

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96114174

C07D 211/46 (2006.01)

※申請日期：96.4.23

※IPC 分類：A61K 31/445 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

二甲基苯基化合物之結晶型

CRYSTALLINE FORMS OF A DIMETHYLPHENYL COMPOUND

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商施萬製藥

THERAVANCE, INC.

代表人：(中文/英文)

傑佛瑞 A 荷根漢

HAGENAH, JEFFREY A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州南舊金山市林蔭大道 901 號

901 GATEWAY BOULEVARD SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080

U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 羅伯 夏歐

CHAO, ROBERT

2. 麥洛史夫 瑞帕達

RAPTA, MIROSLAV

3. 理查 D 威爾森

WILSON, RICHARD D.

4. 真妮佛 波頓

BOLTON, JENNIFER

5. 麗莎 威廉斯

WILLIAMS, LISA

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.

2. 斯洛伐克 SLOVAK REPUBLIC

3. 英國 U.K.

4. 加拿大 CANADA

5. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006 年 04 月 25 日；60/794,709

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

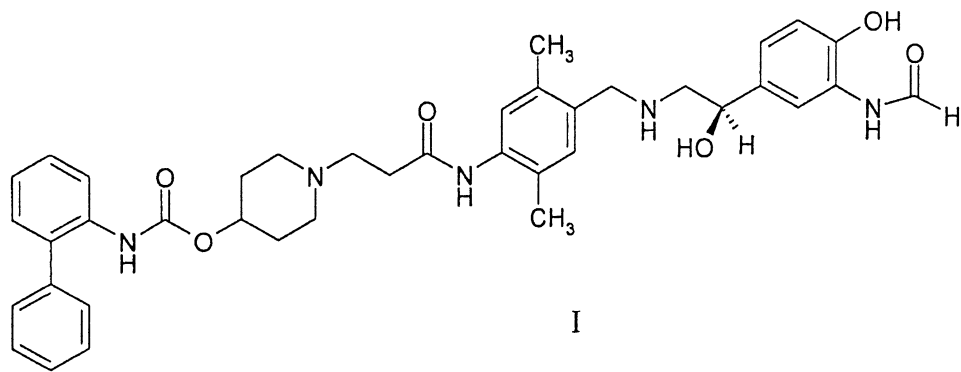
九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於二甲基苯基化合物之新穎結晶性自由態鹼型式，預期該化合物可作為治療劑用於治療肺病。本發明亦關於含有或製自此種結晶型之醫藥組合物；可用於製備此種結晶型之方法與中間物；及使用此種結晶型以例如治療肺病之方法。

【先前技術】

與本案同一日期提出申請之共同歸屬美國專利申請案號_____（律師案件目錄編號P-221-US1）與2006年4月25日提出申請之美國臨時申請案號60/794,702（其揭示內容係以全文併於本文供參考）係揭示新穎二烷基苯基化合物，其可作為治療劑用於治療肺病，譬如慢性阻塞肺病（COPD）與氣喘。特定言之，化合物聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]-六氫吡啶-4-基酯係於此申請案中特別被揭示為具有蠅蕁拮抗劑與 β_2 腎上腺素能受體催動劑活性兩者。聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]-六氫吡啶-4-基酯之化學結構係以式I表示：



可用於治療肺病之治療劑係有利地藉吸入直接投藥至呼吸道中。關於此點，對於藉吸入投予治療劑之數種類型之醫藥吸入裝置已被發展出，包括乾粉吸入器(DPI)、經計量之劑量吸入器(MDI)及霧化罐吸入器。當製備醫藥組合物與配方供使用於此種裝置中時，一般高度期望具有治療劑之結晶型，其既非吸濕性，亦非易潮解，且其具有相對較高熔點(意即大於約 130°C)，於是允許該物質被微粉化，而不會顯著分解或損失結晶性。

於先前尚未揭示式I化合物之結晶型。因此，仍需要式I化合物之安定不易潮解結晶型，其具有可接受程度之吸濕性與相對較高熔點。

【發明內容】

本發明係關於聯苯-2-基胺甲酸1-[2-(4-{(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。令人驚訝的是，已發現式I化合物之此種結晶性自由態鹼型式並不易潮解，即使當曝露至大氣濕氣時亦然。此外，此種結晶型具有可接受程度之吸濕性與高熔點，例如大於約 130°C 。

於特定方面，本發明係關於聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物，呈微粉化型式。

在其他用途中，式I化合物之結晶性自由態鹼型式係可用於製備醫藥組合物，預期其可用於治療肺病。因此，在本發明組合物之另一方面，係關於一種醫藥組合物，其包含藥學上可接受之載劑，與聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。

若需要，則本發明之結晶型可與其他治療劑合併投藥，譬如類固醇消炎劑。因此，在本發明組合物之另一方面，係關於一種醫藥組合物，其包含(a)聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物；與(b)第二種治療劑。於本發明組合物之又另一方面，係關於一種醫藥組合物，其包含(a)聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物；(b)第二種治療劑；及(c)藥學上可接受之載劑。

於本發明組合物之又再另一方面，係關於治療劑之組合，此組合包含(a)聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-

羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物；與(b)第二種治療劑。在本發明組合物之另一方面，係關於醫藥組合物之組合，此組合包含(a)一種醫藥組合物，其包含聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物，及藥學上可接受之載劑；與(b)一種醫藥組合物，其包含第二種治療劑與藥學上可接受之載劑。

式I化合物同時具有 β_2 腎上腺素能受體催動劑活性與蠅蕁鹼受體拮抗劑活性。因此，預期式I化合物之結晶性自由態鹼型式可作為治療劑用於治療肺病，譬如氣喘與慢性阻塞肺病。

因此，在本發明方法之一方面，係關於一種治療肺病之方法，此方法包括對需要治療之病患投予治療上有效量之聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。

本發明亦關於一種治療慢性阻塞肺病或氣喘之方法，此方法包括對病患投予治療上有效量之聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。

此外，在本發明方法之另一方面，係關於一種在哺乳動

物中產生枝氣管擴大作用之方法，此方法包括對哺乳動物投予枝氣管擴大作用產生量之聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。

本發明亦關於一種在哺乳動物中拮抗蠅蕈鹼受體且催動 β_2 腎上腺素能受體之方法，此方法包括對該哺乳動物投予聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。

本發明亦關於製備式 I 化合物自由態鹼型式之方法。因此，在本發明方法之另一方面，係關於一種製備聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式之方法，此方法包括：

(a) 提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯在稀釋劑中之溶液；

(b) 添加反萃溶劑至得自步驟(a)之溶液中，以產生濁點。

此方法視情況進一步包括以下步驟：

(c) 添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式之種晶至步驟(b)之產物中。在此等方法之一項特定具體實施例中，稀釋劑為甲醇，

而反萃溶劑為水。

此外，本發明係關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物，供使用於治療上。本發明亦關於此種結晶性自由態鹼型式於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療肺病。本發明之其他方面與具體實施例係揭示於本文中。

發明詳述

本發明係關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。呈此等鹽之活性治療劑(意即式 I 化合物)含有一個具有(R)組態之對掌中心。但是，熟諳此藝者應明瞭的是，除非另有指出，否則較少量之(S)立體異構物可存在於本發明之組合物中，其條件是此組合物整體之任何利用性不會因為此種異構物之存在而被消除。

式 I 化合物已使用市購可得之 AutoNom 軟體 (MDL, San Leandro, California) 命名。

定義

當描述本發明之化合物、組合物、方法及製程時，下列術語具有下述意義，除非另有指出。

於本文中使用之"熔點"一詞係意謂在藉由示差掃描卡法所發現之最高吸熱熱流下之溫度。

"質量中間值直徑"或"MMD"術語，當用以指粒子時，係

意謂直徑，以致使一半粒子之質量係被包含在具有較大直徑之粒子中，而一半係被包含在具有較小直徑之粒子中。

"經微粉化"或"呈微粉化型式"術語，係意謂其中粒子之至少約90百分比具有直徑小於約10微米之粒子，除非另有指出。

"溶劑合物"一詞係指藉由一或多個分子之溶質，意即式I化合物之自由態鹼型式，與一或多個分子之溶劑，所形成之複合物或聚集體。此種溶劑合物典型上具有實質上固定莫耳比之溶質與溶劑。此術語亦包括籠合物，包括具有水之籠合物。代表性溶劑，舉例言之，係包括水、甲醇、乙醇、異丙醇、醋酸等。當溶劑為水時，所形成之溶劑合物為水合物。

"治療上有效量"一詞係意謂當被投予需要治療之病患時，足以達成治療之量。

於本文中使用之"進行治療"或"治療作業"術語，係意謂在病患譬如哺乳動物(特別是人類)中之疾病或醫療症狀(譬如COPD)之進行治療或治療作業，其包括：

- (a) 預防疾病或醫療症狀發生，意即病患之預防治療；
- (b) 改善疾病或醫療症狀，意即排除病患中之疾病或醫療症狀或造成其復原；
- (c) 抑制疾病或醫療症狀，意即減慢或遏制疾病或醫療症狀在病患中之發展；或
- (d) 減輕疾病或醫療症狀在病患中之徵候。

"單位劑型"一詞係指適合病患服藥之物理上不連續單

位，意即各單位含有預定量之本發明鹽，經計算以產生所要治療效果，無論單獨或併用一或多個其他單位。例如，此種單位劑型可為乾粉吸入器膠囊，得自經計量劑量吸入器之經計量劑量、膠囊、片劑、丸劑等。

於本文中使用的所有其他術語係意欲具有其一般意義，如由一般熟諳其有關技藝者所明瞭的。

本發明之代表性結晶性自由態鹼型式

已發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯係以至少三種不同結晶性自由態鹼型式存在。對本發明之目的而言，此等型式於本文中係被確認為型式 I、型式 II 及型式 III。式 I 化合物之此等結晶型可藉由至少下列性質作區別：

型式 I：示差掃描卡計法 (DSC) 軌跡，其係在吸熱熱流中顯示約 132°C 至約 138°C 下之吸收峰；與粉末 x-射線繞射 (PXRD) 圖樣，在其他吸收峰之中，具有顯著繞射吸收峰於 2θ 值為約 17.7 ± 0.3 、 18.2 ± 0.3 、 21.7 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。

型式 II：示差掃描卡計法 (DSC) 軌跡，其係在吸熱熱流中顯示約 142°C 至約 150°C 下之吸收峰；與粉末 x-射線繞射 (PXRD) 圖樣，在其他吸收峰之中，具有顯著繞射吸收峰於 2θ 值為約 20.7 ± 0.3 、 21.6 ± 0.3 、 22.5 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。

型式 III：示差掃描卡計法 (DSC) 軌跡，其係在吸熱熱流中顯示約 134°C 至約 140°C 下之吸收峰；與粉末 x-射線繞射 (PXRD) 圖樣，在其他吸收峰之中，具有顯著繞射吸收峰於 2θ

值為約 15.5 ± 0.3 、 18.1 ± 0.3 、 19.2 ± 0.3 及 21.8 ± 0.3 下。

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式係藉由聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯或其溶劑合物之結晶化作用製備。

在一種製備方法中，式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式係以下述方式製成，形成該化合物在溶劑中之漿液，並將所形成之漿液攪拌一段足夠時間，以形成結晶性物質。典型上，係將此種漿液於環境溫度（意即約 20°C 至約 30°C ）下攪拌約 24 至約 72 小時。一般而言，此漿液係包含每毫升溶劑約 35 毫克至約 45 毫克，意即約 40 毫克之化合物。在一些情況中，溶劑之選擇將決定何種結晶性自由態鹼型式係自漿液製成。例如，當溶劑為乙腈時，型式 I 係以佔優勢型式製成。或者，當溶劑為異丙醇時，型式 II 係以佔優勢型式製成。此外，當溶劑為乙醇時，型式 III 係以佔優勢型式製成。除了溶劑以外，其他因素可影響何種固體型式被製成。

於另一種製備方法中，係使聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]-六氫吡啶-4-基酯溶於稀釋劑中，譬如甲醇、乙醇、異丙醇、醋酸乙酯、乙腈等，並添加反萃溶劑（反溶劑），譬如水等，造成結晶性自由態鹼之形成。一般而言，結晶化程序可於環境溫度下，或經由將混合物

加熱，然後使其冷卻至環境溫度而進行。在此方法之一項特定具體實施例中，稀釋劑為甲醇，而反萃溶劑為水。

於本發明中所採用之聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯可容易地自市購可得之起始物質與試劑，使用下文實例中所述之程序；或利用描述於本申請案之背景段落中之共同歸屬美國專利申請案中所述之程序製成。

一種製備本發明結晶性自由態鹼型式之方法可視情況包括利用種晶，以產生主要為一種特定自由態鹼型式。例如，利用型式II之種晶，可製成式I化合物之結晶性自由態鹼型式，具有基本上與種晶意即型式II相同之型式。當首先形成結晶性自由態鹼型式，或其可用以使結晶性或部份結晶性自由態鹼型式再結晶時，可使用此種種晶。

典型上，種晶係藉由緩慢結晶化作用製成，而未攪拌且未施加冷卻。以下述作為說明，為獲得種晶，式I化合物典型上係在足以提供溶解之溫度下，溶於稀釋劑中。例如，式I化合物係在約75°C至約80°C下，溶於乙腈與水之1:2混合物中，然後，使其冷卻至環境溫度，歷經約12小時至24小時，以提供結晶性自由態鹼型式。於另一項具體實施例中，含有約40%至約80%體積比之水之甲醇係作為稀釋劑使用。所形成之結晶係藉過濾或其他習用方式分離。或者，種晶可自結晶性物質之先前製備獲得。

在使用種晶之再結晶程序之一項特定具體實施例中，係

使式I化合物之自由態鹼型式於環境溫度下溶於甲醇(典型上為每克化合物約120毫升至約160毫升，包括140毫升之甲醇)中，並添加水直到達成濁點為止。然後，添加種晶(典型上為每克化合物約1至約5毫克種晶)。將所形成之混合物於式I化合物結晶之期間內，在環境溫度下攪拌。使用習用程序，譬如過濾，將所形成之結晶單離。應明瞭的是，用於結晶化作用或再結晶化作用程序之特定溫度係經選擇，依稀釋劑之特性與結晶性鹽在稀釋劑中之濃度而定。此外，再結晶程序可使用無論是蒸發或反萃溶劑代替冷卻進行，以幫助結晶化作用。

於本發明之一方面，本發明之結晶性自由態鹼型式係藉由其物理及/或光譜特徵所界定。因此，於一項具體實施例中，本發明係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射(PXRD)圖樣為特徵，具有顯著繞射吸收峰於 2θ 值為約 17.7 ± 0.3 、 18.2 ± 0.3 、 21.7 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。在此項具體實施例之特定方面，本發明係關於結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係實質上根據圖1中所示者。

於另一項具體實施例中，本發明係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射(PXRD)圖樣為特徵，具有顯著繞射吸收峰於 2θ 值為約 20.7 ± 0.3 、 21.6 ± 0.3 、 22.5 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。在此項具體實施例之特定方面，本發明係關於結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係實質上根據圖2中所示者。

於又再另一項具體實施例中，本發明係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射(PXRD)圖樣為特徵，具有顯著繞射吸收峰於 2θ 值為約 15.5 ± 0.3 、 18.1 ± 0.3 、 19.2 ± 0.3 及 21.8 ± 0.3 下。在此項具體實施例之特定方面，本發明係關於結晶性自由態鹼型式，其係以粉末x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係實質上根據圖3中所示者。

於又另一項具體實施例中，本發明係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，具有DSC軌跡實質上根據圖4中所示之軌跡。於其他具體實施例中，其係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，具有DSC軌跡實質上根據圖5中所示之軌跡。於又另一項具體實施例中，其係關於式I化合物之結晶性自由態鹼型式，具有DSC軌跡實質上根據圖6中所示之軌跡。

型式II之結晶性自由態鹼已被証實具有可逆吸著/解吸附作用形態，在40%相對濕度至75%相對濕度之濕度範圍中，具有低於約0.5%重量增加。

本發明之結晶性自由態鹼型式之此等性質係進一步說明於下文實例中。

醫藥組合物、組合及配方

本發明之結晶性自由態鹼型式典型上係以醫藥組合物或配方之型式投予病患。此種醫藥組合物可藉任何可接受之投藥途徑投予病患，包括但不限於吸入、口腔、鼻、局部(包括經皮)及非經腸投藥模式。

因此，在本發明組合物之一方面中，係關於一種醫藥組

合物，其包含藥學上可接受之載劑或賦形劑，及式I化合物之結晶性自由態鹼型式。典型上，此種醫藥組合物若需要可視情況含有其他治療及/或調配劑。

本發明之醫藥組合物典型上含有治療上有效量之式I化合物之結晶性自由態鹼型式。但是，熟諳此藝者將明瞭的是，醫藥組合物可含有大於治療上有效量，意即總體組合物，或低於治療上有效量，意即個別單位劑量，經設計以供多次投予，以達成治療上有效量。

典型上，此醫藥組合物將含有約0.01至約95重量%之治療劑；包括約0.01至約30重量%；譬如約0.01至約10重量%之治療劑。

任何習用載劑或賦形劑，均可使用於本發明之醫藥組合物中。特定載劑或賦形劑之選擇，或載劑或賦形劑之組合，係依用以治療特定病患或醫療症狀或疾病狀態類型之投藥模式而定。關於此點，對特定投藥模式之適當醫藥組合物之製備，係良好地在一般熟諳醫藥技藝者之技術範圍內。

在本發明醫藥組合物中所使用之載劑或賦形劑係為市購可得。例如，此種物質可購自Sigma (St. Louis, MO)。藉由進一步說明，習用調配技術係為一般熟諳此項技藝者所習知，如以Remington：製藥科學與實務，第20版，Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000)；與H.C. Ansel等人，醫藥劑型與藥物傳輸系統，第7版，Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)中之陳述內容為例。

可充作藥學上可接受載劑之物質之代表性實例，包括但

不限於下列：(1)糖類，譬如乳糖、葡萄糖及蔗糖；(2)澱粉，譬如玉米澱粉與馬鈴薯澱粉；(3)纖維素及其衍生物，譬如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及纖維素醋酸酯；(4)粉末狀西黃蓍樹膠；(5)麥芽；(6)明膠；(7)滑石；(8)賦形劑，譬如可可豆脂與栓劑蠟類；(9)油類，譬如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；(10)二醇類，譬如丙二醇；(11)多元醇類，譬如甘油、花楸醇、甘露醇及聚乙二醇；(12)酯類，譬如油酸乙酯與月桂酸乙酯；(13)瓊脂；(14)緩衝劑，譬如氫氧化鎂與氫氧化鋁；(15)海藻酸；(16)不含熱原水；(17)等滲鹽水；(18)林格氏溶液；(19)乙醇；(20)磷酸鹽緩衝溶液；(21)壓縮推進劑氣體，譬如氯氟碳類與氫氟碳類；及(22)被採用於醫藥組合物中之其他無毒性可相容物質。

本發明之醫藥組合物典型上係經由將本發明之結晶性自由態鹼型式與藥學上可接受之載劑及任何選用成份充分與密切混合或摻合而製成。若必要或有需要，則可接著將所形成之均勻摻合混合物使用習用程序與設備，製成或裝填至片劑、膠囊、丸劑、罐子、藥筒、分配器等之中。

於一項具體實施例中，本發明之醫藥組合物係適用於吸入投藥。供吸入投藥之適當醫藥組合物，典型上係呈氣溶膠或粉末型式。此種組合物一般係使用習知傳輸裝置投藥，譬如霧化罐吸入器、經計量之劑量吸入器(MDI)、乾粉吸入器(DPI)或類似傳輸裝置。

在本發明之一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥

組合物係使用霧化罐吸入器，藉吸入投藥。此種霧化罐裝置典型上係產生高速度空氣流，其會造成包含治療劑之醫藥組合物噴霧成為霧氣，其係被帶至病患之呼吸道中。因此，當經調配供使用於霧化罐吸入器時，治療劑典型上係被溶於適當載劑中，以形成溶液。或者，治療劑可被微粉化並與適當載劑合併，以形成微粉化粒子之懸浮液。適合藉吸入投予治療劑之霧化罐裝置係為一般熟諳此項技藝者所習知，或此種裝置係為市購可得。例如，代表性霧化罐裝置或產物包括 RespiMat Softmist Inhalaler (Boehringer Ingelheim)；AERx 肺傳輸系統 (Aradigm 公司)；PARI LC Plus 可再使用霧化罐 (Pari GmbH) 等。

一種供使用於霧化罐吸入器之代表性醫藥組合物，包括等滲水溶液，其包含約 0.05 微克/毫升至約 10 毫克/毫升之式 I 化合物。此種組合物典型上係經由使式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式溶於等滲鹽水中而製成。於一項具體實施例中，此種溶液具有約 4 至約 6 之 pH 值。

在本發明之另一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥組合物係使用乾粉吸入器，藉吸入投藥。此種乾粉吸入器典型上係以自由流動性粉末投予治療劑，其係在吸氣期間被分散於病患之氣流中。為達成自由流動性粉末，典型上係將治療劑與適當賦形劑一起調配，該賦形劑譬如乳糖、澱粉、甘露醇、右旋糖、聚乳酸 (PLA)、聚內交酯-共-乙交酯 (PLGA) 或其組合。典型上，治療劑係被微粉化，且與適當載劑合併，以形成適用於吸入之摻合物。

供使用於乾粉吸入器之代表性醫藥組合物，係包含乾燥乳糖與微粉化粒子之式I化合物之結晶性自由態鹼型式。

此種乾粉配方可例如經由將乳糖與活性劑合併，然後乾摻合此等成份而製成。或者，若需要，則治療劑可經調配而未使用賦形劑。然後，典型上係將醫藥組合物裝填至乾粉分配器中，或至吸入藥筒或膠囊中，與乾粉傳輸裝置一起使用。

適合藉吸入投予治療劑之乾粉吸入器傳輸裝置係為一般熟諳此項技藝者所習知，或此種裝置係為市購可得。例如，代表性乾粉吸入器傳輸裝置或產物包括 Aeolizer (Novartis)；Airmax (IVAX)；ClickHaler (Innovata Biomed)；Diskhaler (GlaxoSmithKline)；Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline)；Easyhaler (Orion Pharma)；Eclipse (Aventis)；FlowCaps (Hovione)；Handihaler (Boehringer Ingelheim)；Pulvinal (Chiesi)；Rotahaler (GlaxoSmithKline)；SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma)；Twisthaler (Schering-Plough)；Turbuhaler (AstraZeneca)；Ultrahaler (Aventis) 等。

在本發明之又另一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥組合物係使用經計量之劑量吸入器，藉吸入投藥。此種經計量之劑量吸入器典型上係使用壓縮推進劑氣體，排放經度量數量之治療劑。因此，使用經計量之劑量吸入器投予之醫藥組合物，典型上包含治療劑在液化推進劑中之溶液或懸浮液。任何適當液化推進劑均可採用，包括氯氟碳類，譬如 CCl_3 ，與氫氟基烷類 (HFA)，譬如 1,1,1,2-四氟基乙烷 (HFA 134a) 與 1,1,1,2,3,3,3-七氟-正-丙烷 (HFA 227)。由於顧

慮氯氟碳類會影響臭氧層，故含有HFA之配方一般較佳。HFA配方之其他選用成份係包括共溶劑，譬如乙醇或戊烷，與界面活性劑，譬如三油酸花楸聚糖酯、油酸、卵磷脂及甘油。

供使用於經計量之劑量吸入器之代表性醫藥組合物，包含約0.01%至約5%重量比之式I化合物之結晶性自由態鹼型式；約0%至約20%重量比之乙醇；及約0%至約5%重量比之界面活性劑；而其餘部份為HFA推進劑。

此種組合物典型上係藉由添加經急冷或加壓之氫氟基烷至含有治療劑、乙醇(若存在時)及界面活性劑(若存在時)之適當容器中而製成。為製備懸浮液，係將治療劑微粉化，然後與推進劑合併。然後，將配方裝填至氣溶膠罐中，其係形成經計量之劑量吸入器裝置之一部份。

適合藉吸入投予治療劑之經計量劑量吸入器裝置係為一般熟諳此項技藝者所習知，或此種裝置係為市購可得。例如，代表性經計量劑量吸入器裝置或產物係包括AeroBid吸入器系統(Forest醫藥)；溴化異丙阿托品吸入氣溶膠(Boehringer Ingelheim)；Flovent (GlaxoSmithKline)；Maxair吸入器(3M)；舒喘靈吸入器(Schering)；Serevent吸入氣溶膠(GlaxoSmithKline)等。

於另一項具體實施例中，本發明之醫藥組合物係適用於口服投藥。供口服投藥之適當醫藥組合物可呈膠囊、片劑、丸劑、錠劑、扁囊劑、糖衣錠、粉末、顆粒型式；或作成溶液或懸浮液，在水性或非水性液體中；或作成油在水中型或水在油中型液體乳化液；或作成酏劑或糖漿；及其類

似物；各含有預定量之本發明結晶性自由態鹼型式作為活性成份。

當欲以固體劑型(意即為膠囊、片劑、丸劑及其類似物)供口服投藥時，本發明之醫藥組合物典型上係包含本發明之結晶性自由態鹼型式作為活性成份，及一或多種藥學上可接受之載劑，譬如檸檬酸鈉或磷酸二鈣。視情況或替代地，此種固體劑型亦可包含：(1)填料或增量劑，譬如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及/或矽酸；(2)黏合劑，譬如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烷基四氫吡咯酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；(3)保濕劑，譬如甘油；(4)崩解劑，譬如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽及/或碳酸鈉；(5)溶解阻滯劑，譬如石蠟；(6)吸收加速劑，譬如四級銨化合物；(7)潤濕劑，譬如鯨蠟醇及/或單硬脂酸甘油酯；(8)吸收劑，譬如高嶺土及/或膨土；(9)潤滑劑，譬如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉及/或其混合物；(10)著色劑；及(11)緩衝劑。

離型劑、潤濕劑、塗覆劑，增甜、矯味及芳香劑，防腐劑及抗氧化劑，亦可存在於本發明之醫藥組合物中。藥學上可接受抗氧化劑之實例，包括：(1)水溶性抗氧化劑，譬如抗壞血酸、半胱胺酸鹽、酸性硫酸鈉、偏酸性硫酸鈉、亞硫酸鈉等；(2)油溶性抗氧化劑，譬如棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基甲苯醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等；及(3)金屬螯合劑，譬如檸檬酸、乙二胺四醋酸(EDTA)、花楸醇、酒石酸、磷

酸等。供片劑、膠囊、丸劑及類似物用之塗覆劑，包括用於腸溶性塗層者，譬如纖維素醋酸酐酸酯(CAP)、聚酞酸醋酸乙烯酯(PVAP)、羥丙甲基纖維素酞酸酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸酯共聚物、纖維素醋酸苯三甲酸酯(CAT)、羧甲基乙基纖維素(CMEC)、羥丙甲基纖維素醋酸琥珀酸酯(HPMCAS)等。

若需要，則本發明之醫藥組合物亦可經調配，以提供活性成份之緩慢或受控釋出，舉例言之，係以不同比例使用羥丙甲基纖維素；或其他聚合體基質、微脂粒及/或微球體。

此外，本發明之醫藥組合物可視情況含有遮光劑，且可經調配，以致其係只有或優先在胃腸道之某一部份中釋出活性成份，視情況以延遲方式。可使用之包埋組合物之實例，包括聚合體物質與蠟類。活性成份亦可呈微包覆型式，若適當，則使用一或多種上述賦形劑。

供口服投藥之適當液體劑型，以下述作為說明，係包括藥學上可接受之乳化液、微乳化液、溶液、懸浮液、糖漿及酞劑。此種液體劑型典型上包含活性成份與惰性稀釋劑，例如水或其他溶劑、促溶劑及乳化劑，譬如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油類(尤其是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄欖、蓖麻及芝麻油類)、甘油、四氫呋喃基醇、聚乙二醇及花楸聚糖之脂肪酸酯類，以及其混合物。懸浮液除了活性成份以外，可含有懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂基醇類、聚氧化乙烯花楸醇及花楸聚糖酯類、微晶性纖維素、偏氫

氧化鋁、膨土、瓊脂及西黃蓍樹膠，以及其混合物。當以液體劑型中之溶液投藥時，該結晶性自由態鹼型式當然不再呈結晶型式，而係被溶於液體載劑中。

當欲供口服投藥時，本發明之醫藥組合物可以單位劑型包裝。"單位劑型"一詞係意謂適合病患服藥之物理上不連續單位，意即各單位含有經計算以產生所要治療效果之預定量活性劑，無論單獨或併用一或多個其他單位。例如，此種單位劑型可為膠囊、片劑、丸劑等。

本發明之結晶性自由態鹼型式亦可以經皮方式投藥，使用已知經皮傳輸系統與賦形劑。例如，可將結晶性自由態鹼型式與滲透增強劑互混，譬如丙二醇、聚乙二醇單月桂酸酯、氮環烷-2-酮等，並摻入貼藥或類似傳輸系統中。其他賦形劑，包括膠凝劑、乳化劑及緩衝劑，若需要可被使用於此種經皮組合物中。

此外，本發明之結晶性自由態鹼型式可以非經腸方式投藥，意即以靜脈內方式、皮下方式或肌內方式。對非經腸投藥而言，式I化合物之結晶性自由態鹼型式典型上係被溶於對非經腸投藥為可接受之載劑中，譬如無菌水、鹽水、植物油等。以下述作為說明，靜脈內組合物典型上係包含製自式I化合物之結晶性自由態鹼型式之無菌水溶液，其中該溶液具有pH在約4至約7之範圍內。

若需要，則本發明之結晶性自由態鹼型式可併用一或多種其他治療劑一起投藥。在此項具體實施例中，本發明之結晶性自由態鹼型式係無論是以物理方式與另一種治療劑

混合，以形成含有兩種藥劑之組合物；或各藥劑係存在於個別且不同組合物中，其係同時或相繼地投予病患。

例如，式I化合物之結晶性自由態鹼型式可使用習用程序與設備，與第二種治療劑合併，以形成包含式I化合物之結晶性自由態鹼型式與第二種治療劑之組合物。此外，治療劑可與藥學上可接受之載劑合併，以形成一種包含式I化合物之結晶性自由態鹼型式、第二種治療劑及藥學上可接受載劑之醫藥組合物。在此項具體實施例中，典型上係將組合物之成份混合或摻合，以產生物理混合物。然後，使用本文所述之任何途徑，以治療上有效量投予該物理混合物。

或者，在投予病患之前，治療劑可仍然保持個別且不同。在此項具體實施例中，於投藥之前，治療劑並非以物理方式混合在一起，但係同時或相繼地以個別組合物投予。例如，式I化合物之結晶性自由態鹼型式可藉吸入與另一種治療劑同時或相繼地投藥，使用吸入傳輸裝置，其係對各治療劑採用個別隔室(例如氣泡包裝)。或者，該組合可使用個別傳輸裝置投予，意即一種傳輸裝置用於一種治療劑。此外，治療劑可藉由不同投藥途徑傳輸，意即一種藉吸入，而另一種藉口服投藥。

可與本發明之結晶性自由態鹼型式相容之任何治療劑可與此種型式合併使用。在一項特定具體實施例中，第二種治療劑係為有效地藉吸入所投予者。以下述作為說明，可與本發明化合物一起使用之治療劑之代表性類型，包括但

不限於消炎劑，譬如類固醇消炎劑(包括皮質類固醇與類皮質糖)、非類固醇消炎劑(NSAID)及PDE₄抑制劑；枝氣管擴張藥，譬如PDE₃抑制劑、腺苷2b調制劑及 β_2 腎上腺素能受體激動劑；防止傳染劑，譬如革蘭陽性抗生素、革蘭陰性抗生素及抗病毒劑；抗組織胺類；蛋白酶抑制劑；傳入阻斷劑，譬如D₂激動劑與神經激肽調制劑；及毒蕈鹼受體拮抗劑(抗膽鹼能劑)。此種治療劑之許多實例係為此項技藝中所習知。與本發明化合物合併投予之其他治療劑之適當劑量，典型上係在約0.05微克/天至約500毫克/天之範圍內。

在本發明之一項特定具體實施例中，式I化合物之結晶性自由態鹼型式係與類固醇消炎劑合併投藥。可與本發明之結晶性自由態鹼型式併用之類固醇消炎劑之代表性實例，包括但不限於二丙酸氯地米松；布蝶松化物；丁氧可體丙酸鹽(butixocort propionate)；20R-16 α ,17 α -[亞丁基雙(氧基)]-6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-17 β -(甲硫基)雄甾-4-烯-3-酮(RPR-106541)；西列松奈得(ciclesonide)；地塞米松；6 α ,9 α -二氟-17 α -[(2-呋喃基羰基)氧基]-11 β -羥基-16 α -甲基-3-酮基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸S-氟基甲酯；6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-16 α -甲基-17 α -[(4-甲基-1,3-噻唑-5-羰基)氧基]-3-酮基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸S-氟基甲酯；6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-16 α -甲基-3-酮基-17 α -丙醯氧基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸(S)-(2-酮基四氫呋喃-3S-基)酯；氟尼梭來；丙酸福路替卡松(fluticasone propionate)；甲基氫化潑尼松；糠酸莫美塔松；氫化潑尼松；潑尼松；若弗澎奈得(rofleponide)；ST-126；丙酮化氟羥脫氫皮甾醇等，或其

藥學上可接受之鹽。此種類固醇消炎劑係為市購可得，或可使用習用程序與試劑製成。例如，類固醇消炎劑之製備與用途係描述於2004年6月15日頒予之美國專利6,750,210 B2；2004年7月6日頒予之美國專利6,759,398 B2；2003年3月25日頒予之美國專利6,537,983；2002年2月14日公告之美國專利申請案公報US 2002/0019378 A1；及其中引述之參考資料中。

當被採用時，類固醇消炎劑當與本發明之結晶性自由態鹼型式共同投藥時，典型上係以具有治療上有利作用之量投予。典型上，類固醇消炎劑係以足以提供每劑量約0.05微克至約500微克之量投藥。

【實施方式】

下述實例係說明本發明之代表性醫藥組合物：

實例 A

乾粉組合物

使經微粉化之式I化合物之結晶性自由態鹼型式(100毫克)與經研磨之乳糖(25克)(例如其中不大於約85%之粒子具有MMD為約60微米至約90微米，而不低於15%之粒子具有MMD低於15微米之乳糖)摻合。然後，將此已摻合之混合物裝填至個別可剝離氣泡包裝之氣泡中，其量足以提供每劑量約10微克至約500微克之式I化合物。氣泡之內含物係使用乾粉吸入器投藥。

實例 B

乾粉組合物

使經微粉化之式I化合物之結晶性自由態鹼型式(1克)與經研磨之乳糖(200克)摻合，以形成具有化合物對經研磨乳糖之重量比為1：200之總體組合物。將已摻合之組合物裝填至乾粉吸入裝置中，其每劑量能夠傳輸約10微克至約500微克間之式I化合物。

實例 C

乾粉組合物

使經微粉化之式I化合物之結晶性自由態鹼型式(100毫克)及經微粉化之類固醇消炎劑(500毫克)，與經研磨之乳糖(30克)摻合。然後，將此已摻合之混合物裝填至可剝離氣泡包裝之個別氣泡中，其量足以提供每劑量約10微克至約500微克之式I化合物。氣泡之內含物係使用乾粉吸入器投藥。

實例 D

經計量之劑量吸入器組合物

使經微粉化之式I化合物之結晶性自由態鹼型式(10克)分散在經由使卵磷脂(0.2克)溶解在脫礦質水(200毫升)中所製成之溶液內。將所形成之懸浮液噴霧乾燥，然後微粉化，以形成包含具有平均直徑小於約1.5微米之粒子之經微粉化組合物。接著，將經微粉化之組合物裝填至含有加壓1,1,1,2-四氟基乙烷之經計量劑量吸入器藥筒中，當藉由經計量之劑量吸入器投藥時其量足以提供每劑量約10微克至約500微克之式I化合物。

實例 E

霧化罐組合物

使式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式 (25 毫克) 溶於檸檬酸鹽緩衝 (pH 5) 等滲鹽水 (125 毫升) 中。將混合物攪拌，並音振直到化合物溶解為止。檢查溶液之 pH 值，而若必要則藉由慢慢添加 1N 氫氧化鈉水溶液調整至 pH 5。此溶液係使用霧化罐裝置投藥，其係提供每劑量約 10 微克至約 500 微克之式 I 化合物。

實例 F

硬明膠膠囊

將式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式 (50 克)、經噴霧乾燥乳糖 (440 克) 及硬脂酸鎂 (10 克) 充分地摻合。將所形成之組合物裝填至硬明膠膠囊 (每膠囊 500 毫克組合物) 中，其係以口服方式投藥。

實例 G

口服懸浮液

將下列成份充分地混合，以形成口服投藥用之懸浮液：

成份	量
式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式	1.0 克
反丁烯二酸	0.5 克
氯化鈉	2.0 克
對羥基苯甲酸甲酯	0.15 克
對羥基苯甲酸丙酯	0.05 克
粒狀糖	25.5 克
花楸醇 (70% 溶液)	12.85 克

VEEGUM® K (矽酸鎂鋁)	1.0克
矯味劑	0.035 毫升
著色劑	0.5 毫克
蒸餾水	足量至 100 毫升

所形成之懸浮液含有每 10 毫升懸浮液 100 毫克活性成份。此懸浮液係以口服方式投藥。

實例 H

可注射組合物

將式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式 (0.2 克) 與 0.4 M 醋酸鈉緩衝溶液 (2.0 毫升) 摻合。按需要，將所形成溶液之 pH 值使用 0.5 N 鹽酸水溶液或 0.5 N 氫氧化鈉水溶液調整至 pH 4，然後，添加足夠注射用水，以提供總體積為 20 毫升。接著，將混合物經過無菌濾器 (0.22 微米) 過濾，以提供適合藉注射投藥之無菌溶液。

利用性

式 I 化合物同時具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性，因此，預期式 I 化合物之結晶性自由態鹼型式可作為治療劑使用，以治療藉由 β_2 腎上腺素能受體或毒蕈鹼受體所媒介之醫療症狀，意即經由以 β_2 腎上腺素能受體激動劑或毒蕈鹼受體拮抗劑治療而被改善之醫療症狀。此種醫療症狀係為一般熟諳此項技藝者所習知，如以 Eglen 等人，毒蕈鹼受體亞型：藥理學與治療潛力，*DN&P* 10(8), 462-469 (1997)；Emilien 等人， β -腎上腺素受體激動劑與拮抗劑之當前治療用途與潛力，*European J. Clinical Pharm.*,

53(6), 389-404 (1998); 及其中所引述參考資料之陳述內容為例。此種醫療症狀，舉例言之，係包括肺病，或與可逆氣道阻塞有關聯之疾病，譬如慢性阻塞肺病(例如慢性與哮喘枝氣管炎及氣腫)、氣喘、肺纖維變性等。其他症狀包括早產、抑鬱、鬱血性心衰竭、皮膚病(例如炎性、過敏性、牛皮癬及增生性皮膚病)，其中降低胃液素酸度係為所期望之症狀(例如消化與胃潰瘍)，及肌肉消耗疾病。

因此，於一項具體實施例中，本發明係關於一種治療肺病之方法，此方法包括對需要治療之病患投予治療上有效量之式I化合物之結晶性自由態鹼型式。當用以治療肺病時，本發明之結晶性自由態鹼型式典型上係藉吸入投藥，以每天多劑量，以單一日服劑量或單一每週劑量。一般而言，治療肺病之劑量係涵蓋從約10微克/天至約500微克/天之範圍。

在本發明方法之一方面，係關於一種治療慢性阻塞肺病或氣喘之方法，此方法包括對病患投予治療上有效量之式I化合物之結晶性自由態鹼型式。一般而言，治療COPD或氣喘之劑量係涵蓋從約10微克/天至約500微克/天之範圍。"COPD"一詞係為一般熟諳此藝者所明瞭，包括多種呼吸症狀，包括慢性阻塞枝氣管炎與氣腫，如以Barnes, 慢性阻塞肺病, *N. Engl. J. Med.*, 2000: 343: 269-78，及其中所引述參考資料之陳述內容為例。

當藉吸入投藥時，本發明化合物典型上具有產生枝氣管擴大之作用。因此，在本發明方法之另一方面，係關於一

種在哺乳動物中產生枝氣管擴大之方法，此方法包括對哺乳動物投予枝氣管擴大作用產生量之式I化合物之結晶性自由態鹼型式。一般而言，產生枝氣管擴大作用之劑量係涵蓋從約10微克/天至約500微克/天之範圍。

當作為治療劑使用時，本發明之結晶性自由態鹼型式係視情況併用另一種或多種治療劑一起投藥。特定言之，經由將本發明之結晶性自由態鹼型式與類固醇消炎劑一起投藥，三重療法，意即 β_2 腎上腺素能受體激動劑活性、毒蕈鹼受體拮抗劑活性及消炎活性，可僅使用兩種治療劑達成。由於含有兩種治療劑之醫藥組合物(與組合)，與含有三種治療劑之組合物比較，典型上較易於調配及/或投藥，故此種兩成份組合物係提供勝過含有三種治療劑之組合物之一項重要優點。因此，在一項特定具體實施例中，本發明之醫藥組合物、組合及方法係進一步包含類固醇消炎劑。

式I化合物之結晶性自由態鹼型式之性質與利用性可使用一般熟諳此藝者所習知之各種活體外與活體內檢測証實。例如，代表性檢測係進一步詳述於下述實例中。

實例

提供下述製備與實例，以說明本發明之特殊具體實施例與諸方面。但是，特殊具體實施例與諸方面之說明，並不意欲以任何方式限制本發明之範圍，除非明確地指出。

於下述實例中使用之全部試劑、起始物質及溶劑係購自市售供應商(譬如Aldrich、Fluka、Sigma等)，且使用之而無需進一步純化，除非另有指出。

在下述實例中，HPLC分析典型上係使用Agilent (Palo Alto, CA)系列1100儀器進行，具有Zorbax Bonus RP 2.1 x 50毫米管柱，由Agilent提供(C14管柱)，具有3.5微米粒子大小。偵測係藉由214毫微米下之UV吸光率。流動相"A"為2%乙腈、97.9%水及0.1%三氟醋酸(v/v/v)；而流動相"B"為89.9%乙腈、10%水及0.1%三氟醋酸(v/v/v)。HPLC (10-70)數據係以流率0.5毫升/分鐘，10%至70%流動相B梯度液，歷經6分鐘期間獲得；HPLC (5-35)數據係以流率0.5毫升/分鐘，5%至35%流動相B梯度液，歷經5分鐘期間獲得；及HPLC (10-90)數據係以流率0.5毫升/分鐘，10%至90%流動相B梯度液，歷經5分鐘期間獲得。

液相層析法質量光譜法(LCMS)數據典型上係以應用生物系統(Foster City, CA) API-150EX型儀器獲得。LCMS 10-90數據係以10%至90%流動相B梯度液，歷經5分鐘期間獲得。

小規模純化典型上係使用得自應用生物系統(Applied Biosystems)之API 150EX Perp工作站系統進行。流動相"A"為含有0.05%三氟醋酸(v/v)之水；而流動相"B"為含有0.05%三氟醋酸(v/v)之乙腈。對於小試樣(約3至50毫克經回收之試樣大小)，典型上係使用下列條件：20毫升/分鐘流率；15分鐘梯度液，及20毫米x 50毫米Prism RP管柱，具有5微米粒子(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA)。對於較大試樣(意即大於約100毫克粗製試樣)，典型上係使用下列條件：60毫升/分鐘流率；30分鐘梯度液，及41.4毫米x 250毫米Microsorb BDS管柱，具有10微米粒子(Varian, Palo Alto, CA)。

關於 ^1H NMR 數據，係使用下列縮寫：s = 單重峰，d = 二重峰，t = 三重峰，q = 四重峰，m = 多重峰，br = 寬廣，nd = 未測定。

實例 1

聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯

將 2-異氰酸聯苯酯 (97.5 克，521 毫莫耳) 與 4-羥基-1-苄基六氫吡啶 (105 克，549 毫莫耳) (兩者均可市購得自 Aldrich, Milwaukee, WI) 於 70°C 下一起加熱 12 小時，於此段時間內，聯苯-2-基胺甲基酸 1-苄基六氫吡啶-4-基酯之形成係藉 LCMS 監測。然後，使反應混合物冷卻至 50°C ，並添加乙醇 (1 升)，接著慢慢添加 6M 鹽酸 (191 毫升)。然後，使反應混合物冷卻至環境溫度，並添加甲酸銨 (98.5 克，1.56 莫耳)，且使氮氣激烈起泡經過此溶液 20 分鐘。接著添加鈹 (10 重量% (乾重為基準)，於活性碳上) (20 克)。將反應混合物在 40°C 下加熱 12 小時，然後經過矽藻土墊過濾。接著在減壓下移除溶劑，並將 1M 鹽酸 (40 毫升) 添加至粗製殘留物中。然後添加氫氧化鈉 (10N)，以調整 pH 至 12。將水層以醋酸乙酯 (2 x 150 毫升) 萃取，並脫水乾燥 (硫酸鎂)，接著於減壓下移除溶劑，獲得聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯 (155 克，100%)。HPLC (10-70) $R_t = 2.52$ ；MS m/z ：[$\text{M}+\text{H}^+$] 對 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 之計算值 297.15；實測值 297.3。

實例 2

3-[4-(聯苯-2-基胺甲鹽基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸

於聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯 (50 克，67.6 毫莫耳)

在二氯甲烷(500毫升)中之溶液內，添加丙烯酸(15.05毫升，100毫莫耳)。將所形成之混合物在50℃及回流下加熱18小時，然後移除溶劑。添加甲醇(600毫升)，並將此混合物於75℃下加熱2小時，接著冷卻至室溫，以形成濃稠漿液。藉過濾收集固體，以甲醇(50毫升)洗滌，及風乾，而得3-[4-(聯苯-2-基胺甲鹽基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸(61克，96%純度)，為白色粉末。

實例 3

N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}-甲鹽胺醋酸鹽

步驟 A - N-{5-[(R)-2-苄胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-苄氧基苯基}甲鹽胺

於500毫升三頸圓底燒瓶中，添加N-{2-苄氧基-5-[(R)-2-溴基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]苯基}甲鹽胺(100克，215毫莫耳)與N-甲基-2-四氫吡咯酮(300毫升)。添加苄胺(69.4毫升，648毫莫耳)，並將反應混合物以氮沖洗。接著，將反應混合物加熱至90℃，並攪拌約8小時。然後，使反應混合物冷卻至室溫，且添加水(1.5升)與醋酸乙酯(1.5升)。分離液層，並將有機層以水(500毫升)，水與飽和鹽水之1:1混合物(總計500毫升)，接著再一次以水(500毫升)洗滌。然後，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮，以提供粗製N-{5-[(R)-2-苄胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-苄氧基苯基}甲鹽胺(100克，90%產率，75-80%純度)，為橘褐色濃稠油。

步驟 B - N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}-甲醯胺醋酸鹽

使粗製 N-{5-[(R)-2-苄胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}甲醯胺(100 克, 194 毫莫耳)溶於甲醇(1 升)與醋酸(25 毫升, 291 毫莫耳)中。將所形成之混合物以乾燥氮滌氣, 然後添加碳上之氫氧化鈣(20 克, 20 重量%, 約 50% 水)。使氫起泡經過反應混合物, 並在室溫下攪拌約 10 小時。接著, 將混合物以乾燥氮滌氣, 並使混合物經過矽藻土過濾。使濾液於迴轉式蒸發器上濃縮, 且將醋酸乙酯(600 毫升)添加至殘留物中。將此混合物攪拌約 2 小時, 此時已發展成濃稠黃色漿液。過濾漿液, 並使沉澱物風乾, 以提供 N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}甲醯胺醋酸鹽(48 克, 98% 純度), 為黃白色固體。LCMS (10-70) $R_t = 3.62$; $[M+H^+]$ 實測值 311.3.

實例 4

聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

步驟 A - 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯

於 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸(480 毫克, 2.4 毫莫耳)在無水甲醇(8.2 毫升)中之經攪拌溶液內, 在 0°C 及乾燥氮下, 添加二氯化亞硫醯(0.538 毫升, 7.38 毫莫耳)。使所形成之混合物溫熱至室溫, 並攪拌約 7 小時。添加另外之二氯化亞硫醯(0.300 毫升), 並在室溫下持續攪拌過夜。於減壓下移除溶劑, 並

使殘留物溶於醋酸乙酯中。將此溶液以飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌，以無水硫酸鈉脫水乾燥，及在減壓下濃縮，以提供2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯(578毫克)，為淡黃色固體。HPLC (10-70) $R_t = 4.61$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.57 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 7.82 (s, 1H), 7.87 (s, 1H).

步驟B - 4-胺基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

於2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯(523毫克，2.5毫莫耳)在甲醇與水之9:1混合物(總計25毫升)中之經攪拌溶液內，在0℃下，添加氯化銨(401毫克，7.5毫莫耳)。分次添加鋅(1.63克，25毫莫耳)，並將所形成之混合物於室溫下攪拌過夜。然後，使反應混合物經過矽藻土過濾，並以甲醇洗滌矽藻土墊。使濾液在減壓下濃縮，且使所形成之殘留物溶於醋酸乙酯中。將此溶液以飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌，以無水硫酸鈉脫水乾燥，及在減壓下濃縮，以提供4-胺基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(450毫克)，為黃色油。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.14 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.85 (br s, 2H), 6.48 (s, 1H), 7.72 (s, 1H).

步驟C - 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

於3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸(670毫克，1.82毫莫耳)與4-胺基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(390毫克，2.18毫莫耳)在二氯甲烷(3.6毫升)與二異丙基乙胺(0.413毫升)中之經攪拌溶液內，添加六氟磷酸O-(7-氮苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基鎂(HATU) (829毫克，2.18毫莫耳)。將所形

成之混合物於室溫下攪拌過夜。然後以飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌混合物，以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮。使殘留物藉矽膠層析純化，以含有3%至5%甲醇之二氯甲烷溶離，以提供4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(568毫克，59%產率)。LCMS (10-70) $R_t = 4.55$; $[M+H^+]$ 實測值 530.4.

步驟 D - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於1M 氫化鋁鋇在 THF 中之經攪拌溶液(1.52 毫升，1.52 毫莫耳)內，在 0°C 下，添加 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(400 毫克，0.76 毫莫耳)。將所形成之混合物於 0°C 下攪拌 30 分鐘，然後添加 1M 氫氧化鈉水溶液(5 毫升)與水(5 毫升)之 1:1 混合物，並持續攪拌 2 小時。添加二氯甲烷，並分離有機層，以硫酸鈉脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑。使殘留物藉矽膠層析純化，以含有 5% 甲醇之二氯甲烷溶離，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯。LCMS (10-70) $R_t = 3.94$; $[M+H^+]$ 實測值 502.5.

步驟 E - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(151 毫克，0.3 毫莫耳)在二氯甲烷(3 毫升)中之溶液內，在 0°C 下，添加二甲亞砷(128 微升，1.8 毫莫耳)與二異丙基乙胺(157 微升，0.9 毫莫耳)。15 分鐘後，

添加三氧化硫吡啶複合物(143 毫克, 0.9 毫莫耳), 並在 0°C 下持續攪拌 1 小時。添加水, 以使反應淬滅, 並分離液層。使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥, 過濾, 及在減壓下移除溶劑, 獲得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(150 毫克, 100% 產率), 使用之而無需進一步純化。[M+H⁺] 實測值 500.4.

步驟 F - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

將聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(150 毫克, 0.30 毫莫耳)與 N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}甲醯胺(112 毫克, 0.36 毫莫耳)在二氯甲烷與甲醇之 1:1 混合物(總計 3.0 毫升)中之溶液, 於室溫下攪拌 30 分鐘。添加三乙醯氧基硼氫化鈉(191 毫克, 0.9 毫莫耳), 並將所形成之混合物於室溫下攪拌過夜。添加醋酸, 以使反應淬滅, 且使混合物在減壓下濃縮, 獲得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯, 使用之而無需進一步純化。LCMS (10-70) R_t = 4.55; [M+H⁺] 實測值 794.6.

步驟 G - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(238 毫克, 0.30 毫莫耳)在二氯甲烷(3.0 毫升)中之懸浮液內, 添加三乙胺三氟化氫(147 微升 0.90 毫莫耳)。將此混合物於室溫下攪拌過夜, 然後, 使混合物在減壓下濃縮。使殘留物藉預備之 RP-HPLC 純化(梯度液: 水中之 2 至 50% 乙腈, 具有 0.05% TFA)。收集適當溶離份, 且合併, 及凍乾, 獲得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯, 為二(三氟醋酸鹽)(50 毫克, 97% 純度)。LPLC (2-90) $R_t = 2.76$; $[M+H^+]$ 實測值 680.8。

實例 5

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯
步驟 A - 二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之 2 升圓底燒瓶中, 添加 4-碘基-2,5-二甲苯胺(100.0 克, 0.405 莫耳)(得自 Spectra 集團有限公司, Millbury, OH)。添加乙醇(1 升)與固體碳酸鉀(160 克, 1.159 莫耳), 然後以一份添加不含溶劑之溴化苄(140 毫升, 1.179 莫耳)。將所形成之混合物於 30°C 下攪拌約 18 小時, 此時 HPLC 顯示大於 98% 之轉化率。接著, 使混合物冷卻至室溫, 並添加己烷(1 升)。將此混合物攪拌 15 分鐘, 然後經過濾紙過濾, 以移除固體, 且以己烷(200 毫升)洗滌濾餅。使用迴轉式蒸發器, 使濾液之體積降至約 500 毫

升，及添加濃鹽酸(30毫升)。然後，將殘留溶劑使用迴轉式蒸發器移除。於所形成之殘留物中，添加己烷(500毫升)，並將此混合物攪拌約30分鐘，此時，自由流動性漿液已形成。過濾漿液，並以己烷(200毫升)洗滌濾餅，及乾燥，以提供二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺鹽酸鹽(115克，62%產率，97.5%純度)，為帶有綠色之固體。

將二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺鹽酸鹽轉移至3升燒瓶中，並添加甲苯(1升)與1M氫氧化鈉水溶液(1升)。將所形成之混合物攪拌1小時，然後分離液層。將有機層以稀鹽水(500毫升)洗滌，並藉迴轉式蒸發移除溶劑，以提供二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺(80克)，為半固體濃稠油(或者，於此步驟中可使用二氯甲烷取代甲苯)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 3.90 (s, 4H), 6.91 (s, 1H), 7.05-7.20 (m, 10H), 7.42 (s, 1H); MS [M+H⁺] 實測值 428.

步驟B - 4-二苄基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之1升3頸圓底燒瓶中，添加二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺(15克，35毫莫耳)。添加甲苯(300毫升)，並將所形成之混合物攪拌約15分鐘。將反應燒瓶以乾燥氮滌氣，並冷卻至約-20°C，且經由添液漏斗逐滴添加己烷中之1.6M正-丁基鋰(33毫升，53毫莫耳)。在添加期間，反應混合物之內部溫度係被保持低於-10°C。當添加完成時，將所形成之混合物在約-15°C下攪拌15分鐘。然後逐滴添加N,N-二甲基甲醯胺(10毫升，129毫莫耳)，同時保持內部反應溫度低於0°C。接著，將所形成

之混合物在 -20°C 至 0°C 下攪拌約 1 小時。然後添加 1M 鹽酸水溶液 (200 毫升)，歷經 5 分鐘期間，且將所形成之混合物攪拌 15 分鐘。接著分離液層，及以稀鹽水 (100 毫升) 洗滌有機層。然後，使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下移除溶劑，以提供 4-二苄基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽 (11.5 克，90% 產率，95% 純度)，為濃稠油，其係於靜置時固化。產物含有約 3 至 5% 脫碘基副產物。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.42 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 4.25 (s, 4H), 6.82 (s, 1H), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS $[\text{M}+\text{H}^+]$ 實測值 330.3.

步驟 C - 4-[1,3]二氧伍圈-2-基-2,5-二甲基苯胺

於 500 毫升圓底燒瓶中，添加 4-二苄基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽 (11.5 克，31.4 毫莫耳) 與甲苯 (150 毫升)，並將所形成之混合物攪拌，直到鹽完全溶解為止。然後，將反應燒瓶以乾燥氮滌氣 5 分鐘。添加乙二醇 (5.25 毫升，94.2 毫莫耳) 與對-甲苯磺酸 (760 毫克，6.2 毫莫耳)，並將所形成之混合物在 60°C 至 80°C 下加熱約 20 小時。接著在 40°C 下，於迴轉式蒸發器上慢慢移除溶劑 (歷經約 40 分鐘)。將甲苯 (100 毫升) 添加至殘留物中，並在 40°C 下，於迴轉式蒸發器上再一次慢慢地移除溶劑。使用另一液份之甲苯 (100 毫升) 重複此程序，並使混合物蒸發至乾涸。將醋酸乙酯 (150 毫升) 與飽和碳酸氫鈉水溶液 (100 毫升) 添加至殘留物中，且分離液層。將有機層以鹽水 (50 毫升) 洗滌，然後以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮，以提供粗製二苄基-(4-[1,3]

二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基-苯基)胺(11.4克)。

使粗製二苄基-(4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基-苯基)胺溶於乙醇與水之2:1混合物(總計150毫升)中，並將所形成之混合物以乾燥氮滌氣5分鐘。添加鈀/碳(2.3克，10重量%，含有約50%水)與固態碳酸氫鈉(1.0克)，並使所形成之混合物在約1大氣壓之氫氣及25°C至30°C下氫化約8小時。然後，使混合物經過矽藻土過濾，並於迴轉式蒸發器上濃縮濾液，以提供粗製4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯胺(5.6克，92%產率)，為濃稠油。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 3.7-3.9 (m, 4H), 3.95 (s, 4H), 5.59 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 7.0-7.25 (m, 11H).

步驟D - N-(4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺

於500毫升圓底燒瓶中，添加粗製4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯胺(5.6克，29毫莫耳)、二氯甲烷(100毫升)及二異丙基乙胺(7.6毫升，43.5毫莫耳)。將所形成之混合物於室溫下攪拌，直到成份溶解為止，然後，使混合物冷卻至0°C。接著逐滴添加氯化丙烯醯(2.35毫升，29毫莫耳)，歷經5分鐘期間。將反應混合物在0°C至5°C下攪拌1小時，接著添加水(50毫升)，並持續攪拌約30分鐘，此時微細固體已形成。過濾混合物，以收集固體。然後分離濾液層，並使有機層在減壓下濃縮至乾涸。將二氯甲烷(50毫升)添加至殘留物中，且將此混合物攪拌，直到自由流動性漿液已發展為止。過濾漿液(使用收集上文微細固體之相同漏斗)，並以二氯甲烷(10毫升)洗滌濾餅，及乾燥，以提供N-(4-[1,3]二氧伍圓

-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(3.1克, 97%純度), 為白色至灰白色固體。

然後, 使得自上文之濾液蒸發至乾涸, 並將甲醇(10毫升)添加至殘留物中。將此混合物攪拌15分鐘, 接著藉過濾收集沉澱物, 以甲醇(5毫升)洗滌, 並乾燥, 獲得第二份收取產物之N-(4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(0.8克, 95%純度)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 2.10 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.85-4.10 (m, 4H), 5.60-6.40 (m, 3H), 5.59 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.23 (s, 1H).

步驟E - 聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯鹽酸鹽

於50毫升圓底燒瓶中, 添加聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(1.2克, 4.04毫莫耳)與N-(4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(1.0克, 4.04毫莫耳)。添加乙醇(10毫升)與二氯甲烷(10毫升), 以形成漿液。將反應混合物在45°C至50°C下加熱約18小時, 然後冷卻至室溫。添加1M鹽酸水溶液(10毫升), 並將所形成之混合物激烈攪拌約3小時。添加二氯甲烷(10毫升), 且將所形成之混合物攪拌約5分鐘。接著分離液層, 並使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥, 過濾, 及於迴轉式蒸發器上濃縮, 以提供粗製聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯鹽酸鹽(1.9克)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.2-1.4 (m, 2H), 1.58-1.75 (m, 2H), 2.0-2.17 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.41-2.50 (m, 4H), 2.5-2.75 (m, 2H), 4.31-4.42 (m, 1H), 7.10-7.35 (m, 9H),

7.55 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.98 (s, 1H); MS [M+H⁺] 實測值 500.2.

步驟 F - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於 2 升三頸圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯鹽酸鹽 (38 克，70 毫莫耳) 與 N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}甲醯胺醋酸鹽 (33.6 克，91 毫莫耳)。添加二氯甲烷 (500 毫升) 與甲醇 (500 毫升)，並將所形成之混合物於室溫及乾燥氮下攪拌約 3 小時。然後，使反應混合物冷卻至 0°C 至 5°C，並分次添加固體三乙醯氧基硼氫化鈉 (44.5 克，381 毫莫耳)，歷經 10 分鐘期間。使反應混合物自 0°C 慢慢溫熱至室溫，歷經約 2 小時期間，然後冷卻至 0°C。添加飽和碳酸氫鈉水溶液 (500 毫升) 與二氯甲烷 (500 毫升)。將此混合物充分攪拌，接著分離液層。以鹽水 (500 毫升) 洗滌有機層，以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮，獲得粗製聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯 (55 克，86% 純度)，為黃色固體。

使粗產物 (30 克) 溶於含有 2% 甲醇之二氯甲烷 (總計 150 毫升) 中，並裝載至矽膠管柱 (300 克) 上，該管柱已經以含有 2% 甲醇與 0.5% 氫氧化銨之二氯甲烷裝填及達成平衡。使產物

自管柱溶離，使用含有2%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(1升)；含有4%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(1升)，及含有5%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(約3升)。收集溶離份(200毫升)，並合併此等具有純度大於90%之溶離份，及在減壓下濃縮，以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(21.6克，96.5%純度)，為帶黃色固體。MS $[M+H^+]$ 實測值 794.6。

步驟 G - 聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯氫化氫鹽

於1升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(21.5克，27.1毫莫耳)與二氯甲烷(200毫升)。將所形成之混合物於室溫下攪拌，直到成份溶解為止，然後添加三乙胺三氟化氫(8.85毫升，54.2毫莫耳)，並將所形成之混合物於25℃下攪拌約48小時。於迴轉式蒸發器上移除溶劑，以提供濃稠糊劑。將二氯甲烷(100毫升)與醋酸乙酯(200毫升)添加至糊劑中，並將所形成之混合物攪拌30分鐘。於乾燥氮下慢慢過濾所形成之漿液，且以二氯甲烷與醋酸乙酯之1:2混合物(總計100毫升)洗滌濾餅，在氮氣下乾燥2小時，接著於真空下乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-

二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯，為氟化氫鹽(25克，96.9%純度)，其為硬質黏土狀固體。MS $[M+H^+]$ 實測值 680.8.

步驟 H - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯

使聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯氟化氫鹽(25克)於6英吋逆相管柱(Microsorb固相)上，以三等份批次純化，使用乙腈在水中之10%至50%混合物，含有1%三氟醋酸，作為流動相。合併具有大於99%純度之溶離份，然後以一份體積之水稀釋。使所形成之混合物冷卻至0°C，並添加固態碳酸氫鈉，直到混合物之pH值約7.5至8.0為止。在約5分鐘內，發展成白色漿液。將此漿液攪拌30分鐘，然後過濾。以水(500毫升)洗滌濾餅，風乾約4小時，接著在真空中乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(12克，99+%純度)，為半結晶性自由態鹼。

實例 6

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯

步驟 A - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[1,3]二氧伍圈-2-基-2,5-二甲

基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於500毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(17.0克，58毫莫耳)與N-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(13.1克，52.9毫莫耳)。添加乙醇(150毫升)與二氯甲烷(150毫升)，以形成漿液。將反應混合物在50°C至55°C下加熱約24小時，然後冷卻至室溫。於迴轉式蒸發器上移除大部份溶劑，而造成濃稠漿液。添加乙醇(試藥級)，以形成總體積為約200毫升，並將所形成之混合物加熱至80°C，然後慢慢冷卻至室溫。過濾所形成之濃稠白色漿液，以乙醇(20毫升)洗滌，及在真空中乾燥，以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(23.8克，約98%純度)，為白色固體。

步驟B - 聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於500毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(15克，27.6毫莫耳)與乙腈(150毫升)，以形成漿液。添加2M鹽酸水溶液(75毫升)，並將所形成之混合物於30°C下攪拌1小時。然後，使混合物冷卻至室溫，並添加醋酸乙酯(150毫升)。添加2M氫氧化鈉水溶液(75毫升)，確認pH值，接著添加另外之2M氫氧化鈉，直到溶液之pH值係在9至10之範圍內為止。分離液層，且以稀鹽水(75毫升；1:1鹽水/水)洗滌有機層，以無水硫酸鈉脫水乾燥，及在迴轉式蒸發

器上移除溶劑，獲得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(12.5 克，約 98% 純度)。若需要，則此中間物之純度可藉由以乙醇(3 份體積之乙醇)形成漿液，將漿液加熱至 80°C，接著慢慢冷卻至室溫，及藉過濾單離而增加。

步驟 C - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基亞胺基]甲基}-2,5-二甲基-苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於 250 毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(7.1 克，14.2 毫莫耳)與 N-{5-[(R)-2-胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-羥苯基}甲醯胺醋酸鹽(5.8 克，15.6 毫莫耳)。添加甲醇(100 毫升)，以形成漿液，並將此混合物在 45°C 至 50°C 及氮氣下攪拌 1 小時。然後，使混合物冷卻至室溫，並添加甲苯(50 毫升)，且在溫度範圍從 35°C 至 45°C 下，於迴轉式蒸發器上移除溶劑。將甲苯(50 毫升)添加至殘留物中，並移除溶劑，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基亞胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(12 克)，為黃橘色固體。

步驟 D - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於氫化作用燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸

1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基亞胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(4.6克)與2-甲基四氫呋喃(50毫升)。將所形成之混合物攪拌，直到固體溶解(約5分鐘)為止，然後，將混合物以氮滌氣。添加鉑/碳(920毫克，5重量%，經承載活性碳)，並使混合物在50 psi(帕爾振盪器)下氫化6小時。接著，使混合物經過矽藻土過濾，並以2-甲基四氫呋喃(10毫升)洗滌矽藻土。於濾液中，添加硫丙基改質之矽膠(溶液重量之20%，Silicycle)，並將此混合物於25°C至30°C下攪拌3小時。然後，使混合物經過矽藻土過濾，及濃縮，以移除溶劑。使殘留物溶於甲醇(每克殘留物5毫升)中，接著，將所形成之溶液慢慢添加至飽和碳酸氫鈉水溶液與水之經激烈攪拌1:1混合物(每克殘留物40毫升)中，將所形成之灰白色漿液攪拌20分鐘，然後過濾。以水(20份體積)洗滌濾餅，風乾3小時，接著在真空中，於室溫下乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基亞胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(80%回收，約96%純度)。

步驟E - 聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯L-酒石酸鹽

於200毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙基亞胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡

啉-4-基酯(3.8克, 4.8毫莫耳)與2-甲基四氫呋喃(40毫升)。將所形成之混合物於室溫下攪拌, 直到成份溶解(約15分鐘)為止, 然後添加三乙胺三氟化氫(0.94毫升, 5.76毫莫耳), 並將所形成之混合物於25°C下攪拌約24小時。於此混合物中, 添加飽和碳酸氫鈉水溶液與水之1:1混合物(40毫升)及2-甲基四氫呋喃, 且將所形成之混合物攪拌, 直到固體溶解為止(溶液pH約8)。分離液層, 並將有機層以鹽水(30毫升)洗滌, 以無水硫酸鈉脫水乾燥, 過濾, 及於迴轉式蒸發器上濃縮。使殘留物溶於2-甲基四氫呋喃(50毫升)中, 並添加固體L-酒石酸(650毫克)。將所形成之混合物於25°C至30°C下攪拌18小時, 然後經過濾紙過濾。以2-甲基四氫呋喃(10毫升)、異丙醇(10毫升)洗滌濾餅, 且立即放置在真空下, 以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)-乙基]六氫吡啉-4-基酯L-酒石酸鹽(3.7克, >97%純度)。

步驟F - 聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)-乙基]六氫吡啉-4-基酯

於250毫升圓底燒瓶中, 添加聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)-乙基]六氫吡啉-4-基酯L-酒石酸鹽(3.5克)與甲醇(35毫升), 並將所形成之混合物攪拌15分鐘。添加飽和碳酸氫鈉水溶液與水之1:1混合物(70毫升), 歷經5分鐘期間, 並持續攪拌2小時。過濾所形成之灰白色漿液,

且以水(20 毫升)洗滌濾餅，風乾 2 小時，接著在真空中乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(2.3 克)，為半結晶性自由態鹼。

^1H 與 ^{13}C NMR 光譜係關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之試樣(22.2 毫克，在約 0.75 毫升 DMSO- d_6 中)，在環境溫度下，使用 JEOL ECX-400 NMR 光譜儀獲得：

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), 主要異構物 δ 9.64 (br, 1H), 9.54 (br s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 1.9$, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~ 7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.88 (dd, $J = 8.2, 1.9$, 1H), 6.79 (d, $J = 8.2$, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.53 (dd, $J = 7.3, 4.7$, 1H), 4.47 (m, 1H), ~ 3.65 與 ~ 3.60 (AB 對, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~ 2.59 (nd, 4H), 2.44 (br t, $J = 6.5$, 2H), 2.20 (s, 3H), ~ 2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, $J = \sim 9.0$, 2H).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), 較少異構物 δ 9.64 (br, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.26 (br d, $J = \sim 7.0$, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.50 (br d, $J = \sim 7.0$, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~ 7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), ~ 7.07 (nd, 1H), 6.95 (dd, $J = 8.3, 1.8$, 1H), 6.83 (d, $J = 8.3$, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.47 (m, 1H), ~ 3.65 與 ~ 3.60 (AB 對, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~ 2.59 (nd, 2H), 2.44 (br t, $J = 6.5$, 2H), 2.20 (s, 3H), ~ 2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, $J = \sim 9.0$, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), 主要異構物 δ 170.0, 159.9,

153.9, 145.5, 139.3, 137.6, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 125.6, 121.7, 118.6, 114.5, 71.4, 70.0, 57.4, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), 較少異構物 δ 170.0, 163.4, 153.9, 147.8, 139.3, 137.6, 135.7, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 123.0, 119.6, 115.6, 71.0, 70.0, 57.3, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

^1H 與 ^{13}C NMR 光譜係顯示主要異構物(約 82 莫耳百分比)與較少異構物(約 18 莫耳百分比)之存在，咸認係為由於環繞 -NH-C(O)H 鍵之位阻旋轉所造成之旋轉異構物。咸認在主要異構物中苯基對羰基氧係為同側，而在較少異構物中為對側。

實例 7

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲鹽基-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]-六氫吡啶-4-基酯

步驟 A - 4-碘基-2,5-二甲基苯胺

於 2,5-二甲苯胺(20 克，165 毫莫耳)在二氯甲烷與甲醇之 1:1 混合物(400 毫升)中之溶液內，添加碳酸氫鈉(20.8 克，250 毫莫耳)與二氯碘酸(I)四甲基銨(44.7 克，165 毫莫耳)。將所形成之混合物於室溫下攪拌 1 小時，然後添加水(500 毫升)。移除有機層，並以 5% 硫代硫酸鈉水溶液(500 毫升)及鹽水(500 毫升)洗滌。接著，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，過濾，及在真空下濃縮，以提供 4-碘基-2,5-二甲基苯胺(39.6 克，98% 產率)。使用此產物無需進一步純化。

步驟 B - N-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺

於4-碘基-2,5-二甲基苯胺(37.2克, 151毫莫耳)在二氯甲烷(500毫升)中之溶液內, 添加碳酸氫鈉(25.4克, 302毫莫耳)。使所形成之混合物冷卻至0°C, 並慢慢添加氯化丙烯醯(12.3毫升, 151毫莫耳), 歷經25分鐘期間。將所形成之混合物於室溫下攪拌過夜, 然後過濾。使濾液之體積降至約100毫升, 且沉澱物形成。過濾沉澱物, 乾燥, 以水(1升)洗滌, 接著再一次乾燥, 而得N-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(42.98克, 95%純度, 90%產率)。使用此產物無需進一步純化。

步驟 C - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-碘基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯

於N-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(32.2克, 107毫莫耳)在N,N-二甲基甲醯胺與異丙醇之6:1 v/v混合物(700毫升)中之溶液內, 添加聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(36.3克, 123毫莫耳)。將所形成之混合物於50°C下加熱24小時, 接著在80°C下24小時。然後, 使反應混合物冷卻至室溫, 及在真空下濃縮。使殘留物溶於二氯甲烷(1升)中, 並將此溶液以1N鹽酸水溶液(500毫升)、水(500毫升)、鹽水(500毫升)及飽和碳酸氫鈉水溶液(500毫升)洗滌。接著, 使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥, 及過濾。添加乙醇(400毫升), 並使所形成之混合物在真空下濃縮成體積為約400毫升, 此時沉澱物已形成。過濾沉澱物, 及乾燥, 而得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-碘基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯

(59.6 克，84% 純度，79% 產率)。m/z：[M+H⁺] 對 C₂₉H₃₂IN₃O₃ 之計算值 598.49；實測值 598.5。

步驟 D - 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-碘基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (56 克，94 毫莫耳) 在 N,N-二甲基甲醯胺與甲醇之 5:1 v/v 混合物 (600 毫升) 中之溶液內，添加二異丙基乙胺 (49 毫升，281 毫莫耳)、1,3-雙(二苯基膦基)丙烷 (3.9 克，9.4 毫莫耳) 及醋酸鈹 (II) (2.1 克，9.4 毫莫耳)。將所形成之混合物以一氧化碳滌氣，然後在 70°C 至 80°C 及一氧化碳大氣 (氣瓶壓力) 下攪拌過夜。在真空下濃縮反應混合物，並使殘留物溶於二氯甲烷 (500 毫升) 中。將此混合物以 1N 鹽酸水溶液 (500 毫升)、水 (500 毫升)，接著以鹽水 (500 毫升) 洗滌。然後，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，過濾，接著在真空下濃縮。將殘留物與乙醇混合 (約 5:1 v/w 乙醇對殘留物)，且將混合物加熱，直到所有固體物質溶解為止。使此溶液慢慢冷卻至室溫，並藉過濾單離所形成之沉澱物，而得 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯 (47.3 克，97% 純度，92% 產率)。m/z：[M+H⁺] 對 C₃₁H₃₅N₃O₅ 之計算值 530.63；實測值 530.4。

步驟 E - 聯苯-2-基胺甲基酸

1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基-苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

使 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯 (49.8 克，93.9 毫莫耳) 在四氫呋

喃(200 毫升)中之溶液冷卻至 0°C，並分次添加氫化鋰鋁(10.7 克，281.7 毫莫耳)(10 x 1.07 克)。將所形成之混合物攪拌 3 小時，然後添加水(10.7 毫升)，接著為 1N 氫氧化鈉水溶液(10.7 毫升)與另外之水(32.1 毫升)。將此混合物攪拌過夜，接著過濾。於真空下濃縮有機層，並將殘留物與醋酸乙酯混合(約 5:1 v/w 醋酸乙酯對殘留物)。將此混合物加熱，直到所有固體物質溶解為止，然後，使溶液冷卻至室溫。過濾所形成之沉澱物，及乾燥，而得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(24.6 克，95% 純度，47.5% 產率)。使用此物質而無需進一步純化。m/z: [M+H⁺] 對 C₃₀H₃₅N₃O₄ 之計算值 502.62；實測值 502.5。

步驟 F - 聯苯-2-基胺甲基酸

1-[2-(4-甲鹽基-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(5.0 克，10 毫莫耳)在二氯甲烷(200 毫升)中之溶液內，添加二異丙基乙胺(8.7 毫升，50 毫莫耳)與二甲亞碲(5.6 毫升，100 毫莫耳)。使所形成之混合物冷卻至 0°C，並添加三氧化硫吡啶複合物(8.0 克，50 毫莫耳)。將反應混合物在 0°C 下攪拌 1 小時，然後添加水(300 毫升)。移除有機層，並以 1N 鹽酸水溶液(300 毫升)及鹽水(300 毫升)洗滌。接著，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，及過濾。使用所形成之含有聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲鹽基-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之溶液，無需進一步純化。m/z: [M+H⁺] 對 C₃₀H₃₃N₃O₄ 之計算值 500.60；實測值 500.4。

實例 8

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 I 之製備

製備聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯 (55 毫克) 在乙腈 (2 毫升) 中之漿液，並於環境溫度下攪拌 2 天。藉過濾移除溶劑，並使固體於環境溫度下乾燥，以提供型式 I (50 毫克)。關於此結晶性自由態鹼型式之 PXRD、DSC 及 TGA 光譜係個別示於圖 1、4 及 7 中。

實例 9

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 II 之製備

製備聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯 (46 毫克) 在異丙醇 (2 毫升) 中之漿液，並於環境溫度下攪拌 2 天。藉過濾移除溶劑，並使固體於環境溫度下乾燥，以提供型式 II (43 毫克)。關於此結晶性自由態鹼型式之 PXRD、DSC 及 TGA 光譜係個別示於圖 2、5 及 8 中。

實例 10

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 III 之製備

製備聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(54 毫克)在乙醇(2 毫升)中之漿液，並於環境溫度下攪拌 2 天。藉過濾移除溶劑，並使固體於環境溫度下乾燥，以提供型式 III (48 毫克)。關於此結晶性自由態鹼型式之 PXRD、DSC 及 TGA 光譜係個別示於圖 3、6 及 9 中。

實例 11

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 II 之種晶之製備

使半結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(500 毫克)溶於甲醇(50 毫升)中，並添加水直到達成濁點為止。將所形成之混合物於 25°C 下攪拌 3 小時，並將所形成之結晶性物質藉過濾分離，以提供結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 II (420 毫克)。

實例 12

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 II 之結晶化作用

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之 3 升三頸圓底燒瓶中，添加半結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-

甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(14克)與甲醇(1.4升)。以一份添加水(500毫升)，然後，慢慢添加其他水(200毫升)，直到達成濁點為止。添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式II之種晶(50毫克)，並將所形成之混合物於25°C下攪拌3小時，此時已發展出自由流動性漿液。添加水(300毫升)，歷經15分鐘期間，並將所形成之混合物於25°C下攪拌過夜。接著，過濾混合物，並將濾餅以水(100毫升)洗滌，風乾約2小時，然後，在真空下，於室溫下乾燥48小時，以提供結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式II (12.5克，99.6%純度)。

實例 13

粉末X-射線繞射

粉末x-射線繞射圖樣係以 Thermo ARL X-射線繞射儀 X'TRA 型(Thermo ARL SA, Switzerland)獲得，使用 Cu K α 放射，在 1.542Å(45 kV, 40 mA)下，具有固態Peltier偵測器。此分析典型上係在2°/分鐘之掃描速率下，以每點0.03°之階層大小進行，涵蓋二 θ 角中2至40°之範圍。在度量之前，30-秒輕微手動研磨係在型式II上進行，以降低粒子大小。未在型式I與III上進行機械粒子大小降低。將試樣溫和地充填至定製石英試樣淺盤中，其係經設計以吻合至儀器上方裝填式試

樣杯中，以供分析。儀器係每週對矽金屬標準物校準，在 $\pm 0.02^\circ$ 二 θ 角內。關於結晶性聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式I、型式II及型式III之代表性原始未經處理之PXRD圖樣，係個別示於圖1、2及3中。

此外，下文關於各型式之二 θ 吸收峰位置係使用形態吻合函數獲得，包括背景扣除與平滑化例行作業：

型式I： 8.3 $\pm$ 0.3； 10.7 $\pm$ 0.3； 12.2 $\pm$ 0.3； 13.5 $\pm$ 0.3； 14.5 $\pm$ 0.3；
15.2 $\pm$ 0.3； 17.7 $\pm$ 0.3； 18.2 $\pm$ 0.3； 19.6 $\pm$ 0.3； 20.7 $\pm$ 0.3；
21.7 $\pm$ 0.3 及 23.2 $\pm$ 0.3.

型式II： 8.4 $\pm$ 0.3； 10.4 $\pm$ 0.3； 10.7 $\pm$ 0.3； 11.9 $\pm$ 0.3； 12.3 $\pm$ 0.3；
12.6 $\pm$ 0.3； 13.4 $\pm$ 0.3； 13.6 $\pm$ 0.3； 14.3 $\pm$ 0.3； 14.7 $\pm$ 0.3；
15.3 $\pm$ 0.3； 16.8 $\pm$ 0.3； 17.1 $\pm$ 0.3； 17.8 $\pm$ 0.3； 18.2 $\pm$ 0.3；
18.7 $\pm$ 0.3； 19.2 $\pm$ 0.3； 19.8 $\pm$ 0.3； 20.7 $\pm$ 0.3； 21.6 $\pm$ 0.3；
22.3 $\pm$ 0.3； 22.5 $\pm$ 0.3 及 23.2 $\pm$ 0.3.

型式III： 8.5 $\pm$ 0.3； 10.5 $\pm$ 0.3； 11.3 $\pm$ 0.3； 12.1 $\pm$ 0.3； 12.8 $\pm$ 0.3；
13.6 $\pm$ 0.3； 14.2 $\pm$ 0.3； 15.5 $\pm$ 0.3； 16.6 $\pm$ 0.3； 17.1 $\pm$ 0.3；
18.1 $\pm$ 0.3； 19.2 $\pm$ 0.3； 21.0 $\pm$ 0.3； 21.8 $\pm$ 0.3； 22.6 $\pm$ 0.3；
23.3 $\pm$ 0.3 及 24.5 $\pm$ 0.3.

實例 14

示差掃描卡計法

示差掃描卡計法(DSC)係使用具有 Thermal Analyst 控制器之 TA 儀器 Q-100 型模組進行。收集數據，並使用 TA 儀器 Thermal

Solutions 軟體進行分析。將約 1 毫克之試樣精確地稱重置於具有蓋之鋁淺盤中。試樣係使用 5°C / 分鐘之線性加熱爬升，從環境溫度至大約 300°C，進行評估。DSC 室係在使用期間以乾燥氮滌氣。關於結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 I、型式 II 及型式 III 試樣之代表性 DSC 軌跡，係個別示於圖 4、5 及 6 中。圖 5 証實結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 II 具有優越熱安定性，具有熔點在約 143°C 下。

實例 15

熱重分析

熱重分析 (TGA) 係使用裝有高解析能力之 TA 儀器 Q-500 型模組進行。收集數據，並使用 TA 儀器 Thermal Solutions 軟體分析。將重量約 10 毫克之試樣放置在鉑淺盤上，並以高解析加熱速率，從環境溫度至 300°C 進行掃描。天平與爐室係在使用期間以氮氣流滌氣。關於結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 I、型式 II 及型式 III 試樣之代表性 TGA 軌跡，係個別示於圖 7、8 及 9 中。

實例 16

動態濕氣吸著評估

動態濕氣吸著 (DMS) 評估 (亦稱為濕氣吸著 - 解吸附作用形態) 係對結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯之型式 I、型式 II 及型式 III 之手動研磨試樣，使用 VTI 大氣微量天平，SGA-100 系統 (VTI 公司, Hialeah, FL 33016) 進行。使用大約 10 毫克之試樣大小，並於開始分析時，將濕度設定在環境值下。典型 DMS 分析包括三種掃描：環境至 2% 相對濕度 (RH)、2% RH 至 90% RH、90% RH 至 5% RH，在 5% RH/階層之掃描速率下。質量係每兩分鐘度量，而當試樣之質量係安定至 0.01% 內，歷經 5 個連續點時，將 RH 改變至下一數值 (+/- 5%RH)。型式 I、型式 II 及型式 III 之代表性 DMS 軌跡，係個別示於圖 10、11 及 12 中。

圖 11 之 DMS 軌跡証實型式 II 具有可逆吸著/解吸附作用形態，具有適度 (<5%) 吸濕性。型式 II 在濕度範圍為 40% RH 至 75% RH 中，具有約 0.3 重量%之不顯著重量增加。可逆濕氣吸著/解吸附作用形態証實型式 II 具有可接受之吸濕性，且不易潮解。

實例 17

得自表現人類 M_1 ， M_2 ， M_3 及 M_4 毒蕈鹼受體之細胞之細胞培養物與細胞膜製劑

使安定地表現無性繁殖人類 hM_1 ， hM_2 ， hM_3 及 hM_4 毒蕈鹼受體亞型之 CHO 細胞系，個別地在經補充 10% FBS 與 250 微克/毫升基因素之 Hams F-12 培養基中生長至幾乎匯合。使細胞在 5% CO_2 ，37°C 培養器中生長，並以在 dPBS 中之 2 mM EDTA

除去。將細胞藉由5分鐘離心分離，在650 x克下收集，並將細胞九粒無論是於-80°C下冷凍儲存，或立即製備細胞膜供使用。關於細胞膜製劑，係使細胞九粒再懸浮於溶胞緩衝劑中，並以Polytron PT-2100組織瓦解器(Kinematica AG; 20秒 x 2次爆裂)均化。於4°C下，使粗製細胞膜在40,000 x克下離心15分鐘。然後，使細胞膜九粒以再懸浮緩衝劑再懸浮，並以Polytron組織瓦解器再一次均化。細胞膜懸浮液之蛋白質濃度係藉由Lowry等人, 1951, 生物化學期刊, 193, 265中所述之方法測得。將全部細胞膜以數液份冷凍儲存於-80°C下，或立即使用。所製成hM₅受體細胞膜之液份係直接購自PerkinElmer公司(Wellesley, MA)，並儲存於-80°C下直到使用為止。

實例 18

對毒蕈鹼受體之放射配位體結合檢測

對無性繁殖毒蕈鹼受體之放射配位體結合檢測係在96-井微滴定板中，於總檢測體積為100微升中進行。將安定地表現無論是hM₁，hM₂，hM₃，hM₄或hM₅毒蕈鹼亞型之CHO細胞膜，在檢測緩衝液中稀釋至下列專一標的蛋白質濃度(微克/井)：對hM₁為10微克，對hM₂為10-15微克，對hM₃為10-20微克，對hM₄為10-20微克，及對hM₅為10-12微克，以獲得類似訊息(cpm)。在檢測板添加之前，將細胞膜短暫地使用Polytron組織瓦解器均化(10秒)。用於測定放射配位體之K_D值之飽和結合研究，係使用L-[N-甲基-³H]莨菪胺氯化甲烷([³H]-NMS) (TRK666, 84.0 Ci/毫莫耳，Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, England), 在 0.001 nM 至 20 nM 範圍之濃度下進行。用於測定待測化合物 K_i 值之置換檢測, 係使用 [^3H]-NMS, 在 1 nM 及十一種不同待測化合物濃度下進行。首先使待測化合物在稀釋緩衝液中溶解至 400 μM 濃度, 然後以稀釋緩衝液連續性地稀釋 5x 至最後濃度範圍從 10 pM 至 100 μM 。對檢測板之添加順序與體積如下: 25 微升放射配位體、25 微升經稀釋之待測化合物及 50 微升細胞膜。將檢測板在 37°C 下培養 60 分鐘。藉由在已於 1% BSA 中預處理過之 GF/B 玻璃纖維濾板 (PerkinElmer 公司) 上快速過濾, 使結合反應終止。將濾板以洗滌緩衝劑 (10 mM HEPES) 沖洗三次, 以移除未結合之放射活性。接著, 使板風乾, 並將 50 微升 Microscint-20 液態閃爍流體 (PerkinElmer 公司) 添加至各井中。然後, 將板在 PerkinElmer TopCount 液體閃爍計數器 (PerkinElmer 公司) 上計數。結合數據係藉由非線性回歸分析, 使用 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA), 利用單一位置競爭模式進行分析。待測化合物之 K_i 值係使用 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) 生化藥理學, 22 (23): 3099-108), 計算自放射配位體所發現之 IC_{50} 值與 K_D 值。使 K_i 值轉化成 $\text{p}K_i$ 值, 以測定幾何平均與 95% 可信度間隔。然後, 將此等摘要統計學轉化回復至 K_i 值, 以供數據報告。

在此項檢測中, 較低 K_i 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高結合親和力。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基}甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (式 I 化合物), 對

M_1 , M_2 , M_3 , M_4 及 M_5 毒蕈鹼受體亞型具有 K_i 值低於 10 nM。

實例 19

得自表現人類 β_1 、 β_2 或 β_3 腎上腺素能受體之細胞之細胞培養物與細胞膜製劑

安定地表現無性繁殖人類 β_1 與 β_2 腎上腺素能受體之人類胚胎腎臟(HEK-293)細胞系或安定地表現無性繁殖人類 β_3 腎上腺素能受體之中國大頰鼠卵巢(CHO)細胞系，係在具有 10% FBS 之 DMEM 或 Hams F-12 培養基中，於 500 微克/毫升基因因素存在下，生長至幾乎匯合。將細胞單層以在 PBS 中 2 mM EDTA 去除。使細胞在 1,000 rpm 下，藉由離心分離形成粒狀，並將細胞丸粒無論是於 -80°C 下冷凍儲存，或立即製備細胞膜供使用。關於表現細胞膜之 β_1 與 β_2 受體之製備，係使細胞丸粒再懸浮於溶胞緩衝劑(10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4，於 4°C 下)中，並使用緊密安裝之 Dounce 玻璃均化器(30 次衝程)，在冰上均化。關於表現細胞膜之較具蛋白酶敏感性 β_3 受體，係使細胞丸粒在溶胞緩衝劑(10 mM Tris/HCl, pH 7.4)中均化，每 50 毫升緩衝劑補充一個片劑之"完全蛋白酶抑制劑混合藥片劑與 2 mM EDTA"(Roche 分子生物化學品, Indianapolis, IN)。使勻漿在 20,000 x 克下離心，並將所形成之丸粒按上述藉由再懸浮與離心分離，以溶胞緩衝劑洗滌一次。然後，使最後丸粒再懸浮於冰冷結合檢測緩衝劑(75 mM Tris/HCl, pH 7.4, 12.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA)中。細胞膜懸浮液之蛋白質濃度係藉由 Lowry 等人, 1951, 生物化學期刊, 193, 265; 及 Bradford, 分析生物化學, 1976, 72, 248-54 中所述之方法

測得。將全部細胞膜以數液份冷凍儲存於-80°C下，或立即使用。

實例 20

對人類 β_1 ， β_2 及 β_3 腎上腺素能受體之放射配位體結合檢測

結合檢測係在 96-井微滴定板中，於總檢測體積為 100 微升中，使用含有人類 β_1 ， β_2 或 β_3 腎上腺素能受體之 10-15 微克膜蛋白質，在檢測緩衝液 (75 mM Tris/HCl, pH 7.4，於 25°C 下，12.5 mM MgCl_2 ，1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中進行。用於測定放射配位體之 K_d 值之飽和結合研究，係使用 [^3H]-二氫烯丙心安 (dihydroalprenolol)(NET-720, 100 Ci/毫莫耳，PerkinElmer 生命科學公司，Boston, MA) 對 β_1 與 β_2 受體，及 [^{125}I]-(-)-碘基氰基品多羅 (cyanopindolol)(NEX-189, 220 Ci/毫莫耳，PerkinElmer 生命科學公司，Boston, MA)，在 10 或 11 種範圍從 0.01 nM 至 20 nM 之不同濃度下進行。用於測定待測化合物 K_i 值之置換檢測，係使用 [^3H]-二氫烯丙心安 (dihydroalprenolol) 在 1 nM 下，及 [^{125}I]-(-)-碘基氰基品多羅 (cyanopindolol) 在 0.5 nM 下，對待測化合物之 10 或 11 種不同濃度範圍從 10 pM 至 10 μM 下進行。非專一性結合係於 10 μM 丙嗪羅 (propranolol) 存在下測得。檢測係在 37°C 下培養 1 小時，然後藉由在已於 0.3% 聚乙烯亞胺中預浸泡過之對 β_1 與 β_2 受體為 GF/B 或對 β_3 受體為 GF/C 玻璃纖維濾板 (Packard 生物科技公司，Meriden, CT) 上快速過濾，使結合反應終止。將濾板以過濾緩衝劑 (75 mM Tris/HCl, pH 7.4，於 4°C 下，12.5 mM MgCl_2 ，1 mM EDTA) 洗滌三次，以移除未結合放射活性。接著，使板乾燥，並添加 50 微升 Microscint-20 液態

閃爍流體 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT), 且將板在 Packard TopCount 液體閃爍計數器 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT) 上計數。結合數據係藉由非線性回歸分析, 使用 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA), 利用單一位置競爭之 3-參數模式進行分析。曲線最低值係被固定為非專一性結合之數值, 當於 10 μ M 丙嗪羅 (propranolol) 存在下測定時。待測化合物之 K_i 值係使用 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng Y 與 Prusoff WH., 生化藥理學, 1973, 22, 23, 3099-108), 計算自放射配位體所發現之 IC_{50} 值與 K_d 值。

在此項檢測中, 較低 K_i 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高結合親和力。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基}甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (式 I 化合物) 對 β_2 腎上腺素能受體具有 K_i 值低於 10 nM, 而對 β_1 與 β_3 腎上腺素能受體具有 K_i 值大於 1000 nM。

實例 21

對毒蕈鹼受體亞型之拮抗作用之功能性檢測

檢測 A - cAMP 蓄積之激動劑所媒介抑制之阻抑

在此項檢測中, 待測化合物作為 hM_2 受體拮抗劑之功能性功效係藉由度量待測化合物在表現 hM_2 受體之 CHO-K1 細胞中阻斷弗斯科林 (forskolin) 所媒介 cAMP 蓄積之氧震顫素抑制之能力而測得。cAMP 檢測係在使用具有 125 I-cAMP (NEN SMP004B, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA) 之閃光板腺苷基環化酶活化作用檢測系統之放射免疫檢測格式中, 根據

製造者之說明書進行。將細胞以 dPBS 沖洗一次，並以胰蛋白酶-EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶 / 0.53 mM EDTA) 去除，按上文細胞培養物與細胞膜製劑段落中所述。將已脫離之細胞藉由在 650 x 克下離心五分鐘，於 50 毫升 dPBS 中洗滌兩次。然後，使細胞九粒再懸浮於 10 毫升 dPBS 中，並將細胞以 Coulter Z1 雙粒子計數器 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 計數。使細胞再一次於 650 x 克下離心五分鐘，並再懸浮於刺激緩衝劑中，至檢測濃度為 1.6×10^6 至 2.8×10^6 個細胞 / 毫升。

首先使待測化合物在稀釋緩衝液 (經補充 1 毫克 / 毫升 BSA (0.1%) 之 dPBS) 溶解至 400 μM 濃度，然後連續性地以稀釋緩衝液稀釋至最後莫耳濃度範圍為 100 μM 至 0.1 nM。氧震顫素係以類似方式稀釋。

為度量腺苷基環化酶活性之氧震顫素抑制，將 25 微升弗斯科林 (forskolin) (25 μM 最後濃度，於 dPBS 中稀釋)、25 微升經稀釋之氧震顫素及 50 微升細胞添加至激動劑檢測井中。為度量待測化合物阻斷氧震顫素抑制之腺苷基環化酶活性之能力，將 25 微升弗斯科林 (forskolin) 與氧震顫素 (個別為 25 μM 與 5 μM 最後濃度，在 dPBS 中稀釋)、25 微升經稀釋之待測化合物及 50 微升細胞添加至其餘檢測井中。

將反應物在 37°C 下培養 10 分鐘，並藉由添加 100 微升冰冷偵測緩衝劑使其停止。將板密封，在室溫下培養過夜，並於隔天早上，在 PerkinElmer TopCount 液體閃爍計數器 (PerkinElmer 公司, Wellesley, MA) 上計數。所產生之 cAMP 量 (微微莫耳 / 井) 係以關於試樣所發現之計數及如製造者之使用

者手冊中所述之 cAMP 標準為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用非線性回歸單一位置競爭方程式進行分析。Cheng-Prusoff 方程式係用以計算 K_{obs} ，使用氧震顫素濃度 - 回應曲線之 EC_{50} ，與氧震顫素檢測濃度，個別作為 K_D 與 $[L]$ 。

在此項檢測中，較低 K_{obs} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (式 I 化合物) 在表現 hM_2 受體之 CHO-K1 細胞中阻抑弗斯科林所媒介 cAMP 蓄積之氧震顫素抑制，係具有 K_{obs} 值低於約 10 nM。

檢測 B - 激動劑所媒介 [3S]GTP γ S 結合之阻抑

在此功能性檢測中，待測化合物作為 hM_2 受體拮抗劑之功能性功效係藉由度量待測化合物在表現 hM_2 受體之 CHO-K1 細胞中阻斷氧震顫素刺激之 [3S]GTP γ S 結合之能力而測得。

於使用時，係使已冷凍之細胞膜解凍，然後在檢測緩衝液中稀釋，具有最後靶組織濃度為每井 5 至 10 微克蛋白質。將細胞膜使用 Polytron PT-2100 組織瓦解器短暫地均化，然後添加至檢測板。

關於 [3S]GTP γ S 結合作用被激動劑氧震顫素刺激之 EC_{90} 值 (提供 90% 最大回應之有效濃度) 係於各實驗中測定。

為測定待測化合物抑制氧震顫素刺激之 [3S]GTP γ S 結合

作用之能力，將下列添加至96井板之各井中：具有 $[^3\text{H}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ (0.4 nM) 之25微升檢測緩衝液，25微升氧震顫素 (EC90) 與GDP (3 μM)，25微升經稀釋之待測化合物，及表現hM₂受體之25微升CHO細胞膜。然後，將檢測板在37°C下培養60分鐘。將檢測板於1% BSA-預處理過之GF/B濾器上過濾，使用PerkinElmer 96-井採集器。將板以冰冷洗滌緩衝劑沖洗3 x 3秒，然後經空氣或真空乾燥。將Microscint-20閃爍液體(50微升)添加至各井，並將各板密封，及在TopCount (PerkinElmer)上計數放射活性。數據係藉由非線性回歸分析，以GraphPad Prism包裝軟體(GraphPad軟體公司, San Diego, CA)，使用非線性回歸單一位置競爭方程式進行分析。Cheng-Prusoff方程式係用以計算 K_{obs} ，使用待測化合物之濃度-回應曲線之IC₅₀值，與氧震顫素在檢測中之濃度，個別作為 K_{D} 與[L]配位體濃度。

在此項檢測中，較低 K_{obs} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(式I化合物)在表現hM₂受體之CHO-K1細胞中對阻抑氧震顫素刺激之 $[^3\text{H}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合具有 K_{obs} 值低於約10 nM。

檢測 C - 經由 FLIPR 檢測之激動劑所媒介鈣釋出之阻抑

在此功能性檢測中，待測化合物作為hM₁, hM₃及cM₅受體之拮抗劑之功能性功效，係藉由度量待測化合物抑制激動劑所媒介胞內鈣上增加之能力而測得。

將安定地表現此等受體之CHO細胞，在進行檢測之前一晚，接種至96-井FLIPR板中。經接種之細胞係以FLIPR緩衝劑(10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM 氯化鈣, 2.5 mM 羧苯磺胺(probenecid)，在未具有鈣與鎂之Hank氏緩衝鹽溶液(HBSS)中)，使用Cellwash (MTX LabSystems公司)洗滌兩次，以移除生長培養基。於洗滌後，各井含有50微升FLIPR緩衝劑。然後，將細胞以50微升/井之4 μ M FLUO-4AM (製成2X溶液)，在37°C，5%二氧化碳下培養40分鐘。在染料培養期之後，將細胞以FLIPR緩衝劑洗滌兩次，留下50微升之最後體積於各井中。

測定關於氧震顫素之胞內 Ca^{2+} 釋出之劑量依賴性刺激，以致待測化合物可針對氧震顫素刺激，在 EC_{90} 濃度下度量。首先，將細胞以化合物稀緩衝液培養20分鐘，然後添加氧震顫素。氧震顫素之 EC_{90} 值係根據詳述於下文之FLIPR度量與數據還原段落中之方法，並搭配公式 $\text{EC}_F = ((F/100-F)^{1/H}) * \text{EC}_{50}$ 而產生。3 x EC_F 之氧震顫素濃度係在刺激板中製備，以致係將氧震顫素之 EC_{90} 濃度添加至試驗檢測板中之各井。

用於FLIPR之參數為：曝光長度0.4秒，雷射強度0.5瓦特，激發波長488毫微米，及發射波長550毫微米。基線係在添加氧震顫素之前，藉由度量螢光上之改變，歷經10秒而測得。在氧震顫素刺激之後，FLIPR係連續地度量螢光之改變，每0.5至1秒，歷經1.5分鐘，以捕獲最大螢光變化。

螢光之改變係表示為對各井之最大螢光減去基線螢光。

原始數據係藉由非線性回歸，以 GraphPad Prism (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用 S 形劑量-回應之內建模式，對著待測化合物濃度之對數進行分析。拮抗劑 K_{0bs} 值係藉由 Prism，使用氧震顫素 EC_{50} 值作為 K_D ，與氧震顫素對於配位體濃度之 EC_{90} ，根據 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng & Prusoff, 1973) 測得。

在此項檢測中，較低 K_{0bs} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(式 I 化合物)在安定地表現 hM_1 、 hM_3 及 cM_5 受體之 CHO 細胞中對阻抑激動劑所媒介之鈣釋出具有 K_{0bs} 值低於約 10 nM。

實例 22

在異種地表現人類 β_1 、 β_2 或 β_3 腎上腺素能受體之 HEK-293 與 CHO 細胞系中之全細胞 cAMP 閃光板檢測

cAMP 檢測係在使用具有 [125 I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA) 之閃光板腺苷基環化酶活化作用檢測系統之放射免疫檢測格式中，根據製造者說明書進行。為測定 β_1 與 β_2 受體激動劑功效 (EC_{50})，係使安定地表現無性繁殖人類 β_1 與 β_2 受體之 CHO-K1 HEK-293 細胞系，在經補充 10% FBS 與基因素 (500 微克/毫升) 之 DMEM 中生長至幾乎匯合。為測定 β_3 受體激動劑功效 (EC_{50})，係使安定地表現無性繁殖人類或 β_3 腎上腺素能受體之 CHO-K1 細胞系在經補充 10% FBS 與基因素 (250 微克/毫升) 之

Hams F-12 培養基中生長至幾乎匯合。將細胞以 PBS 沖洗，並在含有 2 mM EDTA 或胰蛋白酶-EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶 / 0.53 mM EDTA) 之 dPBS (Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝之鹽水，未具有 CaCl_2 與 MgCl_2) 中脫離。在 Coulter 細胞計數器中計數細胞後，使細胞在 1,000 rpm 下，藉由離心分離形成粒狀，並再懸浮於含有 IBMX (PerkinElmer 套件) 而經預溫熱至室溫之刺激緩衝劑中，至 1.6×10^6 至 2.8×10^6 個細胞 / 毫升之濃度。於此項檢測中，每井使用約 40,000 至 80,000 個細胞。將待測化合物 (10 mM 在 DMSO 中) 稀釋至 PBS 中，其含有 0.1% BSA 在 Beckman Biomek-2000 中，並在 100 μM 至 1 pM 範圍之 11 種不同濃度中測試。使反應物在 37°C 下培養 10 分鐘，並藉由添加含有 ^{125}I -cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, M.A.) 之 100 微升冷偵測緩衝劑使其停止。所產生 cAMP 之量 (微微莫耳 / 井) 係以關於試樣所發現之計數與如製造者之使用者手冊中所述之 cAMP 標準作為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用 S 形方程式進行分析。Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng Y 與 Prusoff WH., 生化藥理學, 1973, 22, 23, 3099-108) 係用以計算 EC_{50} 值。

在此項檢測中，較低 EC_{50} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (式 I 化合物) 對 β_2 腎上腺素能受體具有 EC_{50} 值低於約 10 nM; 對 β_1 腎上腺

素能受體之 EC_{50} 值約 30 nM；而對 β_3 腎上腺素能受體之 EC_{50} 值大於 700 nM。

實例 23

使用以內源方式表現人類 β_2 腎上腺素能受體之肺臟上皮細胞系之全細胞 cAMP 閃光板檢測

在此項檢測中，待測化合物之激動劑功效與內在活性係使用表現 β_2 腎上腺素能受體內源含量之細胞系測得。使得自人類肺臟上皮細胞系之細胞 (BEAS-2B) (ATCCC RL-9609, 美國培養物類型收集處, Manassas, VA) (January B 等人, 英國藥理學期刊, 1998, 123, 4, 701-11) 在完全、不含血清之培養基 (LHC-9 培養基, 含有腎上腺素與視黃酸, Biosource 國際, Camarillo, CA) 中生長至 75-90% 匯合。於檢測前一天, 將培養基轉換成 LHC-8 (無腎上腺素或視黃酸, Biosource 國際, Camarillo, CA)。cAMP 檢測係在使用具有 [125 I]-cAMP 之閃光板腺苷基環化酶活化作用檢測系統 (NEN SMP004, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA) 之放射免疫檢測格式中, 根據製造者說明書進行。

於檢測當天, 將細胞以 PBS 沖洗, 經由以 PBS 中之 5 mM EDTA 磨擦而去除, 及計數。使細胞在 1,000 rpm 下, 藉由離心分離形成粒狀, 並再懸浮於經預熱至 37°C 之刺激緩衝劑中, 於最後濃度為 600,000 個細胞/毫升下。於此項檢測中, 細胞係在最後濃度為 100,000 至 120,000 個細胞/井下使用。將待測化合物連續性地稀釋至檢測緩衝液 (75 mM Tris/HCl pH 7.4, 於 25°C 下, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中, 在

Beckman Biomek-2000 中。待測化合物係在檢測中，於範圍為 10 μ M 至 10 pM 之 11 種不同濃度下測試。使反應物在 37°C 下培養 10 分鐘，並藉由添加 100 微升冰冷偵測緩衝劑停止。將板密封，於 4°C 下培養過夜，並於隔天早上，在 TopCount 閃爍計數器 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT) 上計數。每毫升反應物所產生之 cAMP 量係以關於試樣所發現之計數及如製造者之使用者手冊中所述之 cAMP 標準為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用關於 S 形劑量-回應之 4-參數模式進行分析。

在此項檢測中，較低 EC₅₀ 值表示待測化合物對受體測試具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基}甲基)-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (式 I 化合物) 具有 EC₅₀ 值低於 10 nM，且內在活性值大於 0.3，與完全 β_2 激動劑異丙基腎上腺素 (1.0) 作比較。

實例 24

用於測定枝氣管保護性功效與延續時間之 Einthoven 檢測

在此項檢測中，係使用天竺鼠測定待測化合物之枝氣管保護性功效與延續時間。此項檢測係衍生自 Einthoven (1892) *Pfugers Arch.* 51: 367-445；與 Mohammed 等人 (2000) *Pulm Pharmacol Ther.* 13 (6): 287-92 中所述之程序。在此項檢測中，於換氣壓力上之改變係充作氣道阻力之替代度量方式。在以待測化合物預處理之後，毒蕈鹼拮抗劑功效係於丙喏羅 (propranolol)

存在下，使用對靜脈內乙醯甲膽鹼之枝氣管收縮劑劑量-回應曲線測定。同樣地， β_2 激動劑枝氣管保護性功效係使用組織胺測定。合併之枝氣管保護性功效係於丙喏羅不存在下，使用乙醯甲膽鹼測定。

檢測係使用體重在250與400克間之雄性Duncan-Hartley天竺鼠(Harlan, Indianapolis, IN)進行。待測化合物或媒劑(意即無菌水)係在全身曝露服藥室(R+S模具, San Carlos, CA)中，使用5毫升服藥溶液，藉吸入(IH)服藥，歷經10分鐘時期。使動物曝露至氣溶膠，其係自LC星型霧化罐套組(22F51型, PARI呼吸設備公司, Midlothian, VA)產生，在22 psi之壓力下，藉由Bioblend (5% CO₂ ; 21% O₂ ; 及74% N₂之混合物)逐出。肺功能係在吸入服藥後，於不同時點下評估。

在檢測開始之前七十五分鐘，以肌內(IM)注射氯胺酮(43.7毫克/公斤/甲苯噻吡(3.5毫克/公斤)/乙醯普馬吡(1.05毫克/公斤)之混合物，使天竺鼠麻醉。按需要投予此混合物之補充劑量(首次劑量之50%)。單離頸靜脈與頸動脈，並以充填鹽水之聚乙烯導管(個別為微瑞那散(renathane)與PE-50, Beckton Dickinson, Sparks, MD)進行插管。將頸動脈連接至壓力傳感器，以允許度量血壓，而頸靜脈套管係用於IV注射無論是乙醯甲膽鹼或組織胺。然後，將氣管分割開來，並以14克針頭(#NE-014, 小零件, Miami Lakes, FL)插管。一旦完成套管插入法，將天竺鼠使用呼吸器(683型, Harvard裝置公司, MA)進行換氣，設定在每搏量1毫升/100克體重下，但不超過2.5毫升體積，及在每分鐘100搏之速率下。換氣壓力(VP)

係在氣管套管中，使用經連接至Biopac (TSD 137C) 預放大器之Biopac傳感器度量。體溫係使用加熱墊被保持在37°C下。在起始數據收集之前，以腹膜腔內方式(IP)投予戊巴比妥(25毫克/公斤)，以壓抑自然呼吸，及獲得安定基線。於VP上之改變係被記錄在Biopac Windows數據收集界面上。收集基線值，歷經至少5分鐘，於此段時間後，以非累積方式，使用2-倍增量之枝氣管收縮劑(乙醯甲膽鹼或組織胺)劑量，以IV激發天竺鼠。當使用乙醯甲膽鹼作為枝氣管收縮劑時，將動物以丙喏羅(5毫克/公斤，IV)預處理，以隔離待測化合物之抗毒蕈鹼作用。丙喏羅係在建構對乙醯甲膽鹼或組織胺之劑量回應曲線之前30分鐘投予。於VP上之改變係使用承認數據收集軟體(Santa Barbara, CA)記錄。在研究完成後，使動物安樂死。

於VP上之改變係以水之公分數度量。於VP上之改變(公分H₂O) = 尖峰壓力(於枝氣管收縮劑激發後) - 尖峰基線壓力。將對乙醯甲膽鹼或組織胺之劑量回應曲線吻合至四參數計算術方程式，使用GraphPad Prism Windows 3.00版(GraphPad軟體, San Diego, California)。使用下列方程式：

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID}_{50} - X) * \text{Hill斜率})})$$

其中X為劑量之對數，Y為回應。Y係在Min下開始，且漸近地趨近至Max，具有S形之形狀。

對乙醯甲膽鹼或組織胺之次最高劑量之枝氣管收縮劑回應之抑制百分比，係在待測化合物之各劑量下，使用下列方程式計算：回應之抑制% = 100 - ((尖峰壓力(於枝氣管收縮

劑激發後，經處理)-尖峰基線壓力(經處理)/(尖峰壓力(於枝氣管收縮劑激發後，水)-尖峰基線壓力(水) $\times 100$)。抑制作用曲線係使用四參數計算術方程式 GraphPad 軟體吻合。 ID_{50} (為產生枝氣管收縮劑回應之 50% 抑制作用所需要之劑量)與 E_{max} (最高抑制)亦在適當情況下估計。

於待測化合物吸入後，在不同時間點下之枝氣管保護程度，係用以估計藥力半生期(PD $T_{1/2}$)。PD $T_{1/2}$ 係使用非線性回歸吻合，使用單相指數衰減方程式(GraphPad Prism, 4.00 版)測定： $Y = \text{跨距} \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{平坦區}$ ；於跨距+平坦區下開始，並以速率常數 K 衰減至平坦區。PD $T_{1/2} = 0.69/K$ 。平坦區係被強制為 0。

在服藥後 1.5 小時，發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(式 I 化合物)，對乙醯甲膽鹼所引致之枝氣管縮小及組織胺所引致之枝氣管縮小兩者，具有 ID_{50} 低於約 50 微克/毫升。

此外，當以單一次最高劑量(100 微克/毫升)投藥時，此化合物會產生顯著枝氣管保護，歷經至高約 72 小時。在此項檢測中，沙美特醇(salmeterol) (3 微克/毫升, IH) (β_2 腎上腺素能受體激動劑)顯示顯著枝氣管保護，歷經 6 至 14 小時；及提歐多平(tiotropium) (10 微克/毫升) (毒蕈鹼受體拮抗劑)顯示顯著枝氣管保護，歷經大於 72 小時。

【圖式簡單說明】

本發明之各方面係參考所伴隨之附圖作說明。

圖 1、2 及 3 係個別顯示關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼之型式 I、II 及 III 之粉末 x-射線繞射 (PXRD) 圖樣。

圖 4、5 及 6 係個別顯示關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼之型式 I、II 及 III 之示差掃描卡計法 (DSC) 軌跡。

圖 7、8 及 9 係個別顯示關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼之型式 I、II 及 III 之熱重分析 (TGA) 軌跡。

圖 10、11 及 12 係個別顯示關於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼之型式 I、II 及 III 之動態濕氣吸著 (DMS) 軌跡。

雖然本發明已參考其特定方面或具體實施例加以描述，但一般熟諳此藝者將明瞭的是，可施行各種改變，或等效事物可在未偏離本發明之真實精神與範圍下經取代。此外，達可應用專利法與條例所允許之程度，於本文中所引用之所有刊物、專利及專利申請案係據此以其全文併入供參考，達猶如各文件已個別地併入本文供參考一般之相同程度。

五、中文發明摘要：

本發明係關於聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式，或其溶劑合物。本發明亦關於含有或製自此種結晶型之醫藥組合物；可用於製備此種結晶型之方法與中間物；及使用此種結晶型以例如治療肺病之方法。

六、英文發明摘要：

The invention relates to crystalline free base forms of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbonyl)ethyl]piperidin-4-yl ester or a solvate thereof. This invention also relates to pharmaceutical compositions containing or prepared from such crystalline forms; processes and intermediates useful for preparing such crystalline forms; and methods of using such crystalline forms to, for example, treat a pulmonary disorder.

十、申請專利範圍：

1. 一種聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式。
2. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其具有型式 I。
3. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其具有型式 II。
4. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其具有型式 III。
5. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，具有繞射吸收峰於 2θ 值為約 17.7 ± 0.3 、 18.2 ± 0.3 、 21.7 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。
6. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，具有繞射吸收峰於 2θ 值為約 20.7 ± 0.3 、 21.6 ± 0.3 、 22.5 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。
7. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，具有繞射吸收峰於 2θ 值為約 15.5 ± 0.3 、 18.1 ± 0.3 、 19.2 ± 0.3 及 21.8 ± 0.3 下。
8. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係實質上根據圖 1 中所示圖樣之吸收峰位置。
9. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係實質上根據圖 2 中所示圖樣之吸收峰位置。
10. 如請求項 1 之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以粉末 x-射線繞射圖樣為特徵，其中吸收峰位置係

實質上根據圖3中所示圖樣之吸收峰位置。

11. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係顯示最高吸熱熱流在約132°C至約138°C之範圍內。
12. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係顯示最高吸熱熱流在約142°C至約150°C之範圍內。
13. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係顯示最高吸熱熱流在約134°C至約140°C之範圍內。
14. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係實質上根據圖4中所示者。
15. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係實質上根據圖5中所示者。
16. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其中結晶性自由態鹼型式係以示差掃描卡計法軌跡為特徵，其係實質上根據圖6中所示者。
17. 如請求項1之結晶性自由態鹼型式，其係呈微粉化型式。
18. 一種醫藥組合物，其包含藥學上可接受之載劑與如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式。
19. 一種醫藥組合物，其包含：

(a) 如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式；

(b)類固醇消炎劑；及

(c)藥學上可接受之載劑。

20.一種等滲鹽水溶液，其係經由使如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式溶於含水等滲鹽水中而製成；其中該溶液具有在約4至約6範圍內之pH值。

21.一種治療劑之組合，其包含：

(a)如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式；與

(b)類固醇消炎劑。

22.一種如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療慢性阻塞肺病或氣喘。

23.一種如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式於藥劑製造上之用途，該藥劑係在哺乳動物中產生枝氣管擴大作用。

24.一種如請求項1至17中任一項之結晶性自由態鹼型式於藥劑製造上之用途，該藥劑係在哺乳動物中拮抗蠅蕈鹼受體，及催動 β_2 腎上腺素能受體。

25.一種製備如請求項1之結晶性自由態鹼型式之方法，此方法包括：

(a)提供聯苯-2-基胺甲酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯在稀釋劑中之溶液；

(b)添加反萃溶劑至得自步驟(a)之溶液中，以產生濁點。

26.一種製備如請求項1之結晶性自由態鹼型式之方法，此方

法包括：

(a) 提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯在稀釋劑中之溶液；

(b) 添加反萃溶劑至得自步驟(a)之溶液中，以產生濁點；然後

(c) 添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之結晶性自由態鹼型式之種晶。

27. 如請求項 1 至 17 中任一項之結晶性自由態鹼型式，其係用於治療上。

28. 一種如請求項 1 至 17 中任一項之結晶性自由態鹼型式於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療肺病。

十一、圖式：

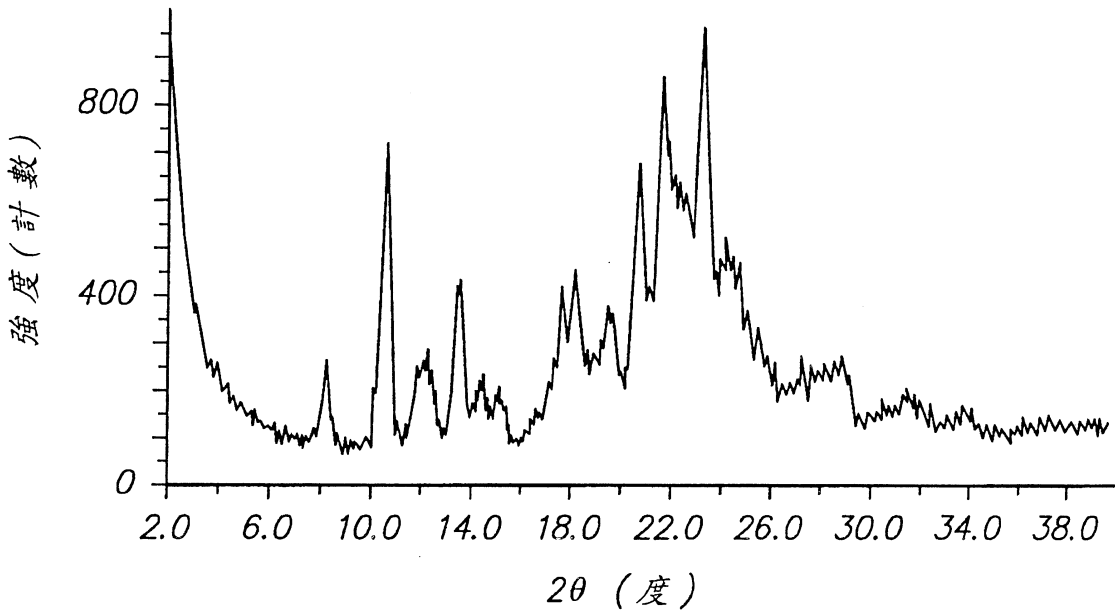


圖1

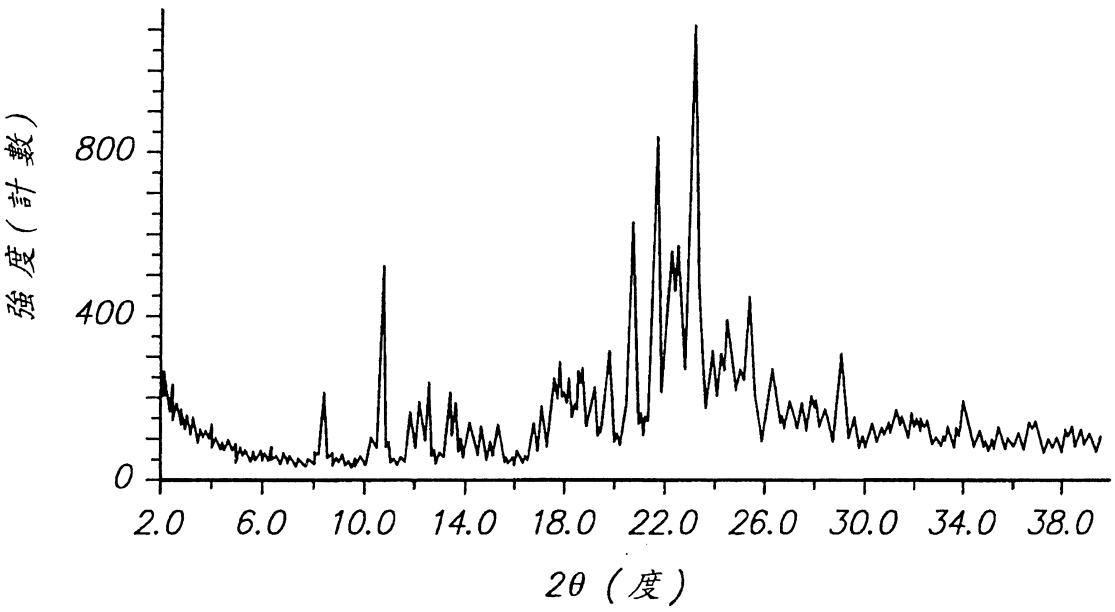


圖2

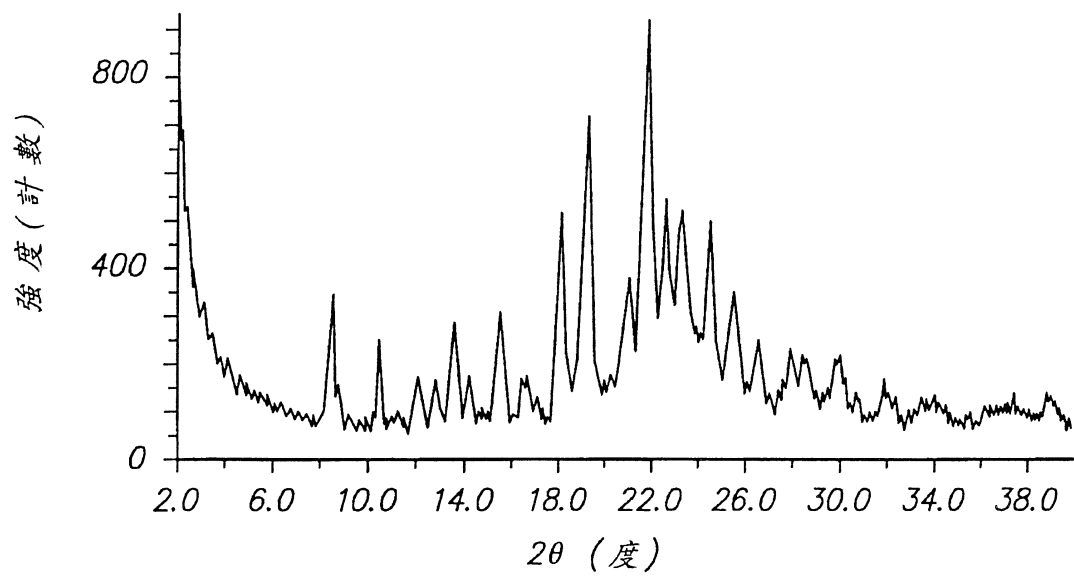


圖3

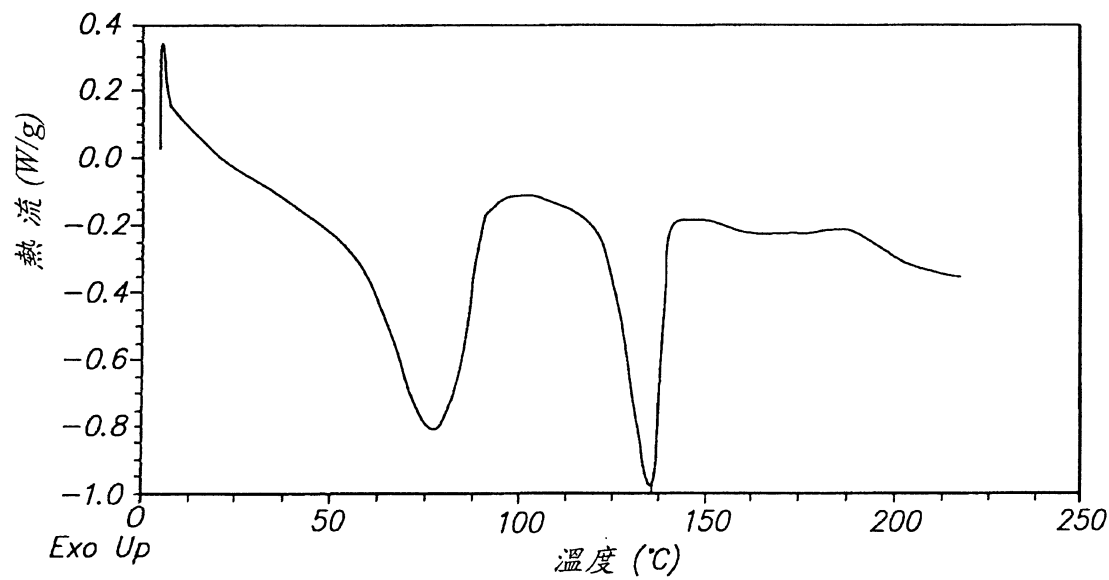


圖4

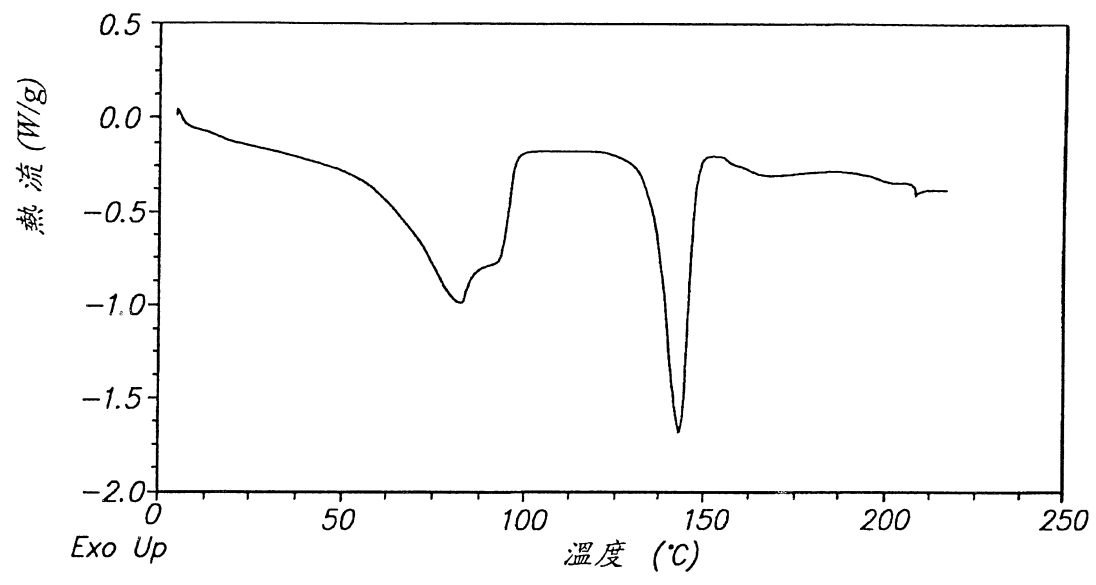


圖5

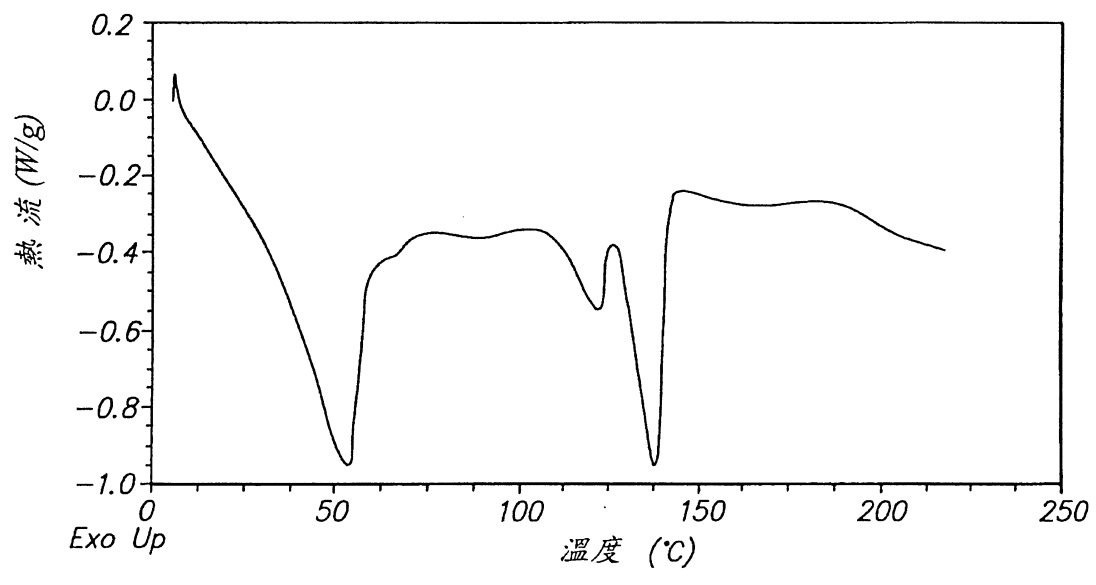


圖6

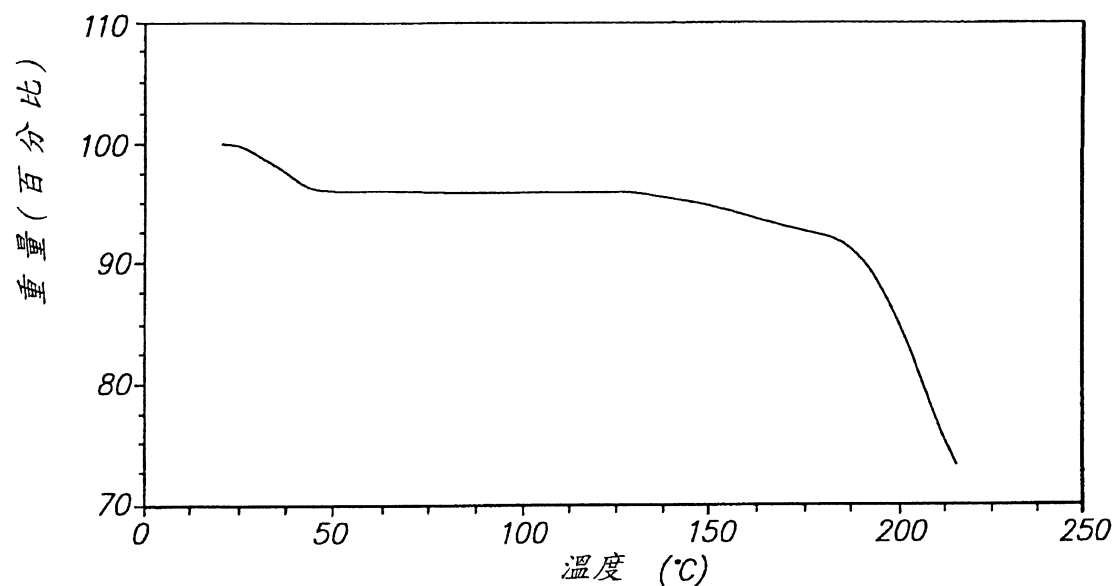


圖7

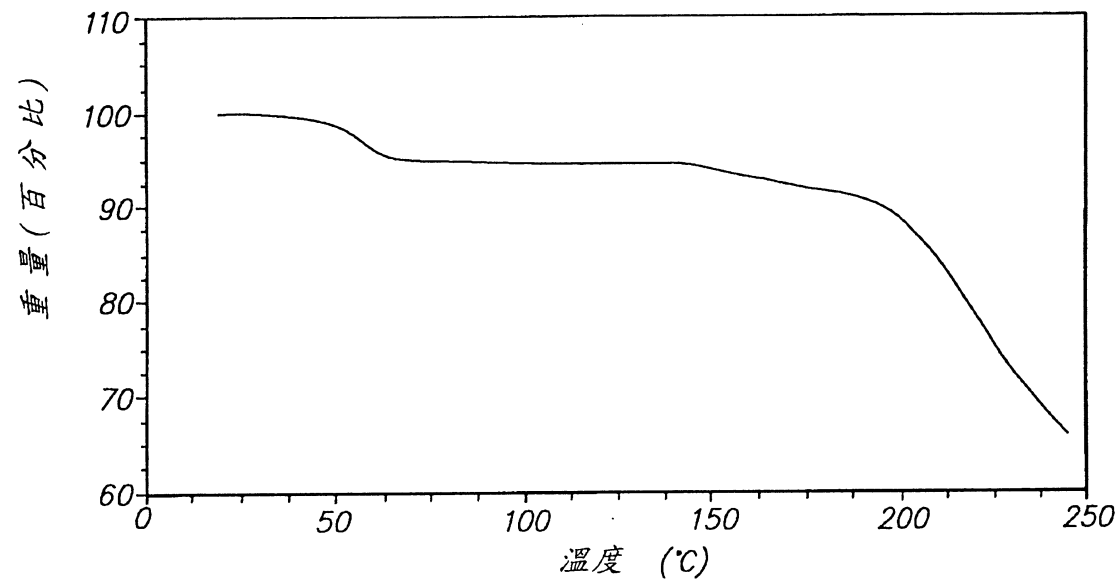


圖8

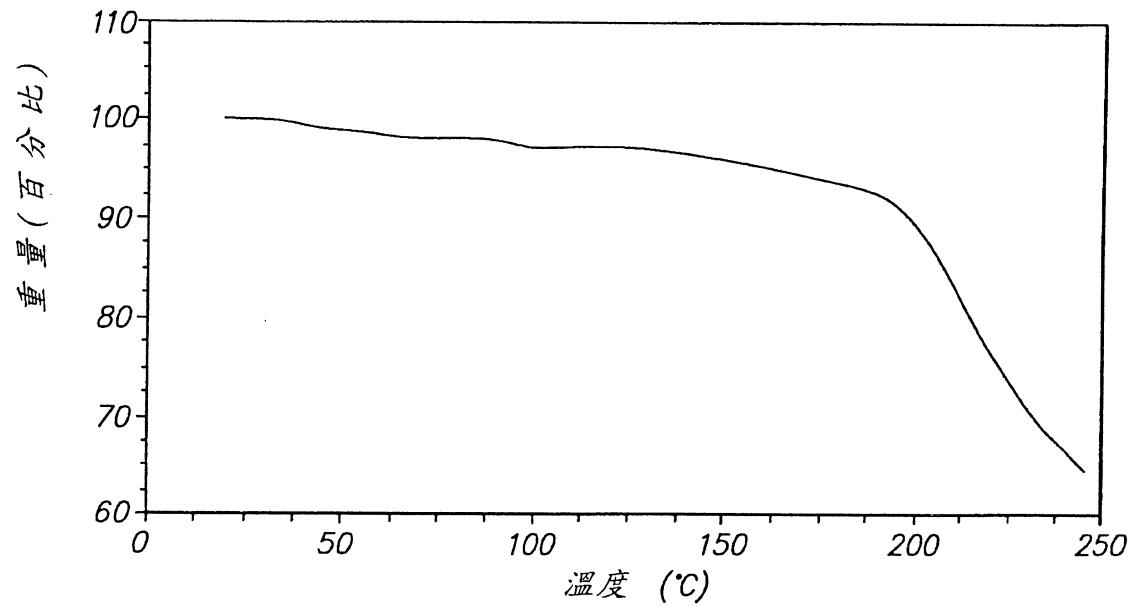


圖9

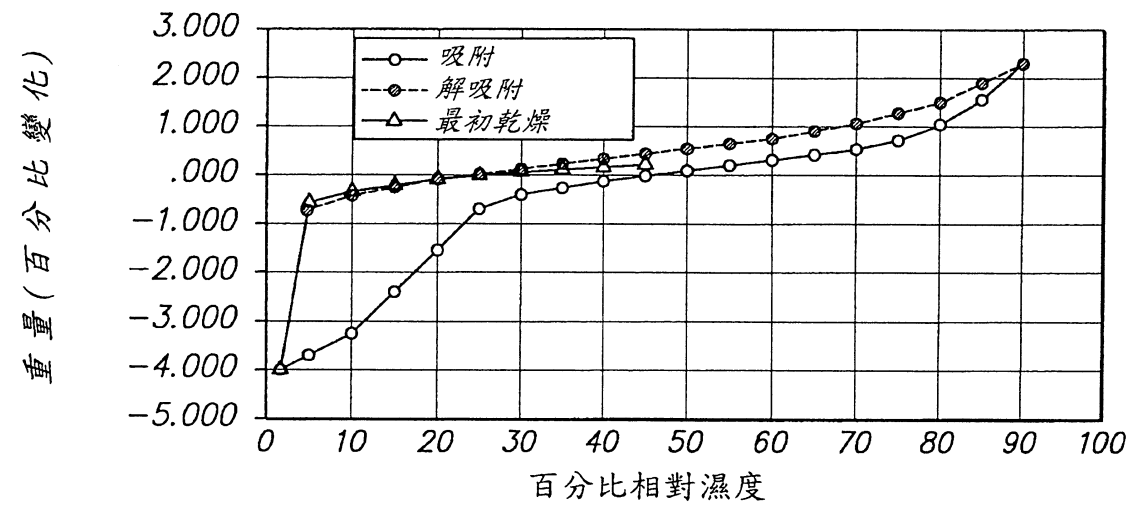


圖10

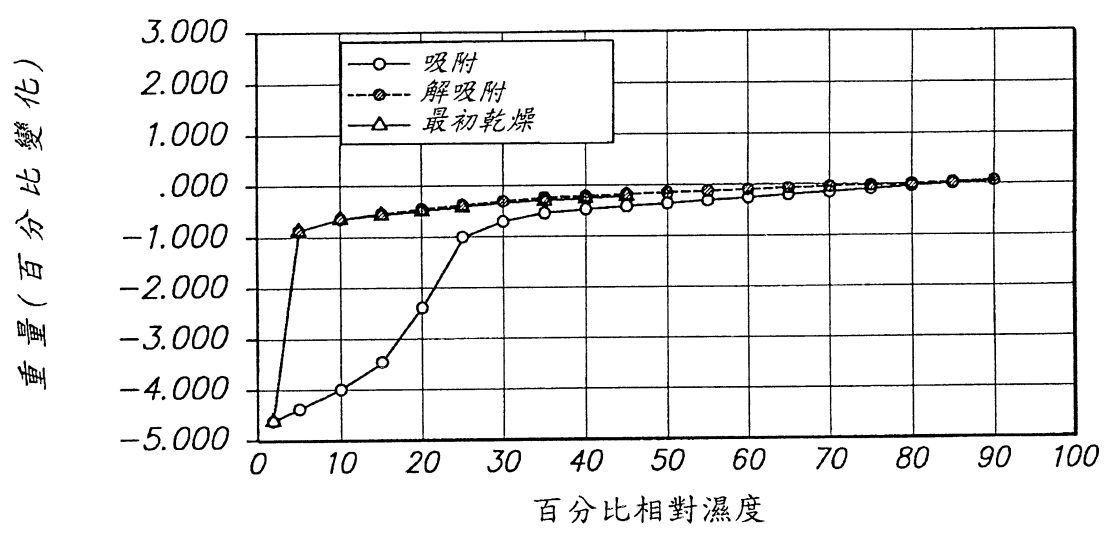


圖11

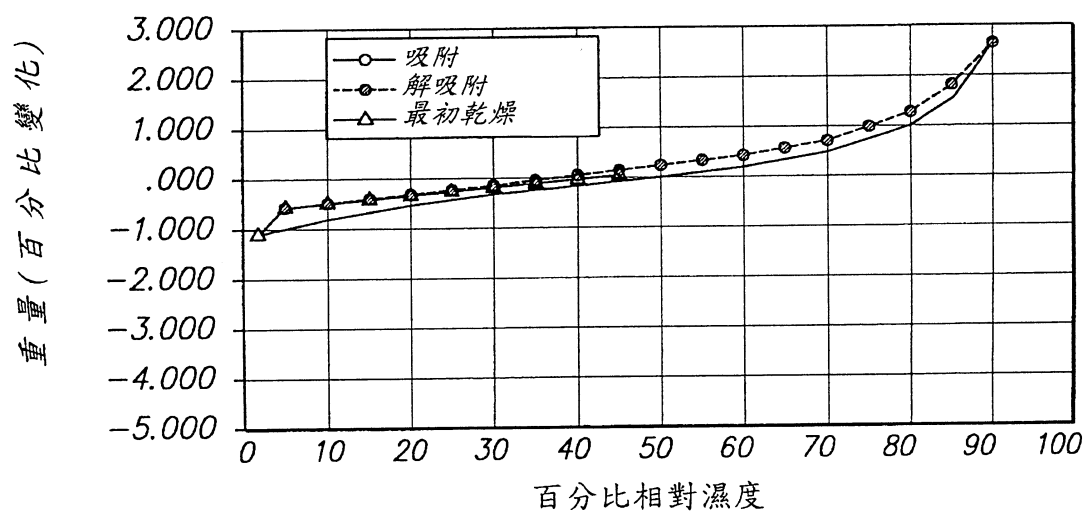


圖12

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

