉由以下三種機制抑制p53活性：1)用作E3泛素連接酶以促進p53降解；2)結合並阻斷p53轉錄活化結構域；及3)將p53自細胞核輸出至細胞質。藉由中和MDM2-p53相互作用來阻斷所有三種該等機制。特定而言，可將此治療策略應用至p53^{WT}腫瘤，且使用小分子MDM2抑制劑之研究已在活體外及活體內良好地減小腫瘤生長。另外，在患有p53鈍化腫瘤之患者中，在正常組織中藉由MDM2抑制來穩定野生型p53可使得選擇性保護正常組織免受有絲分裂毒影響。

本發明係關於能夠抑制p53與MDM2之間之相互作用並活化p53下游效應基因之化合物。因此，本發明化合物可用於治療癌症、細菌感染、病毒感染、潰瘍及發炎。特定而言，本發明化合物可用於治療實體腫瘤，例如：乳房腫瘤、結腸腫瘤、肺腫瘤及前列腺腫瘤；及液體腫瘤，例如淋巴瘤及白血病。如本文中所使用，MDM2意指人類MDM2蛋白且p53意指人類p53蛋白。應注意，人類MDM2亦可稱為HDM2或hMDM2。

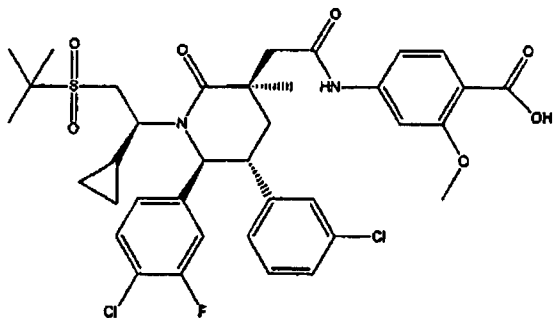
【發明內容】

在實施例1中，本發明提供以下化合物：



或其醫藥上可接受之鹽。

在實施例2中，本發明提供以下化合物：



在實施例3中，本發明提供醫藥組合物，其包括如實施例1或2中任一項之化合物及醫藥上可接受之賦形劑。

在實施例4中，本發明提供治療有需要之個體之癌症之方法，該等方法包括向個體投與有效劑量之如實施例1至2中任一項之化合物。

在實施例5中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係選自膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、食管癌、膽囊癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、前列腺癌、皮膚癌、急性淋巴細胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma)、非何傑金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)、毛細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤 (Burkett's lymphoma)、急性或慢性骨髓性白血病、黑素瘤、子宮內膜癌、頭頸癌、膠質母細胞瘤或骨肉瘤。

在實施例6中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係膀胱癌。

在實施例7中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係乳房癌。

在實施例8中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係結腸癌。

在實施例9中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係直腸

癌。

在實施例10中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係腎癌。

在實施例11中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係肝癌。

在實施例12中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係小細胞肺癌。

在實施例13中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係非小細胞肺癌。

在實施例14中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係食管癌。

在實施例15中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係膽囊癌。

在實施例16中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係卵巢癌。

在實施例17中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係胰臟癌。

在實施例18中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係胃癌。

在實施例19中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係子宮頸癌。

在實施例20中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係甲狀腺癌。

在實施例21中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係前列腺癌。

在實施例22中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係皮膚癌。

在實施例23中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係急性淋巴細胞白血病。

在實施例24中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係慢性骨髓性白血病。

在實施例25中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係急性淋巴母細胞白血病。

在實施例26中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係B細胞淋巴瘤。

在實施例27中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係T細胞淋巴瘤。

在實施例28中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係何傑金氏淋巴瘤。

在實施例29中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係非何傑金氏淋巴瘤。

在實施例30中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係毛細胞淋巴瘤。

在實施例31中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係伯基特氏淋巴瘤。

在實施例32中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係急性骨髓性白血病。

在實施例33中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係慢性骨髓性白血病。

在實施例34中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係黑色素瘤。

在實施例35中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係子宮內膜癌。

在實施例36中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係頭頸癌。

在實施例37中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係膠質母細胞瘤。

在實施例38中，本發明提供實施例4之方法，其中癌症係骨肉瘤。

在實施例39中，本發明提供實施例4或6至38至任一項之方法，其中癌症鑑別為p53野生型。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

本發明提供MDM2抑制劑，其可用作尤其用於治療癌症之治療劑。本發明亦係關於含有MDM2抑制劑之醫藥組合物。

符號「—」代表共價鍵且亦可用於基團中以指示至另一基團之附接點。在化學結構中，符號通常用於代表分子中之甲基。

術語「包括」意欲具有開放端，包含所指示組份但不排除其他要素。

術語「治療有效量」意指如下化合物量：其改善、減弱或消除之特定疾病或病狀一或多種症狀，或預防或延遲特定疾病或病狀之一或多種症狀之發作。

術語「患者」及「個體」可互換使用，且意指動物，例如狗、貓、牛、馬、綿羊及人類。特定患者係哺乳動物。術語患者包含男性及女性。

術語「醫藥上可接受」意指所提及物質(例如本發明化合物或化合物之鹽或含有化合物或特定賦形劑之調配物)適於投與患者。

術語「治療(treating、treat或treatment)」及諸如此類包含預防性(preventative、prophylactic)及姑息性治療。

術語「賦形劑」意指除活性醫藥成份(API)外之任一醫藥上可接

受之添加劑、載劑、稀釋劑、佐劑或其他成份，其通常包含以用於調配物中及/或投與患者。

將本發明化合物以治療有效量投與患者。化合物可單獨投與或作為醫藥上可接受之組合物或調配物之一部分投與。此外，化合物或組合物可同時(例如藉由濃注)、多次(例如藉由一系列錠劑)投與，或經一定時間段(例如使用經皮遞送)實質上均勻遞送。亦注意，化合物劑量可隨時間而有所變化。

此外，本發明化合物可單獨投與或與其他醫藥活性化合物組合投與。其他醫藥活性化合物可意欲與本發明化合物治療相同疾病或病狀或不同疾病或病狀。若患者欲接受或正接受多種醫藥活性化合物，則該等化合物可同時或依序投與。舉例而言，在錠劑情形下，活性化合物可發現於一種錠劑或單獨錠劑中，其可同時或以任一順序依序投與。此外，應認識到，組合物可具有不同形式。舉例而言，一或多種化合物可經由錠劑遞送，而另一化合物經由注射或以糖漿形式經口投與。涵蓋所有組合、遞送方法及投與序列。

術語「癌症」意指哺乳動物中特徵在於失調細胞生長之生理學病狀。一般種類之癌症包含癌瘤、淋巴瘤、肉瘤及母細胞瘤。

可使用本發明化合物來治療癌症。治療癌症之方法包括向有需要之患者投與治療有效量之化合物或其醫藥上可接受之鹽。

可使用本發明化合物來治療腫瘤。治療腫瘤之方法包括向有需要之患者投與治療有效量之化合物或其醫藥上可接受之鹽。

本發明亦係關於本發明化合物用以製造用於治療諸如癌症等病狀之醫藥之用途。

可使用本發明化合物治療之癌症包含但不限於癌瘤，例如膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、腎癌、肝癌、肺癌(小細胞肺癌及非小細胞肺癌)、食管癌、膽囊癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、子宮頸癌、

甲狀腺癌、前列腺癌及皮膚癌(包含鱗狀細胞癌瘤)；淋巴譜系之血液腫瘤(包含白血病、急性淋巴細胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤、非何傑金氏淋巴瘤、毛細胞淋巴瘤及伯基特氏淋巴瘤)；骨髓譜系之血液腫瘤(包含急性及慢性骨髓性白血病、骨髓增生異常症候群及前髓細胞性白血病)；間充質來源之腫瘤(包含纖維肉瘤及橫紋肌肉瘤及其他肉瘤(例如軟組織及骨肉瘤))；中樞及周邊神經系統之腫瘤(包含星形細胞瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤)；及其他腫瘤(包含黑素瘤、精原細胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、著色性乾皮症、角化棘皮瘤、甲狀腺濾泡癌及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma))。可使用本發明化合物治療之其他癌症包含子宮內膜癌、頭頸癌、膠質母細胞瘤、惡性腹水及血液癌症。

可藉由本發明化合物治療之特定癌症包含軟組織肉瘤、骨癌(例如骨肉瘤)、乳房腫瘤、膀胱癌、李-佛美尼症候群(Li-Fraumeni syndrome)、腦腫瘤、橫紋肌肉瘤、腎上腺皮質癌瘤、結腸直腸癌、非小細胞肺癌及急性骨髓性白血病(AML)。

在係關於癌症治療之本發明之一特定實施例中，癌症鑑別為p53野生型(p53^{WT})。在另一特定實施例中，癌症鑑別為p53^{WT}及CDKN2A突變體。在另一態樣中，本發明提供確定應投與本發明化合物之患者之診斷方法。舉例而言，可獲取患者癌細胞之試樣並分析以測定癌細胞關於p53及/或CDKN2A之狀態。在一態樣中，較患有關於p53突變之癌症之患者中，選擇患有p53^{WT}癌症之患者用於治療。在另一態樣中，選擇患有係p53^{WT}且具有突變體CDKN2A蛋白之癌症之患者而非不具有該等特性之患者。彼等熟習此項技術者熟知分析用癌細胞之獲取。術語「p53^{WT}」意指由基因組DNA序列第NC_000017號形式9(7512445..7531642)(GenBank)編碼之蛋白質；由cDNA序列第

NM_000546 號 (GenBank) 編碼之蛋白質；或具有 GenBank 序列第 NP000537.3 號之蛋白質。術語「CDNK2A 突變體」意指並非野生型之 CDNK2A 蛋白。術語「CDKN2A 野生型」意指由基因組 DNA 序列第 9:21957751-21984490 號 (Ensembl ID) 編碼之蛋白質；由 cDNA 序列第 NM_000077 號 (GenBank) 或第 NM_058195 9 號 (GenBank) 編碼之蛋白質；或具有 GenBank 序列第 NP_000068 號或第 NP_478102 號之蛋白質。

本發明化合物亦可用於治療過度增殖病症，例如甲狀腺增生(尤其格雷夫斯氏病(Grave's disease))及囊腫(例如卵巢間質血管過多，此係多囊卵巢症候群(斯坦-李文瑟爾症候群(Stein- Leventhal syndrome))之特性)。

本發明化合物亦可用於治療下列疾病或病狀：哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、氣腫、牛皮癬、接觸性皮炎、結膜炎、過敏性鼻炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、多發性硬化、類風濕性關節炎、發炎性腸病、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、動脈粥樣硬化及亨庭頓氏病(Huntington's disease)。

本發明化合物亦可用於治療發炎性疾病、缺氧、潰瘍、病毒感染、細菌感染及細菌性敗血症。

本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽亦可與一或多種其他醫藥活性化合物/藥劑組合投與。在一特定實施例中，其他醫藥活性劑係可用於治療癌症之藥劑。舉例而言，其他醫藥活性劑可選自抗腫瘤劑、抗血管生成、化學治療劑及肽癌症治療劑。在又一實施例中，抗腫瘤劑係選自抗生素型藥劑、烷基化劑、抗代謝劑、激素藥劑、免疫學藥劑、干擾素型藥劑、激酶抑制劑、混雜藥劑及其組合。應注意，其他醫藥活性化合物/藥劑可為傳統小有機化學分子或可為大分子(例

如蛋白質、抗體、肽體、DNA、RNA或該等大分子之片段)。

可用於治療癌症且可與一或多種本發明化合物組合使用之具體醫藥活性劑之實例包含：胺甲喋呤(methotrexate)、他莫昔芬(tamoxifen)、氟尿嘧啶(flourouracil)、5-氟尿嘧啶(5-flourouracil)、羥基脲(hydroxyurea)、巯基嘌呤(mercaptapurine)、順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、柔紅黴素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、依託泊苷(etoposide)、長春花鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、紫杉醇(pacitaxel)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、伊達比星(idarubicin)、放線菌素(dactinomycin)、伊馬替尼(imatinib)、吉西他濱(gemcitabine)、六甲嘧胺(altretamine)、天門冬醯胺酶(asparaginase)、博來黴素(bleomycin)、卡培他濱(capecitabine)、卡莫司汀(carmustine)、克拉帝沙 NaCl 水溶液(cladisat. aq. NaCl solution)、環磷醯胺(cyclophosphamine)、阿糖胞苷(cytarabine)、地卡拉嗪(decarazine)、多西他賽(docetaxel)、伊達比星(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、氟達拉濱(fludarabine)、絲裂黴素(mitosmycin)、米托杉(mitoxane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、拓撲替康(topotecan)、長春瑞濱(vinorelbine)、阿黴素(adriamycin)、米斯拉姆(mithram)、咪喹莫特(imiquimod)、阿倫珠單抗(alemtuzmab)、依西美坦(exemestane)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、阿紮胞苷(azacitidine)、克羅拉濱(clofarabine)、地西他濱(decitabine)、達沙替尼(desatinib)、右雷佐生(dexrazoxane)、多西他賽、表柔比星(epirubicin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、埃羅替尼(erlotinib)、雷洛昔芬(raloxifene)、氟維司群(fulvestrant)、來曲唑(letrozole)、吉非替尼(gefitinib)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、吉非替尼、依紮匹隆(ixabepilone)、拉帕替尼(lapatinib)、來那度胺(lenalidomide)、胺基酮戊酸(aminolevulinic

acid)、替莫唑胺(temozolomide)、耐拉濱(nelarabine)、索拉非尼(sorafenib)、尼羅替尼(nilotinib)、培門冬酶(pegaspargase)、培美曲塞(pemetrexed)、利妥昔單抗(rituximab)、達沙替尼(dasatinib)、沙立度胺(thalidomide)、貝沙羅汀(bexarotene)、替西羅莫司(temsirolimus)、硼替佐米(bortezomib)、伏立諾他(vorinostat)、卡培他濱、唑來膦酸(zoledronic acid)、阿那曲唑(anastrozole)、舒尼替尼(sunitinib)、阿瑞吡坦(aprepitant)及耐拉濱或其醫藥上可接受之鹽。

可用於治療癌症且可與本發明化合物組合使用之其他醫藥活性劑包含：血管內皮生長因子(VEGF)抑制劑、肝細胞生長因子/分散因子(HGF/SF)抑制劑、血管生成素1及/或2抑制劑、腫瘤壞死因子相關性細胞凋亡誘導配體(TRAIL)激動劑、重組人類apo2配體(TRAIL)、胰島素樣生長因子1受體(IGFR-1)抑制劑、cFMS抑制劑、HER 2抑制劑、c-met抑制劑、aurora激酶抑制劑、CDK 4及/或6抑制劑及B-raf抑制劑。

可用於治療癌症且可與本發明化合物組合使用之其他醫藥活性劑包含抗體藥物偶聯物(ADC)，其中使用連接體將結合至蛋白質、較佳地結合至癌細胞之抗體與對癌細胞有害之化合物偶聯。對癌細胞有害之化合物之實例包含類美登素(maytansinoid)衍生物及奧裏斯他汀(auristatin)衍生物。

可用於治療癌症且可與本發明化合物組合使用之其他醫藥活性劑包含：阿法依伯汀(epoetin alfa)、阿法達貝泊汀(darbepoetin alfa)、帕尼單抗(panitumumab)、培非司亭(pegfilgrastim)、帕利夫明(palifermin)、非格司亭(filgrastim)、德奴單抗(denosumab)、安西司亭(ancestim)、AMG 102、AMG 319、AMG 386、AMG 479 (蓋尼塔單抗(Ganitumab))、AMG 511、AMG 900、AMG 655 (考那木單抗(Conatumumab))、AMG 745、AMG 951及AMG 706 (莫替沙尼

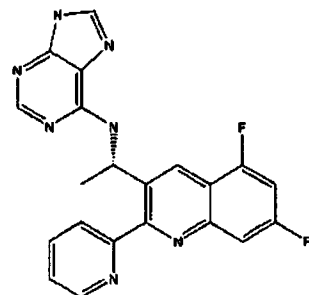
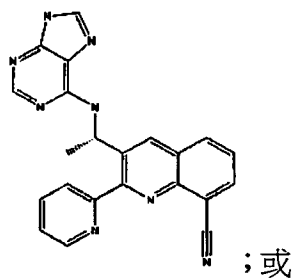
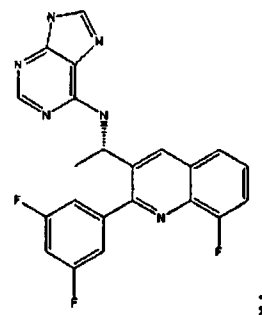
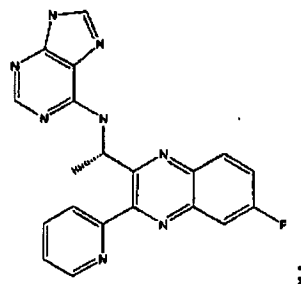
(Motesanib))或其醫藥上可接受之鹽。

在另一態樣中，本發明係關於本發明化合物與一或多種醫藥藥劑(其係磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)路徑中之蛋白質之抑制劑)之組合之用途。本發明化合物以及PI3K路徑中之蛋白質抑制劑之組合已在癌細胞生長分析中展示協同作用，包含增強之細胞凋亡及細胞殺滅。PI3K路徑中之蛋白質之實例包含PI3K、mTOR及PKB (亦稱為Akt)。PI3K蛋白質存在於若干同型異構體(包含 α 、 β 、 δ 或 γ)中。預計可與本發明化合物組合使用之PI3K抑制劑可對一或多種同型異構體具有選擇性。

「選擇性」意指化合物較其他同型異構體抑制一或多種同型異構體。選擇性係彼等熟習此項技術者熟知之概念且可使用熟知活性活體外分析或基於細胞之分析量測。較佳選擇性包含一或多種同型異構體之選擇性係其他同型異構體之大於2倍、較佳地10倍或更佳地100倍。在一態樣中，可與本發明化合物組合使用之PI3K抑制劑係PI3K α 選擇性抑制劑。在另一態樣中，化合物係PI3K δ 選擇性抑制劑。

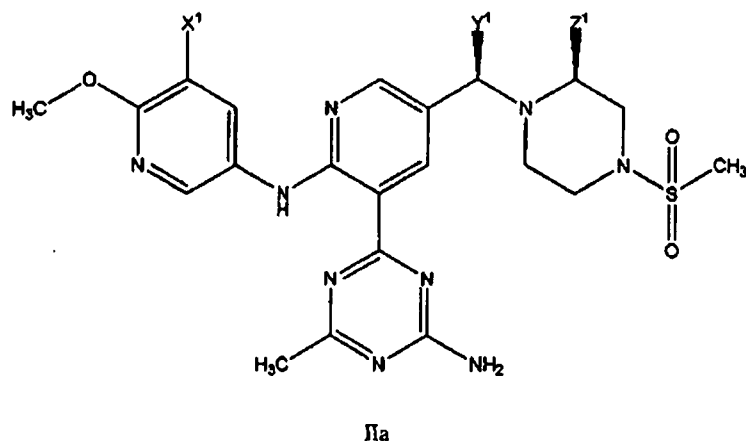
可與一或多種本發明化合物組合使用之PI3K抑制劑之實例包含彼等揭示於下列參考案中者：PCT公開申請案第WO2010/151791號、PCT公開申請案第WO2010/151737號、PCT公開申請案第WO2010/151735號、PCT公開申請案第WO2010/151740號、PCT公開申請案第WO2008/118455號、PCT公開申請案第WO2008/118454號、PCT公開申請案第WO2008/118468號、美國公開申請案第US20100331293號、美國公開申請案第US20100331306號、美國公開申請案第US20090023761號、美國公開申請案第US20090030002號、美國公開申請案第US20090137581號、美國公開申請案第US2009/0054405號、美國公開申請案第U.S.2009/0163489號、美國公開申請案第US 2010/0273764號、美國公開申請案第U.S.2011/0092504號或PCT公開申請案第WO2010/108074號。

與本發明化合物組合使用之較佳PI3K抑制劑包含：



或其醫藥上可接受之鹽。

亦較佳者係下文式IIa之化合物或其醫藥上可接受之鹽，



其中X¹係氟或氫；Y¹係氫或甲基；且Z¹係氫或甲基。

已知抑制PI3K及mTOR之化合物(雙重抑制劑)。在再一態樣中，本發明提供雙重PI3K及mTOR抑制劑與本發明化合物組合使用之用途。

mTOR係PI3K路徑中之蛋白質。本發明之另一態樣係mTOR抑制劑與本發明化合物之組合之用途。可與本發明化合物組合使用之mTOR抑制劑包含彼等揭示於下列文件中者：PCT公開申請案第WO2010/132598號或PCT公開申請案第WO2010/096314號。

PKB (Akt)亦係PI3K路徑中之蛋白質。本發明之另一態樣mTOR抑制劑與本發明化合物之組合之用途。可與本發明化合物組合使用之PKB抑制劑包含彼等揭示於下列文件中者：美國專利第7,354,944號、美國專利第7,700,636號、美國專利第7,919,514號、美國專利第7,514,566號、美國專利申請公開案第US 2009/0270445 A1號、美國專利第7,919,504號、美國專利第7,897,619號或PCT公開申請案第WO 2010/083246 A1號。

本發明化合物可與CDK4及/或6抑制劑組合使用。可與本發明化合物組合使用之CDK 4及/或6抑制劑包含彼等揭示於下列文件中者：PCT公開申請案第WO 2009/085185號或美國專利申請公開案第US2011/0097305號。

本發明化合物亦可與治療噁心之醫藥活性劑組合使用。可用於

治療噁心之藥劑之實例包含：屈大麻酚(dronabinol)、格拉司瓊(granisetrone)、甲氧氯普胺(metoclopramide)、昂丹司瓊(ondansetrone)及丙氯拉嗪(prochlorperazine)或其醫藥上可接受之鹽。

此外，本發明化合物可與其他可用於治療癌症之藥劑組合使用，該等藥劑係(例如)醋孟南(acemannan)、阿柔比星(aclarubicin)、阿地白介素(aldesleukin)、阿利維A酸(alitretinoin)、阿米福汀(amifostine)、胺柔比星(amrubicin)、安丫啉(amsacrine)、阿那格雷(anagrelide)、阿格拉賓(arylabin)、三氧化砷、BAM 002 (Novelos)、比卡魯胺(bicalutamide)、溴脲苷(broxuridine)、西莫白介素(celmooleukin)、西曲瑞克(cetrorelix)、克拉曲濱(cladribine)、克黴唑(clotrimazole)、DA 3030 (Dong-A)、利珠單抗(daclizumab)、地尼白介素(denileukin diftitox)、地洛瑞林(deslorelin)、地拉齊普(dilazep)、山嶺醇(docosanol)、度骨化醇(doxercalciferol)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、溴隱亭(bromocriptine)、阿糖胞苷、HIT雙氯芬酸(HIT diclofenac)、干擾素 α 、維甲酸(tretinoin)、依地福新(edelfosine)、依決洛單抗(edrecolomab)、依氟鳥胺酸(eflornithine)、乙嘧替氟(emitofur)、表柔比星、倍他依泊汀(epoetin beta)、磷酸依託泊苷(etoposide phosphate)、依昔舒林(exisulind)、法屈唑(fadrozole)、非那雄胺(finasteride)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate)、福美司坦(formestane)、福莫司汀(fotemustine)、硝酸鎂、吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、吉莫斯特(gimeracil)/奧替拉西(oteracil)/喃氟啉(tegafur)組合、克拉卡品(glycopine)、戈舍瑞林(goserelin)、庚鉑(heptaplatin)、人絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin)、人胚胎 α 胎蛋白(human fetal alpha fetoprotein)、伊班膦酸(ibandronic acid)、干擾素 α 、天然干擾素 α 、干擾素 α -2、干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、干擾素 α -N1、干擾素 α -n3、干擾素 α con-1、天然

干擾素 α 、干擾素 β 、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、干擾素 γ 、天然干擾素 γ 、干擾素 γ -1a、干擾素 γ -1b、介白素-1 β (interleukin-1 beta)、碘苄胍(iobenguane)、伊索拉定(irsogladine)、蘭瑞肽(lanreotide)、LC 9018 (Yakult)、來氟洛米(leflunomide)、來格司亭(lenograstim)、硫酸化香菇多糖(lentinan sulfate)、來曲唑(letrozole)、白血球 α 干擾素(leukocyte alpha interferon)、亮丙瑞林(leuporelin)、左旋咪唑(levamisole)+氟尿嘧啶、利阿唑(liarozole)、洛鉑(lobaplatin)、氯尼達明(lonidamine)、洛伐他汀(lovastatin)、馬索羅酚(masoprocol)、美拉腫醇(melarsoprol)、甲氧氯普胺、米非司酮(mifepristone)、米替福新(miltefosine)、米立司亭(mirimostim)、失配雙鏈RNA、米托胍脲(mitoguazone)、二溴衛矛醇(mitolactol)、米托蒽醌、莫拉司亭(molgramostim)、那法瑞林(nafarelin)、納洛酮(naloxone) +噴他佐辛(pentazocine)、那托司亭(nartograstim)、萘達鉑(nedaplatin)、尼魯米特(nilutamide)、諾司卡品(noscapine)、新穎紅血球生成刺激蛋白、NSC 631570奧曲肽(octreotide)、奧普瑞白介素(oprelvekin)、奧沙特隆(osaterone)、紫杉醇(paclitaxel)、帕米膦酸(pamidronic acid)、聚乙二醇干擾素(peginterferon) α -2b、戊聚糖硫酸鈉(pentosan polysulfate 鈉)、噴司他丁(pentostatin)、溶鏈菌素(picibanil)、吡柔比星(pirarubicin)、兔抗胸腺細胞多株抗體(rabbit antithymocyte polyclonal antibody)、聚乙二醇干擾素 α -2a、卟吩姆鈉(porfimer鈉)、雷替曲噻(raltitrexed)、拉布立酶(rasburicase)、銻Re 186依替膦酸鹽(rhenium Re 186 etidronate)、RII 維甲醯胺(RII retinamide)、羅莫肽(romurtide)、來昔決南(lexidronam) 釷 (153 Sm)、沙格司亭(sargramostim)、西佐喃(sizofiran)、索布佐生(sobuzoxane)、索納明(sonermin)、氯化鋇-89、蘇拉明(suramin)、他索納明(tasonermin)、他紮羅汀(tazarotene)、喃氟啶、替莫卟吩(temoporphin)、替尼泊苷

(teniposide)、四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide)、胸腺法新(thymalfasin)、促甲狀腺激素 α (thyrotropin alfa)、托瑞米芬(toremifene)、托西莫單抗-碘131 (tositumomab-iodine 131)、蘇消安(treosulfan)、維甲酸、曲洛司坦(trilostane)、三甲曲沙(trimetrexate)、曲普瑞林(triptorelin)、天然腫瘤壞死因子 α 、烏苯美司(ubenimex)、膀胱癌疫苗、丸山疫苗(Maruyama vaccine)、黑素瘤裂解物疫苗、戊柔比星(valrubicin)、維替泊芬(verteporfin)、維魯利秦(virulizin)、淨司他丁斯酯(zinostatin stimalamer)；阿巴瑞克(abarelix)；AE 941 (Aeterna)、胺莫司汀(ambamustine)、反義寡核苷酸、bcl-2 (Genta)、APC 8015 (Dendreon)、右旋胺魯米特(dexaminoglutethimide)、地吡醌(diaziquone)、EL 532 (Elan)、EM 800 (Endorecherche)、恩尿嘧啶(eniluracil)、依他硝唑(etanidazole)、維甲醯酚胺(fenretinide)、非格司亭(filgrastim) SD01 (Amgen)、加洛他濱(galocitabine)、胃泌素17免疫原(gastrin 17 immunogen)、HLA-B7基因療法(Vical)、粒細胞巨噬細胞菌落刺激因子、組胺二鹽酸鹽、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、伊洛馬司他(ilomastat)、IM 862 (Cytran)、介白素-2、伊普西吩(iproxifene)、LDI 200 (Milkhaus)、來立司亭(leridistim)、林妥珠單抗(lintuzumab)、CA 125單株抗體(MAb) (Biomira)、癌症MAb (Japan Pharmaceutical Development)、HER-2及Fc MAb (Medarex)、獨特型(idiotypic) 105AD7 MAb (CRC Technology)、獨特型CEA MAb (Trilex)、LYM-1-碘131 MAb (Techniclone)、多形上皮黏蛋白(polymorphic epithelial mucin)-釷90 MAb (Antisoma)、馬立馬司他(marimastat)、美諾立爾(menogaril)、米妥莫單抗(mitumomab)、莫特沙芬釷(motexafin gadolinium)、MX 6 (Galderma)、諾拉曲特(nolatrexed)、P 30蛋白、培維索孟(pegvisomant)、波弗黴素(porfiromycin)、普馬司他(prinomastat)、RL 0903 (Shire)、魯比替康

(rubitecan)、沙鉑(satraplatin)、苯乙酸鈉、斯帕磷酸(sparfosic acid)、SRL 172 (SR Pharma)、SU 5416 (Pfizer)、TA 077 (Tanabe)、四硫鉬酸鹽(tetrathiomolybdate)、唐松草卡品鹼(thaliblastine)、血小板生成素(thrombopoietin)、乙基錫初紫紅素(tin ethyl etiopurpurin)、替拉紫明(tirapazamine)、癌症疫苗(Biomira)、黑素瘤疫苗(New York University)、黑素瘤疫苗(Sloan Kettering Institute)、黑素瘤腫瘤溶解劑疫苗(New York Medical College)、病毒性黑色素瘤裂解物疫苗(Royal Newcastle Hospital)或伐司撲達(valspodar)。應注意，在適當時，上文所列舉之藥劑亦可以醫藥上可接受之鹽之形式投與。

本發明化合物亦可與放射療法、激素療法、手術及免疫療法(該等療法為彼等熟習此項技術者所熟知)組合使用。

因本發明之一態樣涵蓋使用可單獨投與之醫藥活性化合物之組合來治療疾病/病狀，故本發明另外係關於以套組形式組合單獨醫藥組合物。套組包兩種單獨醫藥組合物：本發明化合物及第二醫藥化合物。套組包括含有單獨組合物之容器，例如分開瓶或分開箔包。容器之其他實例包含注射器、盒及袋。通常，套組包括使用單獨組份之說明書。在單獨組份較佳以不同劑型(例如經口及非經腸)投與時，以不同劑量間隔投與時，或在開方醫師或獸醫期望逐步增加組合中之個別組份時，套組形式尤其有利。

此一套組之實例係所謂的泡殼包裝。泡殼包裝已為封裝工業所熟知且廣泛用於醫藥單位劑型(錠劑、膠囊及諸如此類)之封裝。泡殼包裝通常由一片覆蓋有較佳透明塑膠材料箔之相對堅硬材料組成。在封裝製程期間，在塑膠箔中形成凹陷。凹陷具有擬包裝之錠劑或膠囊之大小及形狀。接下來，將錠劑或膠囊置於凹陷中並使相對堅硬材料片在與凹陷形成方向相對之箔表面上緊貼塑膠箔密封。因此，將錠劑或膠囊密封於塑膠箔與片之間之凹陷中。較佳地，片之強度應使得藉

由在凹陷上人工施加壓力並藉此在凹陷處之片中形成開口而可將錠劑或膠囊自泡殼包裝取出。然後可經由該開口取出錠劑或膠囊。

可能期望在套組上提供記憶輔助物，例如呈鄰近錠劑或膠囊之數字形式，藉此該等數字對應於應攝入所指定錠劑或膠囊之方案天數。此一記憶輔助物之另一實例係印刷於卡片上之日曆，例如遵循「第一周，週一，週二，.....等.....第二周，週一，週二，.....」等。易於明瞭記憶輔助物之其他變化。「日劑量」可為擬在給定天數服用之單一錠劑或膠囊或若干丸劑或膠囊。另外，本發明化合物之日劑量可由一種錠劑或膠囊組成，而第二化合物之日劑量可由若干錠劑或膠囊組成且反之亦然。記憶輔助物應反映此事項且有助於正確投與活性劑。

在本發明之另一具體實施例中，提供經設計以一次分配一個日劑量以用於其預期應用之分配器。較佳地，分配器配備有記憶輔助物以進一步促進與方案順從。此一記憶輔助物之實例係指示經分配日劑量之數量之機械計數器。此一記憶輔助物之另一實例係與液晶讀數器耦聯之以電池為動力之微晶片記憶體或可聽信號提醒裝置(其(例如)讀出最後一次服用日劑量之日期及/或在下次服用劑量時加以提醒)。

可以以下方式將本發明化合物及其他醫藥活性化合物(若期望)投與患者：經口、經直腸、非經腸(例如靜脈內、肌內或皮下)、腦池內、陰道內、腹膜腔內、膀胱內、局部(例如粉劑、軟膏或滴劑)或以經頰或鼻噴霧劑形式。涵蓋彼等熟習此項技術者用於投與醫藥活性劑之所有方法。

適於非經腸注射之組合物可包括生理上可接受之無菌水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液及用於重構成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。適宜水性及非水性載劑、稀釋劑、溶劑或媒劑之實例包含水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油及諸如此類)、其

適宜混合物、植物油(例如橄欖油)及可注射有機酯(例如油酸乙酯)。可藉由(例如)以下方式來維持適宜流動性：使用諸如卵磷酯等包膜，在分散液情形下藉由維持所需粒徑，及使用表面活性劑。

該等組合物亦可含有佐劑，例如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。可藉由添加各種抗細菌劑及抗真菌劑(例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及諸如此類)防止微生物污染。亦可期望其包含等滲劑，例如糖、氯化鈉及諸如此類。可藉由使用延遲吸收之試劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)達成可注射醫藥組合物之延長吸收。

用於經口投與之固體劑型包含膠囊、錠劑、粉劑及粒子。在該等固體劑型中，將活性化合物與至少一種常規惰性賦形劑(或載劑)(例如檸檬酸鈉或磷酸二鈣)或以下物質混合：(a)填充劑或增量劑，例如澱粉、乳糖、蔗糖、甘露醇及矽酸，(b)黏合劑，例如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烷基吡咯啉酮、蔗糖及阿拉伯樹膠，(c)保濕劑，例如甘油，(d)崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些複合矽酸鹽及碳酸鈉，(e)溶液阻滯劑，例如石蠟，(f)吸收促進劑，例如四級銨化合物，(g)潤濕劑，例如鯨蠟醇及單硬脂酸甘油酯，(h)吸附劑，例如高嶺土及膨潤土，及(i)潤滑劑，例如滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉或其混合物。在膠囊及錠劑之情形下，劑型亦可包括緩衝劑。

在使用諸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類等賦形劑之軟質及硬質填充明膠膠囊中，亦可使用類似類型之固體組合物作為填充劑。

諸如錠劑、糖衣藥丸、膠囊、丸劑及粒子等固體劑型可使用包衣及殼體(例如腸溶包衣及其他在業內熟知者)來製備。其亦可含有遮光劑，且亦可具有在腸道某一部分中以延遲方式釋放一或多種活性化合物之組成。可使用之包埋組合物之實例係聚合物質及蠟。若適當，

則活性化合物亦可呈含有一或多種上述賦形劑之微囊封形式。

經口投與之液體劑型包含醫藥上可接受之乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酞劑。除活性化合物外，液體劑型可含有業內通常使用之惰性稀釋劑(例如水或其他溶劑)、增溶劑及乳化劑，例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄基酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油(尤其係棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇及山梨醇酐之脂肪酸酯或該等物質之混合物及諸如此類。

除該等惰性稀釋劑外，組合物亦可包含佐劑，例如潤濕劑、乳化及懸浮劑、甜味劑、矯味劑及芳香劑。除活性化合物外，懸浮液亦可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇及去水山梨醇酐酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃蓍膠或該等物質之混合物及諸如此類。

用於直腸投與之組合物較佳為栓劑，其可藉由將本發明化合物與適宜無刺激性賦形劑或載劑(例如可可油、聚乙二醇或栓劑蠟)進行混合來製備，該等賦形劑或載劑在正常環境溫度下為固體但在體溫下為液體且由此其可在直腸或陰道腔內融化並釋放活性化合物。

用於局部投與本發明化合物之劑型包含軟膏、粉劑、噴霧劑及吸入劑。若需要，則可在無菌條件下將一或多種活性化合物與生理上可接受之載劑及任一防腐劑、緩衝劑或推進劑混合。本發明範圍亦涵蓋眼用調配物、眼用軟膏、粉劑及溶液。

可以在約0.1 mg/天至約3,000 mg/天範圍內之劑量值將本發明化合物投與患者。對於體重為約70 kg之正常人類成人而言，在約0.01 mg/公斤體重至約100 mg/公斤體重之範圍內之劑量通常足矣。可使用之具體劑量及劑量範圍取決於多種因素，包含患者之要求、所治療病狀或疾病之嚴重程度及所投與化合物之藥理學活性。熟習此項技術者

熟知用於特定患者之劑量範圍及最佳劑量之測定。

本發明化合物可以醫藥上可接受之鹽、酯、醯胺或前藥之形式投與。術語「鹽」係指本發明化合物之無機鹽及有機鹽。該等鹽可在化合物之最終分離及純化期間原位製備，或藉由使呈游離鹼或游離酸形式之經純化化合物與適宜有機或無機鹼或酸單獨反應並分離由此形成之鹽來製備。代表性鹽包含氫溴酸鹽、鹽酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、硝酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、月桂酸鹽、硼酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、茶酸鹽、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖酸鹽及月桂基磺酸鹽類及諸如此類。鹽可包含基於鹼金屬及鹼土金屬之陽離子鹽，例如鈉鹽、鋰鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽及諸如此類；以及無毒銨、四級銨及胺陽離子，包含但不限於銨、四甲銨、四乙銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺及諸如此類。例如參見 S. M. Berge 等人，「Pharmaceutical Salts」， J Pharm Sci, 66: 1-19 (1977)。

本發明化合物之醫藥上可接受之酯之實例包含 C₁-C₈ 烷基酯。可接受之酯亦包含 C₅-C₇ 環烷基酯以及芳基烷基酯(例如苄基酯)。通常使用 C₁-C₄ 烷基酯。可根據業內熟知方法來製備本發明化合物之酯。

本發明化合物之醫藥上可接受之醯胺之實例包含衍生自氨、一級 C₁-C₈ 烷基胺及二級 C₁-C₈ 二烷基胺之醯胺。在二級胺之情形下，胺亦可呈含有至少一個氮原子之 5 或 6 員雜環烷基之形式。通常使用衍生自氨、C₁-C₃ 一級烷基胺及 C₁-C₂ 二烷基二級胺之醯胺。可根據彼等熟習此項技術者熟知之方法來製備本發明化合物之醯胺。

術語「前藥」意指在活體內發生轉變以得到本發明化合物之化合物。轉變可藉由各種機制(例如經由在血液中水解)發生。關於前藥用途之論述提供於以下文獻中：T. Higuchi 及 W. Stella，「Prodrugs as

Novel Delivery Systems」，A.C.S Symposium Series之第14卷，及 Bioreversible Carriers in Drug Design, Edward B. Roche 編輯，American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987。

為加以闡釋，因本發明化合物含有羧酸官能基，故前藥可包括藉由使用諸如以下基團代替該酸基團之氫原子所形成之酯：(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₁₂)烷醯基氧基甲基、具有4至9個碳原子之1-(烷醯基氧基)乙基、具有5至10個碳原子之1-甲基-1-(烷醯基氧基)-乙基、具有3至6個碳原子之烷氧基羰基氧基甲基、具有4至7個碳原子之1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有5至8個碳原子之1-甲基-1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有3至9個碳原子之N-(烷氧基羰基)胺基甲基、具有4至10個碳原子之1-(N-(烷氧基羰基)胺基)乙基、3-酞基、4-巴豆醯內酯、 γ -丁內酯-4-基、二-N,N-(C₁-C₂)烷基胺基(C₂-C₃)烷基(例如 β -二甲基胺基乙基)、胺甲醯基-(C₁-C₂)烷基、N,N-二(C₁-C₂)烷基胺甲醯基-(C₁-C₂)烷基及六氫吡啶并(C₂-C₃)烷基、吡咯啶并(C₂-C₃)烷基或嗎啉并(C₂-C₃)烷基。

本發明化合物可含有不對稱或對掌性中心，且由此以不同立體異構體形式存在。該等化合物之所有立體異構體形式以及包含外消旋混合物之其混合物預計形成本發明之一部分。此外，本發明涵蓋所有幾何及位置異構體。舉例而言，若化合物含有雙鍵，則涵蓋順式及反式形式(分別指定為Z及E)以及混合物。

可基於物理化學差異藉由已知方法(例如層析及/或分段結晶)將立體異構體混合物(例如非對映異構體混合物)分離成其個別立體化學組份。亦可藉由以下方式來分離對映異構體：藉由與適當光學活性化合物(例如醇)進行反應將對映異構體混合物轉化成非對映異構體混合物，分離非對映異構體且將個別非對映異構體轉化(例如水解)成相應純對映異構體。另外，一些化合物可為阻轉異構體(例如經取代之聯芳基)。

本發明化合物可以非溶劑合物形式以及與醫藥上可接受之溶劑(例如水(水合物)、乙醇及諸如此類)之溶劑合物形式存在。本發明包含且涵蓋溶劑合物形式及非溶劑合物形式。

本發明化合物亦可以不同互變異構體形式存在。涵蓋本發明化合物之所有互變異構體。舉例而言，四唑部分之所有互變異構體形式皆包含於本發明中。另外，舉例而言，該等化合物之所有酮-烯醇或亞胺-烯胺形式皆包含於本發明中。

彼等熟習此項技術者應認識到，本文所含有之化合物名稱及結構可基於化合物之特定互變異構體。儘管可使用僅用於特定互變異構體之名稱或結構，但除非另有所述，否則本發明意欲涵蓋所有互變異構體。

本發明亦意欲涵蓋在活體外使用實驗室技術(例如合成化學家所熟知之彼等技術)合成之化合物；或使用活體內技術(例如經由代謝、發酵、消化及諸如此類)合成之化合物。亦預計可使用活體外技術及活體內技術之組合來合成本發明化合物。

本發明亦包含同位素標記之化合物，除一或多個原子由原子質量或質量數不同於自然界中通常發現之原子質量或質量數之原子代替外，該等化合物與本文所列舉之彼等化合物相同。可納入本發明化合物中之同位素之實例包含氫、碳、氮、氧、磷、氟及氯之同位素，例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{16}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 及 ^{36}Cl 。在一態樣中，本發明係關於一或多個氫原子經氘(^2H)原子代替之化合物。

含有上述同位素及/或其他原子之其他同位素之本發明化合物屬於本發明範圍內。某些同位素標記之本發明化合物(例如彼等納入諸如 ^3H 及 ^{14}C 等放射性同位素之化合物)可用於藥物及/或基質組織分佈分析中。氘化(亦即 ^3H)及碳-14即 ^{14}C 同位素因其易於製備及檢測而尤

佳。另外，使用諸如氘(亦即 ^2H)等較重同位素進行取代因具有更大之代謝穩定性而可提供某些治療優點，例如活體內半衰期增加或劑量需要量減少，且由此在一些情況下可能較佳。通常可藉由使用易於獲得之同位素標記之試劑取代非同位素標記之試劑來製備同位素標記之本發明化合物。

本發明化合物可以各種固態存在，包含結晶狀態及非晶型狀態。涵蓋本發明化合物之不同結晶狀態(亦稱為多晶形物)及非晶型狀態作為本發明之一部分。

在合成本發明化合物時，可能期望使用某些離去基團。術語「離去基團」(「LG」)通常係指可由親核劑置換之基團。業內已知該等離去基團。離去基團之實例包含但不限於鹵化物(例如I、Br、F、Cl)、磺酸鹽(例如甲磺酸鹽、甲苯磺酸鹽)、硫化物(例如 SCH_3)、N-羥基琥珀醯亞胺、N-羥基苯并三唑及諸如此類。親核劑之實例包含但不限於胺、硫醇、醇、格氏試劑(Grignard reagent)、陰離子物質(例如醇鹽、醯胺、碳負離子)及諸如此類。

本文所引用之所有專利、公開之專利申請案及其他出版物皆以引用方式併入本文中。

下文所呈現之實例闡釋本發明之具體實施例。該等實例意欲具有代表性而非意欲以任一方式限制申請專利範圍之範圍。除非另外說明，否則在本文關於固體使用百分比時，百分比係以關於所提及固體組合物之重量計。在本文關於液體使用百分比時，百分比係以關於所提及溶液之體積計。

使用配備有Bruker 5-mm z軸梯度BBI探針之500 MHz Bruker Avance III光譜儀系統(Bruker Biospin, Billerica, MA)來獲取 ^1H -NMR光譜；或使用配備有Bruker 5-mm z軸梯度BBO探針之400 MHz Bruker Avance II或Avance III光譜儀系統來獲取。通常將試樣溶於600 μL

DMSO-d₆或CD₃OD中以用於NMR分析。所提及¹H化學位移係相對於來自用於分析之氘化溶劑之殘餘質子信號(對於DMSO-d₆而言在δ 2.50 ppm下且對於CD₃OD而言在δ 3.30 ppm下)。

繪示有效峰且通常包含：質子數、多重性(s，單重峰；d，雙重峰；dd，雙重峰之雙重峰；t，三重峰；q，四重峰；m，多重峰；br s，寬單重峰)及偶合常數(以赫茲(Hertz)表示)。

通常在Agilent Technologies 6140四極LC/MS質譜儀上記錄電子離子化(EI)質譜。將質譜結果報告為質荷比，有時後面跟有每一離子之相對豐度(存於括弧內)。下文實例中之起始材料通常可自商業來源(例如Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)或經由文獻程序獲得。

在本文中可使用下列縮寫：

~	約
+ve或pos.離子	正離子
△	加熱
Ac	乙醯基
Ac ₂ O	乙酸酐
aq	水溶液
AcOH	乙酸
Bn	苄基
Boc	第三丁氧基羰基
BSA	牛血清白蛋白
Bu	丁基
Bz	苯甲醯基
Calcd或Calc'd	計算值
Conc.	濃縮
CSA	樟腦-10-磺酸

d	天
DBU	1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯
DCE	二氯乙烷
DCM	二氯甲烷
DDQ	2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌
DEA	二乙胺
戴斯-馬丁過碘烷；	1,1,1-三乙醯氧基-1,1-二氫-1,2-苯并碘
戴斯-馬丁試劑	醯基-3-(1H)-酮
DIEA或DIPEA	二異丙基乙基胺
DMAP	4-二甲基胺基吡啶
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	N,N-二甲基甲醯胺
DMSO	二甲基亞砷
DPPA	疊氮化二苯基磷醯
dr	非對映異構體比率
DTT	二硫蘇糖醇
DVB	二乙烯基苯
EDC	N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二 亞胺
ee或e.e.	對映異構體過量
eq	當量
ESI或ES	電噴霧離子化
Et	乙基
Et ₂ O	二乙醚
Et ₃ N	三乙胺
EtOAc	乙酸乙酯

EtOH	乙醇
g	克
h	小時
HATU	六氟磷酸 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎧
HBTU	六氟磷酸 O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脒鎧
Hex	己烷
HMPA	六甲基磷醯胺
HOAt	1-羥基-7-氮雜苯并三唑
HOBt	羥基苯并三唑
HPLC	高壓液相層析
IPA或iPrOH	異丙醇
瓊斯試劑(Jones reagent)	氧化鉻(IV)及硫酸之水溶液
KHMDS	六甲基二矽疊氮鉀
KOAc	乙酸鉀
LCMS、LC-MS或LC/MS	液相層析質譜
LDA	二異丙基醯胺鋰
LHMDS或LiHMDS	六甲基二矽疊氮鋰
L-Selectride [®]	三-第二丁基硼氫化鋰(Sigma-Aldrich, St. Louis)
M	莫耳濃度(mol L ⁻¹)
mCPBA	間-氯過氧苯甲酸
Me	甲基
MeCN	乙腈
Mel	碘甲烷

MeOH	甲醇
mg	毫克
min	分鐘
mL	毫升
M	莫耳
MS	質譜
MsCl	甲磺醯氯
MTBE或MtBE	甲基第三丁基醚
m/z	質荷比
NaHMDS	六甲基二矽疊氮鈉
NaOtBu	第三丁醇鈉
NBS	N-溴琥珀醯亞胺
nBuLi	正丁基鋰
NMO	N-甲基嗎啉-N-氧化物
NMP	1-甲基-2-吡咯啉酮
NMR	核磁共振
N-Selectride®	三-第二丁基硼氫化鈉(Sigma-Aldrich, St. Louis)
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
PMB	對甲氧基苄基
Pr	丙基
ppm	百萬份數
PTFE	聚四氟乙烯
p-tol	對-甲苯醯基
rac	外消旋
RP-HPLC或RPHPLC	反相高壓液相層析

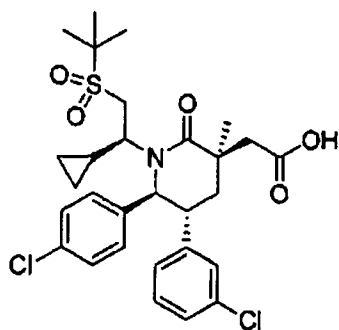
RT或rt或r.t.	室溫
RuCl ₂ (S-xylbinap)	二氯{(S)-(-)-2,2'-雙[二(3,5-二甲苯基)磷基]-1,1'-聯萘基} [(2S)
(S-DAIPEN)	-(+)-1,1-雙(4-甲氧基苯基)-3-甲基-1,2-丁二胺]鈦(II)
sat.或sat'd或satd	飽和
SFC	超臨界流體層析
TBAF	四丁基氟化銨
TBDMS	第三丁基二甲基矽烷基
TBDMS-Cl	第三丁基二甲基矽烷基氯
TBDPS	第三丁基二苯基矽烷基
TEMPO	(2,2,6,6-四甲基六氫吡啶-1-基)氧烷基
tert或t	第三
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
TIPS	三異丙基矽烷基
TLC	薄層層析
TMS	三甲基矽烷基或三甲基矽烷
TPAP	過鈦酸四丙基銨
t _R	滯留時間
tBuOH	第三丁基醇
v/v	體積/體積

實例

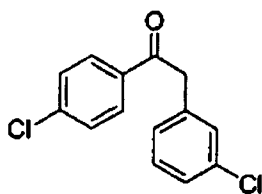
本文所呈現之化合物通常可自市售起始材料開始且使用彼等熟習此項技術者已知之合成技術製得。

實例1

2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸 (WO2011/153509 (Amgen公司)之實例351，公開於2011年12月8日)。



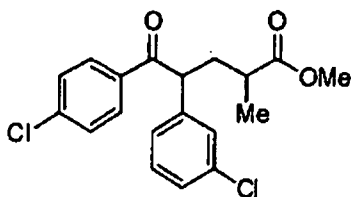
步驟A. 2-(3-氯苯基)-1-(4-氯苯基)乙酮



經1小時，將雙(三甲基矽烷基)醯胺鈉(1 M，存於四氫呋喃中，117 mL)緩慢添加至存於四氫呋喃(58 mL)中之2-(3-氯苯基)乙酸(10 g, 58.6 mmol)之-78℃溶液中。在-78℃下攪拌40分鐘之後，經10分鐘時段添加存於四氫呋喃(35 mL)中之4-氯苯甲酸甲酯(10 g, 58.6 mmol)之溶液。將反應液在-78℃下攪拌3小時，然後升溫至25℃。在25℃下保持兩小時之後，使用氯化銨飽和水溶液終止反應，且在減壓下去除大部分四氫呋喃。使用乙酸乙酯(2 × 100 mL)萃取殘餘物。使用飽和氯化鈉溶液洗滌合併之有機層，藉由硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮濾液。自醚/戊烷使產物重結晶以提供白色固體形式之標題化合物。

^1H NMR (500 MHz, DMSCO- d_6 , δ ppm): 8.05 (m, 2H), 7.62 (m, 2H), 7.33 (m, 3H), 7.21 (br d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.45 (s, 2H)。MS (ESI) = 265.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

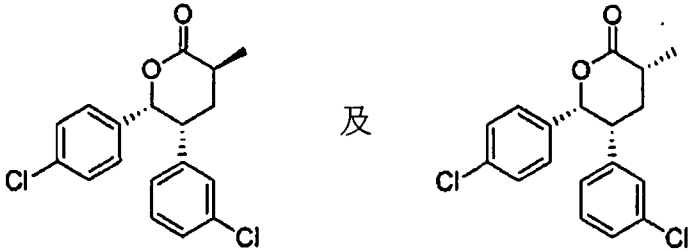
步驟B：4-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯



將甲基丙烯酸甲酯(12.65 mL, 119 mmol)添加至存於四氫呋喃(283 mL)中之2-(3-氯苯基)-1-(4-氯苯基)乙酮(30 g, 113 mmol, 實例1, 步驟A)之溶液中。然後添加第三丁醇鉀(1.27 g, 11.3 mmol)且將反應液在室溫下攪拌2天。在真空下去除溶劑並使用300 mL乙酸乙酯代替。使用鹽水(50 mL)、水(3 × 50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌有機相。藉由硫酸鎂乾燥有機相, 過濾並在真空下濃縮以提供4-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯, 其呈非對映異構體之大約1:1混合物之形式。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.87 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.27-7.14 (一系列m, 4H), 4.61 (m, 1H), 3.69 (s, 1.5H), 3.60 (s, 1.5 H), 2.45 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.10 (ddd, $J = 13.9, 9.4, 5.5$ Hz, 0.5H), 1.96 (ddd, $J = 13.7, 9.0, 4.3$ Hz, 0.5H), 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 1.5H), 1.16 (d, $J = 7.0, 1.5$ H)。MS (ESI) = 387.0 $[\text{M} + 23]^+$ 。

步驟C：(3S,5R,6R)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮及(3R,5R,6R)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮



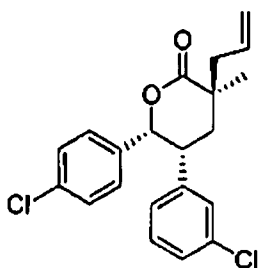
將4-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯(40 g, 104.0 mmol, 實例1, 步驟B)溶於200 mL無水甲苯中並在真空下濃

縮。在使用之前，將殘餘物置於高真空下保持2小時。將化合物分成2 × 20 g批次並如下所述進行處理：在250 mL玻璃氫化器皿中，使用第三丁醇鉀(2.33 g, 20.8 mmol)處理存於無水2-丙醇(104 mL)中之4-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯(20 g, 52.0 mmol)。添加存於3.8 mL甲苯中之RuCl₂(S-xylbinap)(S-DAIPEN) (0.191 g, 0.156 mmol, Strem Chemicals公司, Newburyport, MA)。在1.5小時之後，將器皿加壓至50 psi (344.7 kPa)且使用氫吹掃5次並在室溫下攪拌。視需要使用額外氫再裝填反應。在3天之後，合併反應液並分配於50%飽和氯化銨溶液與乙酸乙酯之間。使用乙酸乙酯萃取水層。使用鹽水洗滌合併之有機相，藉由硫酸鎂乾燥，過濾，並濃縮。將粗產物(主要係(4R,5R)-4-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-5-羥基-2-甲基戊酸異丙基酯)溶於四氫呋喃(450 mL)及甲醇(150 mL)中。添加氫氧化鋰(1.4 M, 149 mL, 208 mmol)，且將溶液在室溫下攪拌24小時。在真空下濃縮混合物且將殘餘物再溶於乙酸乙酯中。在攪拌下添加1N鹽酸水溶液直至水層具有約1之pH為止。分離各層且使用鹽水洗滌有機相，藉由硫酸鎂乾燥，過濾並濃縮。將材料溶於200 mL無水甲苯中並使用對甲苯磺酸吡啶鎢(PPTS, 0.784 g, 3.12 mmol)處理。將反應液在迪安-斯脫克條件(Dean-Stark condition)下加熱至回流直至塞科酸(seco-acid)已耗盡為止(約2小時)。將反應液冷卻至室溫並使用飽和碳酸氫鈉(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌。藉由硫酸鈉乾燥溶液，過濾並濃縮。藉由急驟層析在矽膠上(120 g管柱；使用100%二氯甲烷洗脫)純化粗製材料。獲得白色固體形式之標題化合物，其具有94:6對映異構體比率及甲基非對映異構體之7:3混合物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.22-6.98 (一系列m, 5H), 6.91 (dt, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 0.3H), 6.81 (m, 2H), 6.73 (dt, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 0.7H), 5.76 (d, *J* = 4.1 Hz, 0.3 H), 5.69 (d, *J* = 4.7 Hz, 0.7H), 3.67 (dt, *J* =

6.6, 4.3 Hz, 0.3H), 3.55 (td, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 0.7 H), 2.96 (五重峰之d, $J = 13.5, 6.7$ Hz, 0.7 H), 2.81 (m, 0.3 H), 2.56 (dt, $J = 14.3, 8.0$ Hz, 0.7 H), 2.32 (dt, $J = 13.69, 7.0$ Hz, 0.3 H), 2.06 (ddd, $J = 13.7, 8.4, 4.1, 0.3$ H), 1.85 (ddd, $J = 14.1, 12.5, 7.4, 0.7$ H), 1.42 (d, $J = 7.0$ Hz, 0.9 H), 1.41 (d, $J = 6.7$ Hz, 2.1H)。MS (ESI) = 357.0 $[M + 23]^+$ 。 $[\alpha]_D$ (22°C, $c = 1.0$, CH_2Cl_2) = -31.9° ; m.p. 98-99°C。

步驟D. (3S,5R,6R)-3-烯丙基-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮

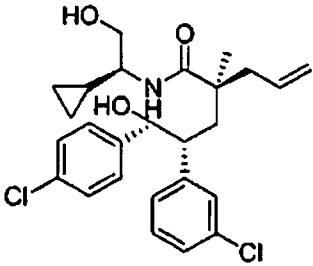


在-35°C下(乙腈/乾冰浴)，使用存於四氫呋喃中之雙(三甲基矽烷)醯胺鋰(1.0 M, 17.45 mL, 17.45 mmol)之溶液處理存於四氫呋喃(22 mL)中之(3S,5R,6R)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮及(3R,5S,6S)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮(4.5 g, 13.4 mmol，實例1，步驟C)及烯丙基溴(3.48 mL, 40.3 mmol)之溶液。經1小時將反應液升溫至-5°C且然後使用50%飽和氯化銨驟冷。使用100 mL乙酸乙酯稀釋反應液且分離各層。使用鹽水洗滌有機相，藉由硫酸鎂乾燥，過濾並在真空下濃縮以在真空下靜置後提供白色固體形式之標題化合物。使用對掌性SFC (92% CO_2 ，8%甲醇(20 mM氨)，5 mL/min，Phenomenex Lux-2管柱(Phenomenex, Torrance, CA)，100巴(10,000 kPa)，40°C，5分鐘方法)測得，化合物具有96:4之對映異構體比率。(主要對映異構體：標題化合物，滯留時間= 2.45分鐘，96%；次要對映異構體(結構未展示，滯留時間= 2.12 min，4%)。藉由在回流下添加至庚烷中(4.7 g於40 mL中製成漿液)來使標題

化合物重結晶且逐滴添加1.5 mL甲苯以溶解。將溶液冷卻至0°C。過濾白色固體並使用20 mL冷庚烷沖洗以提供白色粉末。對掌性SFC (92% CO₂，8%甲醇，Phenomenex Lux-2管柱，與上文相同之方法)指示99.2:0.8之對映異構體比率。(主要對映異構體，2.45 min，99.2%；次要對映異構體：2.12 min，0.8%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.24 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.2 Hz, 1H), 7.20-7.15 (一系列m, 3H), 6.91 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.78 (br d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.60 (m, 2H), 5.84 (ddt, *J* = 17.6, 10.2, 7.4 Hz, 1H), 5.70 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 5.21-5.13 (一系列m, 2H), 3.82 (dt, *J* = 11.7, 4.5 Hz, 1H), 2.62 (ABX *J*_{AB} = 13.7 Hz, *J*_{AX} = 7.6 Hz, 1H), 2.53 (ABX, *J*_{AB} = 13.9 Hz, *J*_{BX} = 7.2 Hz, 1H)。1.99 (dd, *J* = 14.1, 11.9 Hz, 1H), 1.92 (ddd, *J* = 13.9, 3.9, 1.2 Hz, 1H)。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ ppm): 175.9, 140.2, 134.5, 134.3, 134.0, 132.2, 129.8, 128.6, 128.0, 127.9, 127.8, 126.4, 119.9, 83.9, 44.5, 42.4, 40.7, 31.8, 26.1。MS (ESI) = 375.2 [M + H]⁺。IR = 1730 cm⁻¹。[α]_D (24°C, c = 1.0, CH₂Cl₂) = -191°。m.p. 111-114°C。

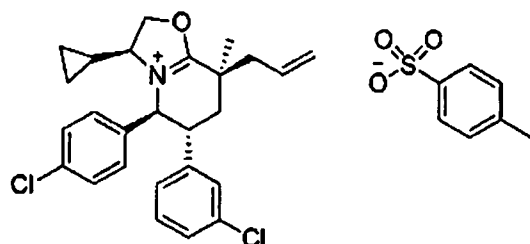
步驟E. (2S)-2-((2R)-2-(3-氯苯基)-3-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-N-((S)-1-環丙基-2-羥乙基)-2-甲基戊-4-烯醯胺



將(3S,5R,6R)-3-烯丙基-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮(125.0 g, 333 mmol，實例1，步驟D)添加至(S)-2-胺基-2-環丙基乙醇(101 g, 999 mmol)中且將反應混合物在110°C及氬下加熱25小時。使用乙酸異丙基酯稀釋反應混合物，冷卻至室溫，且緩慢添加

3 M鹽酸(400 mL)。將混合物在室溫下攪拌20分鐘，且分離各層。使用1 M鹽酸(200 mL)及鹽水洗滌有機層，然後藉由硫酸鎂乾燥，過濾並在真空下濃縮以提供褐色油狀物形式之期望產物(159 g)。

步驟F. (3S,5S,6R,8S)-4-甲基苯磺酸8-烯丙基-6-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-3-環丙基-8-甲基-2,3,5,6,7,8-六氫噁唑并[3,2- α]吡啶-4-鎗

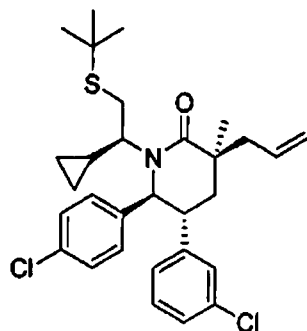


向配備有磁力攪拌棒、加料漏斗、隔膜及內部溫度感測器之2 L 4頸圓底燒瓶中裝填對甲苯磺酸酐(240 g, 734 mmol)及無水二氯甲烷(600 mL)。將內部溫度調節至14°C且將混合物攪拌10分鐘。向反應混合物中添加存於無水二氯甲烷(400 mL)中之(S)-2-((2R,3R)-2-(3-氯苯基)-3-(4-氯苯基)-3-羥丙基)-N-((S)-1-環丙基-2-羥乙基)-2-甲基戊-4-烯醯胺(159.0 g, 334 mmol，實例1，步驟E)之溶液。溫度增加至17°C，然後返回14°C。將反應混合物冷卻至7°C且經由加料漏斗向反應混合物中逐滴添加2,6-二甲基吡啶(160 mL, 1372 mmol) (藉由活化4 Å分子篩乾燥)。添加在1小時之後完成。自水浴取出反應混合物並在室溫下攪拌1小時。將反應混合物在回流下加熱16小時。LCMS指示一些中間體剩餘。添加額外對甲苯磺酸酐(0.25當量)及二甲基吡啶(0.5當量)且將反應混合物在回流下加熱8小時。LCMS指示反應已完成。將反應混合物冷卻至室溫並經由加料漏斗在攪拌下添加至1 M硫酸水溶液(764 mL, 764 mmol)中。添加耗時30分鐘，且然後將溶液在室溫下攪拌30分鐘。分離各層且藉由硫酸鎂乾燥有機層，過濾並在真空下濃縮以提供褐色糖漿。為自糖漿去除任何二氯甲烷，將其吸收於乙酸乙酯中並在真空下濃縮兩次以提供稠褐色糖漿。添加乙酸乙酯(2 L)且在

60°C下加熱混合物直至所有糖漿皆溶解為止(約45分鐘)。攪拌溶液同時冷卻至室溫。在2小時之後形成晶體且將混合物冷卻至10°C保持1小時，然後藉由真空過濾收集固體並使用冷(10°C)乙酸乙酯洗滌。此提供70 g灰白色結晶固體形式之期望產物。將濾液在真空下濃縮至1.5 L且將混合物在10°C下攪拌1.5小時。在真空下過濾混合物以提供淺褐色結晶固體，藉由NMR展示其為甲苯磺酸二甲基吡啶鎘。在真空下濃縮濾液以提供褐色糖漿(161 g)。向糖漿中添加庚烷且加熱混合物。添加最少量之乙酸乙酯直至材料溶解為止。將溶液冷卻至室溫且然後置於冷凍器中。藉由真空過濾收集所得固體並使用冷(0°C)乙酸乙酯洗滌以提供灰白色結晶固體形式之期望產物(34g)。濃縮濾液以提供深褐色油狀物並藉由急驟層析在矽膠上(1.5 kg SiO₂管柱，存於己烷中之20%至100%丙酮之梯度洗脫)純化以提供淺褐色糖漿形式之期望產物(73 g)。

¹H NMR(500MHz, CDCl₃, δ ppm): -0.3至-0.2 (m, 2H), 0.06-0.11 (m, 1H), 0.31-0.36 (m, 1H), 0.38-0.43 (m, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.91 (dd, *J*= 3.7及13.9 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.64 (dd, *J*= 7.3及13.7 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J*= 7.6及13.7 Hz, 1H), 2.95 (t, *J*= 13.9 Hz, 1H), 3.32 (dt, *J*= 3.7及10.8 Hz, 1H), 4.47 (t, *J*= 8.6 Hz, 1H), 4.57-4.62 (m, 1H), 5.32 (d, *J*= 16.9 Hz, 1H), 5.35 (d, *J*= 10.3 Hz, 1H), 5.46 (t, *J*= 9.5 Hz, 1H), 5.82 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H), 5.84-5.93 (m, 1H), 6.94 (br s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.14-7.20 (m, 5H), 7.28-7.40 (m, 3H), 7.88 (d, *J*= 8.1 Hz, 2H))。MS (ESI) 440.1 [M+ H]⁺。

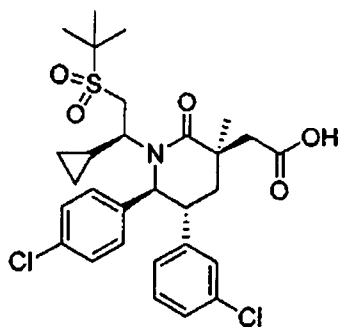
步驟G. (3*S*,5*R*,6*S*)-3-烯丙基-1-((*S*)-2-(第三丁基硫基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮



在室溫下，將2-甲基-2-丙烷硫醇(0.195 mL, 1.796 mmol，藉由活化4 Å分子篩乾燥)添加至存於無水四氫呋喃(4 mL)中之雙(三甲基矽烷基)醯胺鋰(1.0 M, 1.8 mL, 1.8 mmol，於四氫呋喃中)之溶液中。在60°C下加熱反應混合物。在60°C下保持15分鐘之後，添加固體形式之(3S,5S,6R,8S)-4-甲基苯磺酸8-烯丙基-6-(3-氯苯基)-5-(4-氯苯基)-3-環丙基-8-甲基-2,3,5,6,7,8-六氫噁唑并[3,2- α]吡啶-4-鎘(1.00 g, 1.632 mmol，實例1，步驟F)。將反應混合物在60°C下加熱12小時且然後冷卻至室溫並使用水稀釋。使用乙酸乙酯將溶液萃取三次且彙集有機物，使用鹽水洗滌，藉由硫酸鈉乾燥，傾析並在真空下濃縮以提供褐色油狀物。藉由急驟層析(80 g SiO₂管柱，存於己烷中之10%至60%乙酸乙酯之梯度洗脫)純化以提供無色糖漿形式之期望產物。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -0.88至-0.85 (m, 1H), -0.16至-0.13 (m, 1H), 0.22-0.27 (m, 1H), 0.39-0.44 (m, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.66-1.71 (m, 1H), 1.86 (dd, J = 3.2及13.5 Hz, 1H), 2.16 (t, J = 13.7, 1H), 2.21-2.27 (m, 1H), 2.60 (dd, J = 4.4及12.0 Hz, 1H), 2.65 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 3.12 (dt, J = 3.2及10.3 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 11.3 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 5.16-5.19 (m, 2H), 5.83-5.92 (m, 1H), 6.79 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.93-7.04 (m, 3H), 7.09-7.16 (m, 2H), 7.19-7.24 (m, 2H)。MS (ESI) 530.2 [M + H]⁺。

步驟H. 2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸

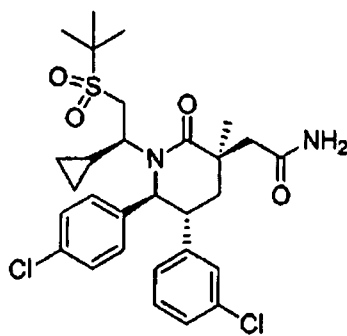


在18℃下，將水合氯化釕(III) (30.0 mg, 0.135 mmol)添加至存於乙酸乙酯(12 mL)、乙腈(12 mL)及水(18 mL)中之(3S,5R,6S)-3-烯丙基-1-((S)-2-(第三丁基硫基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮(3.25 g, 6.13 mmol，實例1，步驟H)及高碘酸鈉(1.33 g)之溶液中。溫度在添加後升至25℃。以5個1.33 g部分經30分鐘添加額外高碘酸鈉，同時維持溫度低於22℃。1.5小時之後之LCMS指示反應未完成，且添加高碘酸鈉(1當量)。在1.5小時之後，真空過濾反應混合物，使用乙酸乙酯洗滌，且分離各層。使用乙酸乙酯萃取水層且合併有機物，使用鹽水洗滌，藉由硫酸鎂乾燥，過濾並在真空下濃縮以提供綠色油狀物。藉由急驟層析(330 g SiO₂管柱，存於己烷中之0%至20%異丙醇之梯度洗脫)純化以提供白色固體形式之標題化合物。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -1.15至-1.05 (m, 1H), -0.35至-0.25 (m, 1H), 0.18-0.28 (m, 1H), 0.33-0.40 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.51 (s, 3H), 1.86 (dd, *J* = 2.7及13.7 Hz, 1H), 1.87-1.93 (m, 1H), 2.47 (t, *J* = 13.9, 1H), 2.72-2.76 (m, 1H), 2.76 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 2.93 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 3.12 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 3.12 (dt, *J* = 2.7及12.5 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.95 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 6.86-6.89 (m, 1H), 6.96 (br s, 1H), 7.08-7.14 (m, 3H), 7.15-7.35 (m, 3H)。MS (ESI) 580.2 [M + H]⁺。

實例2

2-((3*R*,5*R*,6*S*)-1-((*S*)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯
 苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙醯胺

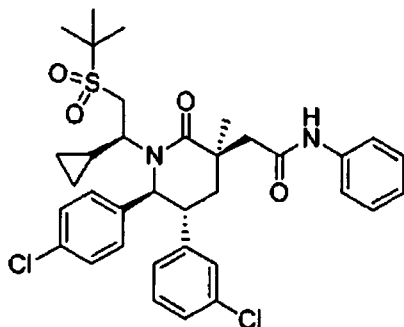


在室溫下，將草醯氯(0.033 mL, 0.379 mmol)添加至存於無水二
 氯甲烷(1.5 mL)中之2-((3*R*,5*R*,6*S*)-1-((5)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙
 基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙
 酸(0.200 g, 0.344 mmol，實例1，步驟H)之溶液中。將反應混合物在
 室溫下攪拌1小時且然後在真空下濃縮以提供白色發泡體形式之醯氯
 (206 mg)。在室溫下，添加雙(三甲基矽烷基)醯胺鋰(1.0 M，存於四
 氫呋喃中，0.516 mL, 0.516 mmol)及無水四氫呋喃(0.5 mL)。將反應
 混合物在室溫下攪拌5.5小時且然後使用1 N鹽酸稀釋並使用乙酸乙酯
 萃取三次。彙集有機物，使用鹽水洗滌，藉由硫酸鈉乾燥，傾析並在
 真空下濃縮以提供黃色發泡體。藉由急驟層析(12 g SiO₂管柱；35%至
 100%乙酸乙酯之梯度洗脫)純化以提供灰白色發泡體形式之標題化合
 物。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -1.10至-1.00 (m, 1H), -0.38至
 -0.325 (m, 1H), 0.17-0.26 (m, 1H), 0.30-0.38 (m, 1H), 1.43 (s, 3H), 1.44
 (s, 9H), 1.85-1.92 (m, 1H), 2.00 (dd, *J* = 2.7及13.5 Hz, 1H), 2.39 (t, *J* =
 13.7, 1H), 2.65-2.75 (m, 1H), 2.73-2.80 (m, 2H), 2.90-2.96 (m, 1H),
 3.31 (dt, *J* = 2.9及10.8 Hz, 1H), 4.30-4.38 (m, 1H), 4.96 (d, *J* = 10.8 Hz,
 1H), 5.63 (br s, 1H), 6.64 (br s, 1H), 6.90-6.91 (m, 1H), 7.00 (s, 2H),
 7.06-7.11 (m, 3H), 7.12-7.29 (m, 2H)。MS (ESI) 579.2 [M + H]⁺。

實例3

2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)-N-苯基乙醯胺

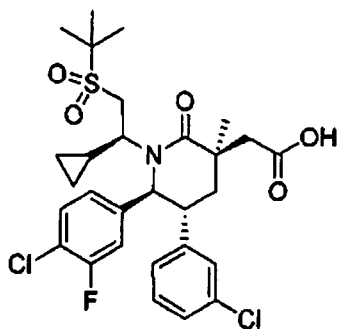


在0°C下，將*N*-(3-二甲基胺基丙基)-*N'*-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC, 0.117 g, 0.612 mmol)添加至2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸(0.118 g, 0.204 mmol，實例1，步驟H)及苯胺(0.020 mL, 0.225 mmol)之溶液中。在完成添加之後，自冰浴取出反應混合物並在室溫下攪拌19小時。使用冰冷1 M鹽酸稀釋反應混合物以將pH調節至1且使用乙醚將溶液萃取兩次。使用鹽水洗滌合併之有機層，藉由硫酸鈉乾燥，傾析並在真空下濃縮以提供橙色油狀物。藉由急驟層析(12 g SiO₂管柱，存於己烷中之15%至100%乙酸乙酯之梯度洗脫)純化以提供白色發泡體形式之標題化合物。

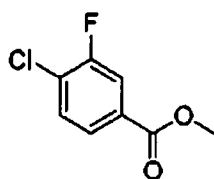
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -1.32至-1.20 (m, 1H), -0.40至-0.28 (m, 1H), -0.28至-0.10 (m, 1H), 0.30-0.40 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.47 (s, 3H), 1.94 (br s, 1H), 2.07 (dd, *J* = 2.7及13.7 Hz, 1H), 2.39 (t, *J* = 13.7, 1H), 2.67-2.73 (m, 2H), 2.95 (t, *J* = 13.5 Hz, 2H), 3.30 (dt, *J* = 2.7及11.0 Hz, 1H), 4.31 (br t, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 6.86-6.89 (m, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.02-7.09 (m, 6 H), 7.17 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H)。MS (ESI) 655.3 [M + H]⁺。

實例4

2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸



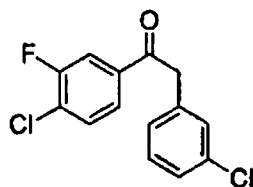
步驟A. 4-氯-3-氟苯甲酸甲酯



將存於甲醇(4.5 L)中之4-氯-3-氟苯甲酸(450.0 g, 2.586 mol, Fluororochem, Derbyshire, UK)之溶液冷卻至0°C且經30分鐘添加亞硫酸氯(450.0 mL)。將反應混合物在環境溫度下攪拌12小時。藉由TLC監測反應。在完成後，在減壓下去除溶劑且使用1.0 M碳酸氫鈉溶液(500 mL)將殘餘物驟冷。使用二氯甲烷(2 × 5.0 L)萃取水層。使用鹽水(2.5 L)洗滌合併之有機層，藉由無水硫酸鈉乾燥並在減壓下濃縮以提供淺褐色固體形式之標題化合物。粗製化合物未經進一步純化即用於下一步驟中。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.82-7.74 (m, 2H), 7.46 (dd, *J* = 8.2, 7.5 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H)。

步驟B. 1-(4-氯-3-氟苯基)-2-(3-氯苯基)乙酮

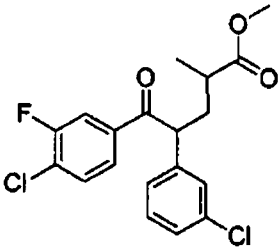


在-78°C及氮下經1小時，將雙(三甲基矽烷基)醯胺鈉(1 M，存於

四氫呋喃中，4 L, 4000 mmol)添加至存於無水四氫呋喃(1.75 L)中之3-氯苯基乙酸(250.0 g, 1465 mmol)之溶液中。將所得反應混合物在-78℃下再攪拌一小時。然後，在-78℃下經1小時，添加存於四氫呋喃(500 mL)中之4-氯-3-氟苯甲酸甲酯(221.0 g, 1175 mmol，實例4，步驟A)之溶液，且將所得反應混合物在相同溫度下攪拌2小時。藉由TLC監測反應。在完成後，使用2 N鹽酸(2.5 L)將反應混合物驟冷且使用乙酸乙酯(2 × 2.5 L)萃取水相。使用鹽水(2.5 L)洗滌合併之有機層，藉由無水硫酸鈉乾燥並在減壓下濃縮以提供粗製材料，藉由急驟管柱層析(矽膠：100網目至200網目，在存於己烷中之2%乙酸乙酯中洗脫之產物)純化該粗製材料以提供白色固體形式之標題化合物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.74 (ddd, *J*= 10.1, 8.9, 1.8 Hz, 2H), 7.56-7.48 (m, 1H), 7.26 (t, *J*= 6.4 Hz, 3H), 7.12 (d, *J*= 5.7 Hz, 1H), 4.22 (s, 2H)。MS (ESI) 282.9 [M + H]⁺。

步驟C. 5-(4-氯-3-氟苯基)-4-(3-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯

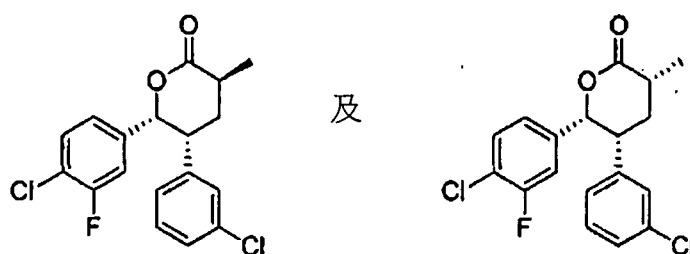


在0℃下，將甲基丙烯酸甲酯(125.0 g, 1097 mmol)及第三丁醇鉀(1 M，存於四氫呋喃中，115 mL，115 mmol)依序添加至存於無水四氫呋喃(2.61 L)中之1-(4-氯-3-氟苯基)-2-(3-氯苯基)乙酮(327.0 g, 1160 mmol，實例4，步驟B)之溶液中。將反應混合物在0℃下攪拌1小時且然後升溫至環境溫度並攪拌12小時。在完成後，使用水(1.0 L)終止反應並使用乙酸乙酯(2 × 2.5 L)萃取。使用鹽水洗滌合併之有機層，藉由無水硫酸鈉乾燥並在減壓下濃縮以得到粗製材料，藉由急驟管柱層

析(矽膠：60網目至120網目，在存於己烷中之4%乙酸乙酯中洗脫之產物)純化該粗製材料以提供淺黃色液體形式之標題化合物(非對映異構體混合物)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.74-7.61 (m, 4H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.28-7.18 (m, 6H), 7.16-7.10 (m, 2H), 4.56 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 2.50-2.39 (m, 2H), 2.37-2.25 (m, 2H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.94 (ddd, $J = 13.6, 9.1, 4.2$ Hz, 1H), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H)。MS (ESI) 383.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

步驟D. (3S,5R,6R)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮及(3R,5R,6R)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮



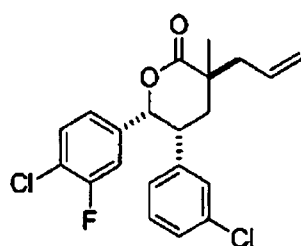
在裝填有5-(4-氯-3-氟苯基)-4-(3-氯苯基)-2-甲基-5-側氧基戊酸甲酯(138.0 g, 360 mmol, 實例4, 步驟C) (在轉移至手套袋中之前將其在冰上冷卻10分鐘)之2000 mL反應器皿中, 依序添加無水2-丙醇(500 mL)及第三丁醇鉀(16.16 g, 144 mmol)同時使密封手套袋處於氬下。將此混合物攪拌30分鐘。添加存於30.0 mL甲苯中之 $\text{RuCl}_2(\text{S-xylbinap})(\text{S-DAIPEN})$ (1.759 g, 1.440 mmol, Strem Chemicals公司, Newburyport, MA, 稱量於手套袋中)。將反應液在室溫下劇烈攪拌2小時。將器皿置於氬化裝置上, 使用氬吹掃3次並加壓至50 psi (344.7 kPa)。將反應液在室溫下攪拌過夜。在完成後, 使用水(1.5 L)終止反應並使用乙酸乙酯(2 × 2.5 L)萃取。使用鹽水(1.5 L)洗滌有機層, 藉由無水硫酸鈉乾燥並在減壓下濃縮以得到粗製材料, 藉由急驟管柱層

析(矽膠；60-120網目；在存於己烷中之12%乙酸乙酯中洗脫之產物)純化該粗製材料以提供非對映異構體混合物形式之深色液體。

將產物(240.0 g, 581 mmol)溶於四氫呋喃(1.9 L)及甲醇(480 mL)中，且添加單水合氫氧化鋰(2.5 M水溶液，480.0 mL)。將反應混合物在環境溫度下攪拌12小時。在完成後，在減壓下去除溶劑且使用2 N鹽酸將殘餘物酸化至pH介於5與6之間。使用乙酸乙酯(2 × 1.0 L)萃取水相。使用鹽水(750 mL)洗滌合併之有機層，藉由無水硫酸鈉乾燥，過濾，並在減壓下濃縮以提供深色液體，其未經進一步純化即使用。

將一部分粗製中間體(25.4 g，主要係塞科酸)添加至配備有迪安-斯脫克裝置(Dean-Stark apparatus)之500 mL圓底燒瓶中。添加對甲苯磺酸吡啶鎢(0.516 g, 2.053 mmol)及甲苯(274 mL)，且將混合物回流1小時(油浴溫度為約150°C)。將反應液冷卻至室溫並在減壓下濃縮。使用碳酸氫鈉飽和水溶液(150 mL)稀釋反應液，使用二乙醚(2 × 150 mL)萃取，並使用鹽水(150 mL)洗滌。藉由硫酸鎂乾燥合併之有機層，過濾並在減壓下濃縮。藉由急驟管柱層析(分成3部分，330 g SiO₂/each，存於己烷中之0%至30%丙酮之梯度洗脫，35分鐘)純化以提供淡黃色固體形式之標題化合物及C2處之非對映異構體之1:1.6混合物。MS (ESI) 353.05 [M + H]⁺。

步驟E. (3S,5R,6R)-3-烯丙基-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮

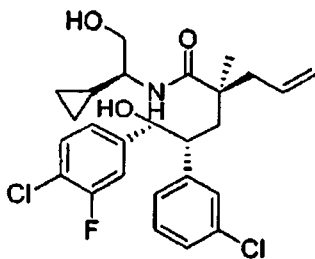


將(3S,5R,6R)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮及(3R,5R,6R)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-

吡喃-2-酮(18 g, 51.0 mmol, 實例4, 步驟D)添加至烘乾之500 mL圓底燒瓶中。將固體溶於無水甲苯中並濃縮以去除外來水。添加存於四氫呋喃(200 mL)中之3-溴丙-1-烯(11.02 mL, 127 mmol, 在添加之前以純淨形式通過鹼性氧化鋁)且對反應器皿進行真空處理並使用氬再填充三次。在-40°C (乾冰/乙腈浴)下逐滴添加雙(三甲基矽烷基)醯胺鋰(1.0 M, 56.1 mL, 56.1 mmol)並在氬下攪拌。將反應液逐漸升溫至-10°C並在-10°C下攪拌3小時。使用飽和氯化銨(10 mL)終止反應, 濃縮, 且在水(150 mL)及二乙醚(200 mL)中稀釋粗產物。分離各層且使用二乙醚(200 mL/每次)將水層再洗滌兩次。使用鹽水(100 mL)洗滌合併之有機層, 藉由硫酸鎂乾燥, 過濾, 並在減壓下濃縮成殘餘物。藉由急驟層析(2 × 330 g矽膠管柱, 存於己烷中之0%至30%丙酮之梯度洗脫)純化殘餘物以提供白色固體形式之標題化合物。另一選擇為, 可自最少量存於二氯甲烷中之己烷使產物結晶。藉由對掌性SFC (90% CO₂, 10%甲醇(20 mM氨), 5.0 mL/min, 100巴(10,000 kPa), 40°C, 5分鐘方法, Phenomenex Lux-2 (Phenomenex, Torrance, CA) (100 mm × 4.6 mm, 5 μm管柱), 滯留時間: 1.62 min. (次要產物)及2.17 min. (主要產物))測得對映異構體過量為87%。可經由在己烷及二氯甲烷中重結晶來將純度升級至> 98%。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.24-7.17 (m, 3H), 6.94 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 10.0, 1.9 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.90-5.76 (m, 1H), 5.69 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.20-5.13 (m, 2H), 3.81 (dd, *J* = 13.9, 6.9 Hz, 1H), 2.62 (dd, *J* = 13.8, 7.6 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J* = 13.8, 7.3 Hz, 1H), 1.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 1.40 (s, 3H)。MS (ESI) 393.1 [M + H]⁺。

步驟F. (2*S*)-2-((2*R*)-3-(4-氯-3-氟苯基)-2-(3-氯苯基)-3-羥丙基)-*N*-((*S*)-1-環丙基-2-羥乙基)-2-甲基戊-4-烯醯胺



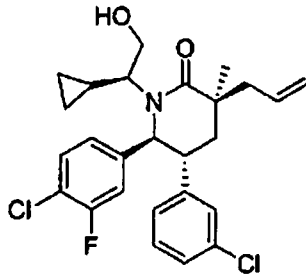
在0°C下，將甲醇鈉(25%，存於甲醇中，60.7 ml, 265 mmol)添加至存於甲醇(177 mL)中之(S)-2-胺基-2-環丙基乙醇鹽酸鹽(36.5 g, 265 mmol, NetChem公司，Ontario, Canada)之溶液中。在添加期間形成沈澱物。在完成添加之後，自冰浴取出反應混合物並升溫至室溫。在真空下過濾反應混合物且使用二氯甲烷洗滌固體。在真空下濃縮濾液以提供渾濁褐色油狀物。將油狀物吸收於二氯甲烷(150 mL)中，在真空下過濾並使用二氯甲烷洗滌固相以提供澄清橙色溶液形式之濾液。在真空下濃縮溶液以提供淺褐色液體形式之(S)-2-胺基-2-環丙基乙醇。

將(3S,5R,6R)-3-烯丙基-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基四氫-2H-吡喃-2-酮(32 g, 81 mmol，實例4，步驟E)與(S)-2-胺基-2-環丙基乙醇(26.7 g, 265 mmol)合併且將懸浮液在100°C下加熱過夜。將反應混合物冷卻至室溫，使用乙酸乙酯稀釋並使用1 N鹽酸(2 ×)、水及鹽水洗滌。藉由硫酸鎂乾燥有機層並在真空下濃縮以提供白色固體形式之標題化合物。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 0.23-0.30 (m, 2H), 0.45-0.56 (m, 2H), 0.81 (m, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.92-2.09 (m, 3H), 2.39 (dd, J = 13.6, 7.2 Hz, 1H), 2.86 (br s, 1H), 2.95 (dtd, J = 9.5, 6.3, 6.3, 2.9 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 11.0, 5.6 Hz, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.61 (dd, J = 11.0, 2.9 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.95-5.13 (m, 2H), 5.63 (m, 1H), 5.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.94-7.16 (m, 3H), 7.16-7.32 (m, 4H)。MS (ESI) 494 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

步驟G. (3S,5R,6R)-3-烯丙基-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-1-

((S)-1-環丙基-2-羥乙基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮

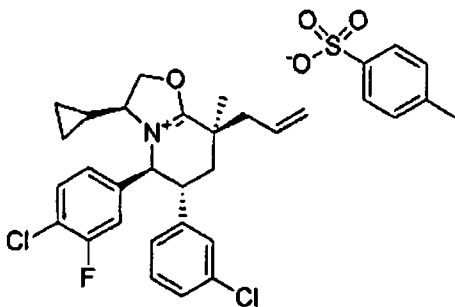


在0℃下，向存於二氯甲烷(80 mL)中之(2S)-2-((2R)-3-(4-氯-3-氟苯基)-2-(3-氯苯基)-3-羥丙基)-N-((S)-1-環丙基-2-羥乙基)-2-甲基戊-4-烯醯胺(40.2 g, 81 mmol，實例4，步驟F)之溶液中添加存於二氯甲烷(220 mL)中之對甲苯磺酸酐(66.3 g, 203 mmol)，且將反應混合物在相同溫度下攪拌10分鐘。在0℃下，經由加料漏斗逐滴添加2,6-二甲基吡啶(43.6 mL, 374 mmol, Aldrich, St. Louis, MO)。將反應混合物緩慢升溫至室溫，且然後在回流下攪拌。在24小時之後，連續添加存於水(600 mL)及1,2-二氯乙烷(300 mL)中之碳酸氫鈉(68.3 g, 814 mmol)。將反應混合物在回流下加熱一小時且然後冷卻至室溫。分離各層且使用二氯甲烷萃取水層。使用1 N鹽酸、水及鹽水洗滌合併之有機層，然後在減壓下濃縮。藉由急驟層析(1.5 kg SiO₂管柱，存於己烷中之10%至50%乙酸乙酯之梯度洗脫)純化殘餘物以提供白色固體形式之標題化合物。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0.06 (m, 1H), 0.26 (m, 1H), 0.57-0.67 (m, 2H), 0.85 (m, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.85-2.20 (m, 2H), 2.57-2.65 (m, 2H), 3.09 (ddd, *J*= 11.8, 9.8, 4.8 Hz, 1H), 3.19 (t, *J*= 10.0 Hz, 1H), 3.36 (td, *J*= 10.3, 4.6 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J*= 11.0, 4.6 Hz, 1H), 4.86 (d, *J*= 10.0 Hz, 1H), 5.16-5.19 (m, 2H), 5.87 (m, 1H), 6.77 (dd, *J*= 7.7, 1.6 Hz, 1H), 6.80-6.90 (m, 2H), 7.02 (t, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J*= 10.0, 7.7 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J*= 10.0, 1.6 Hz, 1H), 7.29 (t, *J*= 10.0 Hz,

1H)。MS (ESI) 476 [M + H]⁺。

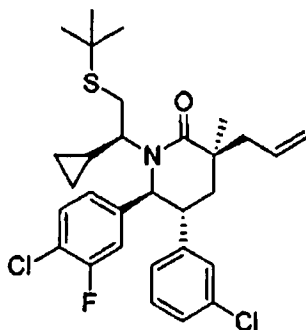
步驟H. (3S,5S,6R,8S)-4-甲基苯磺酸8-烯丙基-5-(4-氯-3-氟苯基)-6-(3-氯苯基)-3-環丙基-8-甲基-2,3,5,6,7,8-六氫噁唑并[3,2-α]吡啶-4-鎢



將單水合對甲苯磺酸(30.3 g, 159 mmol, Aldrich, St. Louis, MO)添加至存於甲苯(386 mL)中之(3S,5R,6S)-3-烯丙基-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-1-((S)-1-環丙基-2-羥乙基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮(73.6 g, 154 mmol)之溶液中。使用迪安-斯脫克裝置在回流下加熱反應混合物。在4小時之後，冷卻反應液並在減壓下濃縮以提供淡黃色形式之糖漿標題化合物。粗產物未經進一步純化即用於下一步驟中。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -0.25至-0.10 (m, 2H), 0.08-0.18 (m, 1H), 0.33-0.50 (m, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.92 (dd, J= 3.7及13.9 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.63 (dd, J= 7.3及13.7 Hz, 1H), 2.72 (dd, J= 7.6及13.7 Hz, 1H), 2.93 (t, J= 13.7 Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 4.51 (t, J= 8.6 Hz, 1H), 4.57-4.63 (m, 1H), 5.33 (d, J= 17.1 Hz, 1H), 5.37 (d, J= 10.5 Hz, 1H), 5.47 (dd, J= 9.1及10.0 Hz, 1H), 5.75-5.93 (m, 2H), 6.80 (br s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.16-7.20 (m, 5H), 7.25-7.32 (m, 2H), 7.87 (d, J= 8.3 Hz, 2H). MS (ESI) 458 [M + H]⁺。

步驟I. (3S,5R,6S)-3-烯丙基-1-((S)-2-(第三丁基硫基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮

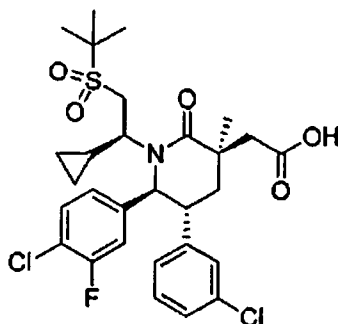


在室溫及氬下於500 mL圓底燒瓶中，將2-甲基-2-丙烷硫醇(15.25 mL, 135 mmol，藉由活化4 Å分子篩乾燥)添加至存於四氫呋喃中之雙(三甲基矽烷基)醯胺鋰(1.0 M, 135 mL, 135 mmol)之溶液中。將反應混合物加熱至60°C。在30分鐘之後，經由套管添加存於無水四氫呋喃(100 mL)中之(3S,5S,6R,8S)-4-甲基苯磺酸8-烯丙基-5-(4-氯-3-氟苯基)-6-(3-氯苯基)-3-環丙基-8-甲基-2,3,5,6,7,8-六氫噁唑并[3,2- α]吡啶-4-鎘(78 g, 123 mmol，實例4，步驟H)之溶液。將反應混合物在60°C下加熱3小時且然後冷卻至室溫。使用水將反應混合物驟冷並使用乙酸乙酯萃取三次。彙集有機物，使用鹽水洗滌，藉由硫酸鎂乾燥，過濾並在真空下濃縮以提供黃色發泡體。藉由急驟管柱層析(1.5 kg SiO₂管柱，使用存於己烷中之5%至30%乙酸乙酯之梯度洗脫)純化以提供灰白色發泡體形式之標題化合物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): -0.89至-0.80 (m, 1H), -0.15至-0.09 (m, 1H), 0.27-0.34 (m, 1H), 0.41-0.48 (m, 1H), 1.28 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.70-1.77 (m, 1H), 1.86 (dd, J = 3.1及13.5 Hz, 1H), 2.16 (t, J = 13.7, 1H), 2.17-2.23 (m, 1H), 2.60-2.63 (m, 3H), 3.09 (dt, J = 3.1及10.4 Hz, 1H), 3.62 (t, J = 11.1 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.19-5.21 (m, 1H), 5.82-5.93 (m, 1H), 6.65-6.80 (m, 1H), 6.80-6.83 (m, 1H), 6.84-6.98 (m, 1H), 7.05-7.07 (m, 1H), 7.12-7.18 (m, 2H), 7.19-7.26 (m, 1H)。MS (ESI) 548.2 [M + H]⁺。

步驟J. 2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-

6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸



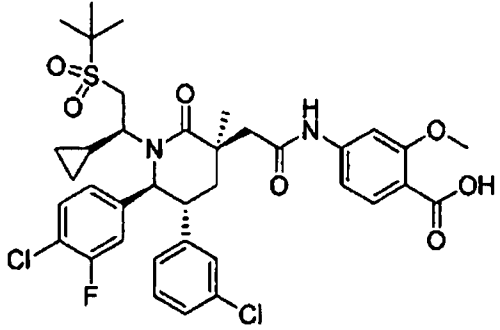
在20℃下，將水合氯化釕(III) (0.562 mg, 2.493 mmol)添加至存於乙酸乙酯(216 mL)、乙腈(216 mL)及水(324 mL)中之(3S,5R,6S)-3-烯丙基-1-((S)-2-(第三丁基硫基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基六氫吡啶-2-酮(62.17 g, 113 mmol，實例4，步驟I)及高碘酸鈉(24.67 g)之混合物中。溫度迅速升至29℃。將反應混合物冷卻至20℃且以5個24.67 g部分經2小時添加剩餘當量之高碘酸鈉，同時小心維持內部反應溫度低於25℃。反應未完成，因此添加額外高碘酸鈉(13 g)。溫度自22℃升至25℃。在再攪拌1.5小時之後，在真空下過濾反應混合物並使用乙酸乙酯洗滌。分離各層且使用乙酸乙酯萃取水層。彙集有機物，使用鹽水洗滌，藉由硫酸鎂乾燥，過濾並在真空下濃縮以提供深綠色發泡體。藉由急驟管柱層析(1.5 kg SiO₂管柱，存於己烷中之0%至20%異丙醇之梯度洗脫)純化以提供灰白色發泡體。向發泡體中添加存於庚烷中之15%乙酸乙酯(970 mL)，且在80℃下加熱混合物直至發泡體溶解為止。然後緩慢冷卻溶液，且在60℃下使用先前所獲得之結晶材料對溶液實施接種。將混合物冷卻至室溫且然後在室溫下靜置2小時，然後藉由真空過濾收集固體以提供具有極淡粉紅色色彩之白色固體(57.1 g)。在真空下濃縮母液以提供粉紅色發泡體(8.7 g)。向發泡體中添加存於庚烷中之15%乙酸乙酯(130 mL)，且將其於80℃下加熱以完全溶解材料。冷卻溶液，且在50℃下使用結晶材料對其實施接種。在冷卻至室溫之後，藉由真空過濾收集固體以提供

具有極淡粉紅色色彩之白色結晶固體。

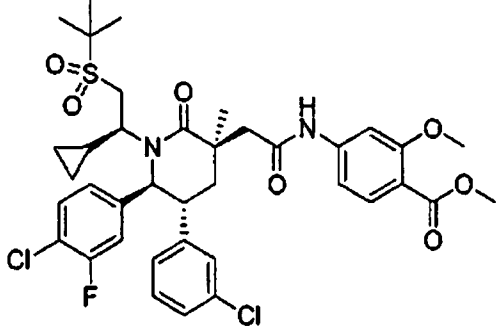
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): -1.10至-1.00 (m, 1H), -0.30至-0.22 (m, 1H), 0.27-0.37 (m, 1H), 0.38-0.43 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.50 (s, 3H), 1.87 (dd, *J*= 2.7及13.7 Hz, 1H), 1.89-1.95 (m, 1H), 2.46 (t, *J*= 13.7, 1H), 2.69-2.73 (m, 1H), 2.78 (d, *J*= 14.9 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J*= 2.0及13.7 Hz, 1H), 3.07 (d, *J*= 14.9 Hz, 1H), 3.11 (dt, *J*= 2.7及11.0 Hz, 1H), 4.30 (t, *J*= 13.5 Hz, 1H), 4.98 (d, *J*= 10.8 Hz, 1H), 6.75-6.87 (m, 1H), 6.88-6.90 (m, 1H), 6.98 (br s, 1H), 7.02-7.09 (m, 1H), 7.11-7.16 (m, 2H), 7.16-7.25 (m, 1H)。MS (ESI) 598.1 [M + H]⁺。

實例5

4-(2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙醯胺基)-2-甲氧基苯甲酸



步驟 A. 4-(2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙醯胺基)-2-甲氧基苯甲酸甲酯



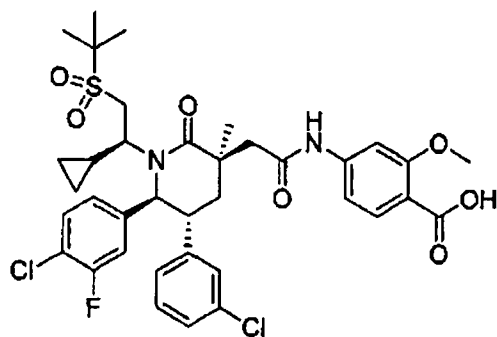
在3℃下，將N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽

(EDC, 76 g, 398 mmol)添加至存於吡啶(332 mL)中之2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙酸(79.4 g, 133 mmol, 實例4, 步驟J)及4-胺基-2-甲氧基苯甲酸甲酯(26.4 g, 146 mmol)之混合物中。將混合物升溫至室溫且在室溫下攪拌16小時。

將反應混合物冷卻至0°C並添加至1 M鹽酸之冰冷溶液(1 L)中。添加乙醚(1 L)並攪動各層且然後分離。使用1 M鹽酸(6 × 500 mL)、碳酸氫鈉飽和水溶液(500 mL)、鹽水(500 mL)洗滌有機層, 藉由硫酸鎂乾燥, 過濾並在真空下濃縮以提供灰白色發泡體。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): -1.20至-1.12 (m, 1H), -0.35至-0.20 (m, 1H), 0.05-0.20 (m, 1H), 0.32-0.45 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.48 (s, 3H), 1.86-1.98 (m, 1H), 2.03 (dd, J = 2.7及13.7 Hz, 1H), 2.43 (t, J = 13.7, 1H), 2.64-2.75 (m, 1H), 2.80 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 2.89-2.96 (m, 2H), 3.24 (dt, J = 2.5及10.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.28-4.36 (m, 1H), 4.98 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 6.85-6.93 (m, 3H), 6.99 (br s, 1H), 7.06-7.18 (m, 4 H), 7.82 (br s, 1H), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.81 (br s, 1H)。MS (ESI) 761.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

步驟B. 4-(2-((3R,5R,6S)-1-((S)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙醯胺基)-2-甲氧基苯甲酸



在室溫下, 將存於水(295 mL)中之單水合氫氧化物鋰(18.2 g, 433

mmol)之溶液添加至存於四氫呋喃(591 mL)及甲醇(197 mL)中之4-(2-((3R,5R,6S)-1-((5)-2-(第三丁基磺醯基)-1-環丙基乙基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(3-氯苯基)-3-甲基-2-側氧基六氫吡啶-3-基)乙醯胺基)-2-甲氧基苯甲酸甲酯(164.9 g, 217 mmol, 實例5, 步驟A)之溶液中。在室溫下攪拌15小時之後, 痕量酯剩餘, 因此將反應混合物在50°C下加熱1小時。在反應完成時, 在真空下濃縮混合物以去除四氫呋喃及甲醇。

使用水(1 L)稀釋稠混合物且添加1 M鹽酸(1 L)。藉由在布氏漏斗(Büchner funnel)中真空過濾來收集所得白色固體。去除真空, 且將水(1 L)添加至濾餅中。使用刮勺攪拌材料以將其均勻懸浮於水中。然後藉由真空過濾去除液體。將此洗滌循環再重複三次以提供白色固體。將固體在真空及45°C下乾燥3天以提供白色固體形式之標題化合物。

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm -1.30至-1.12 (m, 1H), -0.30至-0.13 (m, 1H), 0.14-0.25 (m, 1H), 0.25-0.38 (m, 1H), 1.30 (s, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.75-1.86 (m, 1H), 2.08-2.18 (m, 2H), 2.50-2.60 (m, 1H), 2.66 (d, J = 13.7, 1H), 3.02-3.16 (m, 2H), 3.40-3.50 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.05-4.20 (m, 1H), 4.89 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 6.90-6.93 (m, 3H), 7.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.22-7.26 (m, 3H), 7.40-7.50 (m, 1H), 7.54 (br s, 1H), 7.68 (d, J = 8.6 Hz, 1H) 10.44 (s, 1H), 12.29 (br s, 1H)。MS (ESI) 747.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

生物分析

均相時間解析螢光分析(HTRF1及HTRF2分析)

用於活體外HTRF分析之標準分析條件由存於黑色384孔Costar聚丙烯酸板中以下部分中之50 μl 總反應體積組成: 1 $\times$ pH 7.4 PBS緩衝液、1 mM DTT、0.1% BSA、2.5 nM GST-hMDM2 (aa 1-188)、5 nM生物素化p53 (aa 1-83)、1.8 nM SA-XLent (Cisbio; Bedford, MA)、0.6 nM抗GST穴狀化合物單株抗體(Cisbio; Bedford, MA)及200 mM KF。

人類MDM2之胺基酸殘基1-188在大腸桿菌(*Escherichia coli*)中表現為胺基末端谷胱甘肽S-轉移酶(GST)融合蛋白(GST-hMDM2)。人類p53之殘基1-83在大腸桿菌中表現為胺基末端AviTag™-TrxA-6xHis融合蛋白(生物素化p53)。藉由親和層析自細胞團純化每一蛋白質。

具體而言，將10 μ L GST-hMDM2與10 μ l經稀釋化合物(各種濃度，連續稀釋)在室溫下於10% DMSO中一起培育20分鐘。將20 μ L生物素化p53添加至GST-hMDM2 +化合物混合物中，且然後在室溫下培育60分鐘。將10 μ L檢測緩衝液(由SA-XLent、抗GST穴狀化合物抗體及KF組成)添加至GST-hMDM2、生物素化p53及化合物反應液中並置於室溫下以達成平衡>4小時。反應液中之DMSO之最終濃度為2%。在微量板多標記讀數儀上量測時間解析螢光讀數。相對於nutlin-3計算抑制百分比。

對於HTRF2分析而言，所有分析條件與上文所闡述保持相同，只是試劑濃度具有下列變化：0.2 nM GST-hMDM2 (1-188)、0.5 nM生物素化p53 (1-83)、0.18 nM SA-XLent及100 mM KF。

EdU分析

以 2.8×10^3 個細胞/孔之密度將SJSA-1細胞平鋪於384孔細胞培養板中之40 μ L生長培養基中並在37°C及5% CO₂下培育24小時。生長培養基由補充有10 mM HEPES、1 mM丙酮酸鈉、1X青黴素(Penicillin)-鏈黴素(Streptomycin)、2 mM麩醯胺酸及10% FBS之RPMI 1640培養基(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)組成。

第二天，去除生長培養基且替換為由補充有10 mM HEPES、1 mM丙酮酸鈉、1 X青黴素-鏈黴素、2 mM麩醯胺酸及10%人類血清之RPMI 1640組成之化合物培養基。將溶於DMSO中之測試化合物稀釋於化合物培養基中並添加至細胞至直至濃度範圍為33 μ M至3 pM。使用化合物將細胞在37°C及5% CO₂下處理16小時。在第3天，在化合物

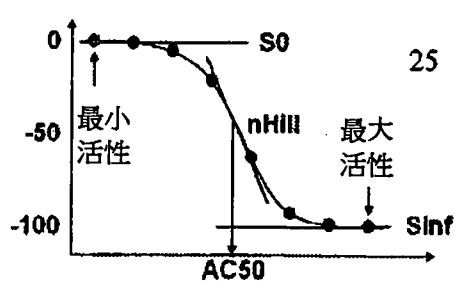
處理之後，使用Click-It EdU HCS分析測定細胞增殖狀態。將溶於化合物培養基中之EdU添加至細胞中直至最終濃度為10 μM。然後將細胞在37℃及5% CO₂下培育1小時。在EdU標記之後，根據製造商說明書實施Click-It EdU HCS分析程序，其中將分析體積減小至25 μL以調節用於384孔格式。簡言之，藉由4%甲醛固定細胞並使用存於PBS中之0.1% Triton-X 100透化。在使用PBS洗滌之後，依序使用Click-It反應緩衝液及NuclearMask™藍色染色劑處理細胞。然後洗滌細胞並使用Opera高內涵篩選系統(PerkinElmer Life and Analytical Sciences)成像。計算EdU納入細胞之百分比並用於IC₅₀計算。

自Life Technologies (Grand Island, NY)獲得Click-It EdU HCS分析套組，自Cellgro (Manassas, VA)獲得RPMI1640、L-麩醯胺酸、HEPES及丙酮酸鈉。自PerkinElmer Life及 Analytical Sciences (Waltham, MA)獲得384孔細胞培養板。自HyClone/ThermoFisher Scientific (Logan, UT)獲得FBS，且自Bioreclamation (Hicksville, NY)獲得人類血清。自ATCC (Manassas, VA)獲得SJSA-1細胞系。

將來自DMSO處理孔之值正規化為POC (對照百分比) = 100，且將來自非EdU標記細胞之值正規化為POC = 0。藉由使用Genedata Screener V9.0.1來測定IC₅₀值。Genedata Screener中用於劑量反應數據分析之曲線擬合演算法通常實施稱為ROUT (離群檢測之穩健回歸)之穩健曲線擬合演算法且使用4參數邏輯(4PL)希爾模型(Hill model)。此演算法實施穩健、非線性回歸，分析數據點之殘差以檢測離群值，且然後實施簡單曲線擬合，其中忽略先前定義為離群值之數據點。

模型：

$$y = S_{\text{inf}} + \frac{S_0 - S_{\text{inf}}}{1 + 10^{(\log AC_{50} - \log x) n_{\text{Hill}}}}$$



ROUT實施方案擬合4個擬合參數(S_0 、 S_{inf} 、AC50 IP、 $nHill$)且返回該4個擬合參數及擬合結果(最大活性、AC50 Transit)以及其95%置信區間：

擬合參數	說明
S_0	在不存在化合物下之信號
S_{inf}	在無窮化合物濃度下之信號
AC50 IP	在拐點處之濃度(相對AC50)
$nHill$	希爾參數；在拐點處之斜率

結果	說明
最大活性	在所測試最大(未經遮蔽)濃度下之值(c_{max})
AC50 Transit	擬合曲線穿過50%活性之濃度(絕對AC50)

人類肝細胞固有澄清率分析

使用自20個供體彙集之經冷藏保存之人類肝細胞(Celsis-In Vitro Technologies, Baltimore, MD)測定實例化合物之固有澄清率。所培育肝細胞之存活率為70%至75%。將每一實例化合物以500 nM之濃度在含有密度為1百萬個細胞/mL之肝細胞之細胞培養基(Celsis-In Vitro Technologies, Baltimore, MD)中培育。製備用於每一時間點之一份培育混合物等分試樣(100 μ L)。在95%空氣及5% CO_2 氣氛下於37 $^{\circ}C$ 培育器中在100%相對濕度及1400 rpm振盪下實施培育。在0、5、15、

30、60及90分鐘時，自培育器取出培育混合物之等分試樣，且使用含有0.1 % (v/v)甲酸及內部標準(7-羥基-4-三氟甲基香豆素)之乙腈驟冷。然後在5700 rpm (6100 g)及4℃下將試樣離心10分鐘。將上清液轉移至試樣板中，與等體積之含有0.1%甲酸之水混合，並使用LC-MS/MS分析。

用於試樣分析之LC-MS/MS系統由反相UHPLC (Shimadzu模型Nexera LC-30AD，Shimadzu Scientific Instruments公司，Columbia, MD)組成，該反相UHPLC界接有以負離子模式操作之API4000三重四極質譜儀(Applied Biosystems, 公司，Foster City, CA)。使用Phenomenex Kinetex Luna C₁₈管柱(Phenomenex, Torrance, CA) (2 × 50 mm, 2.6 μm，維持於55℃下，使用1.2 mL/min之流動相流速)來達成層析分離。流動相由存於水中之0.1%甲酸(A)及存於乙腈中之0.1%甲酸(B)組成。如下所述來應用梯度洗脫程式：首先以0.8分鐘內自95% A/5% B以線性方式增加至5% A/95% B並在5% A/95% B下保持0.2 min，然後在0.1分鐘內返回95% A/5% B並在此組成下再平衡額外之0.5分鐘，然後進行下一注射。使用適當多反應監測(MRM)轉變來檢測每一實例化合物，且使用MRM轉變 m/z 229.2 → 201.2來檢測內部標準(7-羥基-4-三氟甲基香豆素)。

基於下列方程式(Obach, 1997及1999)自實例化合物在肝細胞培育中之活體外 $t_{1/2}$ 來計算固有澄清率(CL_{int})：

$$CL_{int} = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

用於人類肝細胞固有澄清率分析及計算之參考文獻如下：

Ye Q., Jiang B.M., Chan H., Lixia J (準備公開) Optimization of Hepatocyte Intrinsic Clearance Assay for Human Metabolic Clearance Prediction: Impact of Assay Conditions on Prediction Accuracy。

Obach RS (1997) Nonspecific binding to microsomes: impact on scale-up of in vitro intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of warfarin, imipramine, and propranolol. *Drug Metab Dispos* 25: 1359-1369。

Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data. An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27: 1350-1359。

人類肝細胞CYP1A2、CYP2B6及CYP3A4誘導分析

材料。自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 購買奧美拉唑(Omeprazole)、苯巴比妥(phenobarbital)、利福平(rifampicin)、地塞米松(dexamethasone)、二甲基亞砷(DMSO)、克雷布斯-漢斯萊特緩衝液(Krebs Henseleit Buffer, KHB) (KHB之成份= 0.30 g/L七水硫酸鎂、0.16 g/L磷酸二氫鉀、0.36 g/L氯化鉀、6.95 g/L氯化鈉、2.1 g/L碳酸氫鈉、0.38 g/L二水合氯化鈣、12.6 mM 4-(2-羥乙基)-1-六氫吡嗪乙烷磺酸(HEPES)，該等成份存於組織培養水中)、非那西丁(phenacetin)、乙醯胺基酚(acetaminophen)、安非它酮鹽酸鹽(bupropion hydrochloride)、睪酮、6 β -羥基睪酮、哌唑嗪鹽酸鹽(prazosin hydrochloride)、細胞培養級水、達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)及威廉姆斯培養基E(William's Medium E, WME)。自Life Technologies (Grand Island, NY) 獲得胰島素-轉鐵蛋白-硒補充劑(ITS)、青黴素-鏈黴素-L-麩醯胺酸補充劑(PSG)、胎牛血清(FBS)、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、經冷藏保存之肝細胞恢復培養基(CHRM)及經冷藏保存之成人肝細胞之三個個別供體批次。自Becton Dickinson Labware (Bedford, MA)獲取膠原I預塗覆之24孔板及羥基安非它酮(hydroxybupropion)。自Affymetrix公司

(Santa Clara, CA)購買用於人類CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4及18S rRNA之分支DNA (b-DNA)探針組及Panomics Discovery XL套組。

活體外方法. 在第1天，藉由補充DMEM直至最終濃度為1X PSG、1X ITS、0.1 μ M地塞米松及10% FBS來製備肝細胞平板培養基(HPM)。藉由補充WME直至最終濃度為1X PSG、1X ITS及0.1 μ M地塞米松來調配肝細胞維持培養基(HMM)。藉由以下方式將經冷藏保存之人類肝細胞之小瓶解凍1.5分鐘至2分鐘：在37°C水浴中輕柔回蕩，立即將每一個別肝細胞批次置於CHRM小瓶中，並在25°C下以100 g離心10分鐘。自沈澱之肝細胞去除CHRM培養基，且將每一個別組輕柔再懸浮於HPM中。使用血球計數器對每一肝細胞批次進行計數並使用HPM稀釋至最終濃度為 0.75×10^6 個總細胞/mL。每一製劑之存活率大於或等於90%。以大約 0.38×10^6 個細胞/孔將個別批次平鋪於膠原塗覆之24孔板中。將肝細胞在95%空氣/5% CO₂及90%相對濕度氣氛下置於37°C培育器(Steri-Cult CO₂培育器，3310型號，Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)，且使細胞經受3小時至6小時附接時段。在附接時段之後，藉由抽吸去除平板培養基及未附接細胞且向每一孔中添加37°C HMM (0.5 mL/孔)，且將細胞培育過夜。在第2天，抽吸培養基且向細胞中再施加新鮮37°C HMM保持過夜適應時段。在第3天及第4天，抽吸培養基且向各孔中施加含有DMSO (0.1 %，媒劑對照)、奧美拉唑(50 μ M，CYP1A2陽性對照誘導劑)、苯巴比妥(1000 μ M，CYP2B6陽性對照誘導劑)、利福平(10 μ M，CYP3A4陽性對照誘導劑)、實例1至5之新鮮37°C HMM (0.5 mL/孔，N=3個孔/處理/CYP同型異構體)。在DMSO儲備溶液中製備擬測試之實例化合物，從而得到0.1% DMSO之最終培育濃度。實例化合物處理維持總共48小時。在第5天，抽吸培養基，且使用KHB將肝細胞輕柔洗滌一次(37°C，pH 7.4)。去除KHB，且第二次施加KHB (0.5 mL/孔)。將肝細胞放置回培

育器中並適應KHB 10分鐘。隨後藉由添加溶於KHB中之標記物受質非那西丁(100 μ M, CYP1A2探針受質, 30分鐘培育)、安非它酮鹽酸鹽(100 μ M, CYP2B6探針受質, 20分鐘培育)及睪酮(200 μ M, CYP3A4探針受質, 14分鐘培育) (37°C, pH 7.4, 0.5 mL/孔)來測定P450酶活性。在受質培育時段之後, 收集緩衝液並儲存於-80°C下直至分析時為止。將用於mRNA分析之肝細胞在PBS至(0.5 mL/孔, 25°C, 含有鈣及鎂)洗滌一次且向每一孔中添加根據方案製備之b-DNA裂解緩衝液(0.5 mL/孔)。藉由將裂解緩衝液上下輕柔移液5次來裂解肝細胞, 且將板儲存於-80°C下直至分析時為止。

P450活性分析. 藉由液相層析串聯質譜在包括反相高效液相層析(Shimadzu, Kyoto, Japan)及三重四極質譜儀(API 5000, Applied Biosystems, Foster City, CA)之系統上使用Turbo IonSpray (Applied Biosystems)經由多反應監測來分析及量化乙醯胺基酚、羥基安非它酮及6 β -羥基睪酮(分別係非那西丁CYP1A2代謝、安非它酮鹽酸鹽CYP2B6代謝及睪酮CYP3A4代謝之代謝物)。將樣品(25 μ L)裝載於C₁₈管柱(Onyx Monolithic C₁₈, 100 $\times$ 3.0 mm; Phenomenex, Torrance, CA)上, 且以流動相A (含有0.1%乙酸及5%甲醇之水)至B (含有0.1%乙酸及95%甲醇之水)之線性梯度在4.6分鐘內洗脫分析物。流速為1 mL/min。藉由比較代謝物對內部標準(哌啶嗪)之峰面積比率與使用真實乙醯胺基酚、羥基安非它酮及6 β -羥基睪酮製得之標準曲線來量化代謝物。

P450 mRNA分析. 利用分支DNA (b-DNA)信號擴增技術使用Panomics Discover XL套組測定CYP1A2、CYP2B6及CYP3A4 mRNA含量且根據製造商說明書來實施分析。自Affymetrix公司購買含有用於人類CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4及18S rRNA之捕獲擴展物、標記擴展物及阻斷探針之b-DNA探針組。在Elx405自動微量板洗滌器

(BioTek Instruments公司，Winooski, VT)上實施板洗滌步驟，且在 Luminoskan Ascent 微量板光度計 (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finland)上分析發光。將P450 mRNA含量正規化至管家基因18S rRNA之mRNA含量。

數據報告. 對於用於mRNA分析之每一P450同型異構體而言，經計算陽性對照及實例化合物之每一治療組較媒劑對照(其中媒劑對照設定為1.0)具有倍數增加。此外，根據以下方程式來計算所有治療組之mRNA含量之陽性對照百分比：

陽性對照% = [(實例化合物處理細胞之活性-僅媒劑處理細胞之活性)/(陽性對照處理細胞之活性-僅媒劑處理細胞之活性)] × 100

評價準則

- 無 = <20% PC (陽性對照)
- 中等 = 20 -39% PC
- 強力 = ≥ 40% PC

mRNA轉錄誘導分析數據

CYP1A2或CYP2B6數據

實例1至5之化合物並不展示CYP1A2或CYP2B6之誘導。

CYP3A4數據

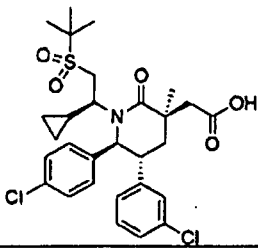
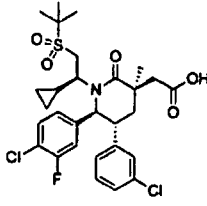
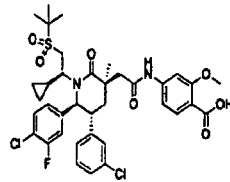
治療	陽性對照之mRNA % (供體1)	陽性對照之mRNA % (供體2)	陽性對照之mRNA % (供體3)
實例1			
0.1% DMSO	0.00	0.00	0.00
10 µM利福平	100.00	100.00	100.00
0.1 µM	4.75	5.44	-0.11
1 µM	2.97	5.69	-0.57
10 µM	8.31	14.46	2.06

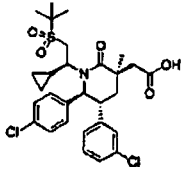
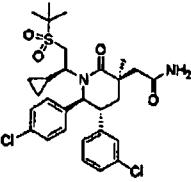
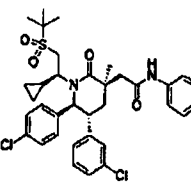
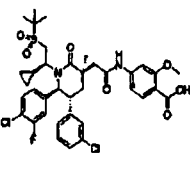
治療	陽性對照之 mRNA % (供體1)	陽性對照之mRNA % (供體2)	陽性對照之mRNA % (供體3)
實例2			
0.1% DMSO	0.00	0.00	0.00
10 µM利福平	100.00	100.00	100.00
0.1 µM	0.42	2.99	-0.37
1 µM	5.40	8.42	3.39
10 µM	29.62	44.51	33.84

治療	陽性對照之 mRNA % (供體1)	陽性對照之mRNA % (供體2)	陽性對照之mRNA % (供體3)
實例3			
0.1% DMSO	0.00	0.00	0.00
10 µM利福平	100.00	100.00	100.00
0.1 µM	1.71	4.95	0.15
1 µM	17.15	10.38	3.21
10 µM	37.77	45.78	37.60

治療	陽性對照之 mRNA % (供體1)	陽性對照之mRNA % (供體2)	陽性對照之mRNA % (供體3)
實例4			
0.1% DMSO	0.00	0.00	0.00
10 µM利福平	100.00	100.00	100.00
0.1 µM	1.62	2.30	0.42
1 µM	2.96	7.29	0.47
10 µM	10.14	12.51	3.07

治療	陽性對照之mRNA % (一種供體)
實例5	
0.1% DMSO	0.00
10 μM利福平	100.00
0.1 μM	-1.49
1 μM	0.34
10 μM	0.98

	實例1 	實例4 	實例5 
HTRF2分析	0.0000962	0.000102	0.0000503
IC ₅₀ (μM)			
細胞(SJSA-1)	0.0016	0.0012	0.0017
EdU分析			
IC ₅₀ (μM) , 10% 人類血清			
人類肝細胞CL _{int} 分析(μL/min/10 ⁶ 個細胞)	16	26	1.45
誘導分析匯總	無	無	無

	實例1 	實例2 	實例3 	實例5 
HTRF2 分析 IC ₅₀ (μM)	0.0000962	0.00183	0.00033	0.0000503
細胞(SJSA-1) EdU分析 IC ₅₀ (μM) , 10%人類血清	0.0016	0.033	0.0846	0.0017
人類肝細胞 CL _{int} 分析 (μL/min/10 ⁶ 個細胞)	16	26	28	1.45
誘導分析匯 總	無	CYP3A4	CYP3A4	無

「無」意指所測試化合物並不誘導CYP1A2、CYP2B6或CYP3A4之表現。

CYP3A4意指化合物誘導CYP3A4之表現。

向實例1化合物添加氟基團以製備實例4使得人類肝細胞澄清率高於實例1化合物。鑒於此數據，令人吃驚且出人意料地，亦含有氟基團之實例5化合物展示人類肝細胞澄清率低於實例1或4中之任一化合物。

此外，在實例1之羧酸官能基轉化成醯胺(實例2)時，肝細胞澄清率有所增加，且另外在製備苯基醯胺衍生物(實例3)時亦有所增加。另外，實例2及3展現CYP3A4 mRNA誘導。另外，令人吃驚且出人意料地，含有氟基團及衍生苯基醯胺官能基之實例5化合物並不展示

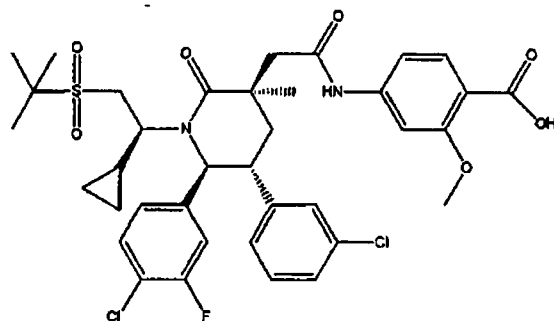
CYP3A4 mRNA誘導且另外展示人類肝細胞澄清率低於實例1至4中之任一者。應注意，彼等熟習此項技術者使用人類肝細胞澄清率數據及CYP3A4 mRNA誘導數據來幫助選擇用於人類療法之適當化合物。

【符號說明】

無

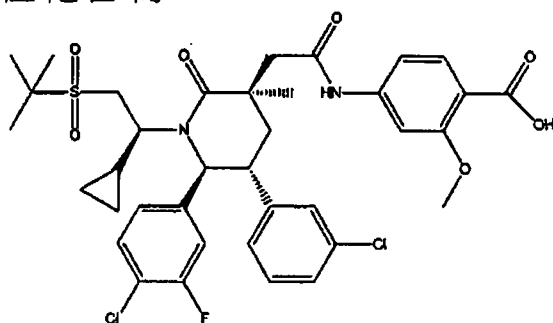
申請專利範圍

1. 一種化合物，



或其醫藥上可接受之鹽。

2. 一種化合物，



3. 一種醫藥組合物，其包括如請求項1或2中任一項之化合物及醫藥上可接受之賦形劑。
4. 一種治療有需要之個體之癌症之方法，該方法包括向該個體投與有效劑量之如請求項1至2中任一項之化合物。
5. 如請求項4之方法，其中該癌症係選自膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、食管癌、膽囊癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、前列腺癌、皮膚癌、急性淋巴細胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、毛細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkett's lymphoma)、急性或慢性骨髓性白血病、黑素瘤、子宮內膜癌、

頭頸癌、膠質母細胞瘤或骨肉瘤。

6. 如請求項4之方法，其中該癌症係膀胱癌。
7. 如請求項4之方法，其中該癌症係乳癌。
8. 如請求項4之方法，其中該癌症係結腸癌。
9. 如請求項4之方法，其中該癌症係直腸癌。
10. 如請求項4之方法，其中該癌症係腎癌。
11. 如請求項4之方法，其中該癌症係肝癌。
12. 如請求項4之方法，其中該癌症係小細胞肺癌。
13. 如請求項4之方法，其中該癌症係非小細胞肺癌。
14. 如請求項4之方法，其中該癌症係食管癌。
15. 如請求項4之方法，其中該癌症係膽囊癌。
16. 如請求項4之方法，其中該癌症係卵巢癌。
17. 如請求項4之方法，其中該癌症係胰臟癌。
18. 如請求項4之方法，其中該癌症係胃癌。
19. 如請求項4之方法，其中該癌症係子宮頸癌。
20. 如請求項4之方法，其中該癌症係甲狀腺癌。
21. 如請求項4之方法，其中該癌症係前列腺癌。
22. 如請求項4之方法，其中該癌症係皮膚癌。
23. 如請求項4之方法，其中該癌症係急性淋巴細胞白血病。
24. 如請求項4之方法，其中該癌症係慢性骨髓性白血病。
25. 如請求項4之方法，其中該癌症係急性淋巴母細胞白血病。
26. 如請求項4之方法，其中該癌症係B細胞淋巴瘤。
27. 如請求項4之方法，其中該癌症係T細胞淋巴瘤。
28. 如請求項4之方法，其中該癌症係何傑金氏淋巴瘤。
29. 如請求項4之方法，其中該癌症係非何傑金氏淋巴瘤。
30. 如請求項4之方法，其中該癌症係毛細胞淋巴瘤。

31. 如請求項4之方法，其中該癌症係伯基特氏淋巴瘤。
32. 如請求項4之方法，其中該癌症係急性骨髓性白血病。
33. 如請求項4之方法，其中該癌症係慢性骨髓性白血病。
34. 如請求項4之方法，其中該癌症鑑別為p53野生型。
35. 如請求項4之方法，其中該癌症係子宮內膜癌。
36. 如請求項4之方法，其中該癌症係頭頸癌。
37. 如請求項4之方法，其中該癌症係膠質母細胞瘤。
38. 如請求項4之方法，其中該癌症係骨肉瘤。
39. 如請求項4或6至38中任一項之方法，其中該癌症鑑別為p53野生型。