



(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 201718582 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105133608

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl.：

C07D471/04 (2006.01)

A61K31/4439 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/02 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/19

英國

1518456.7

(71)申請人：葛萊伯格有限公司 (比利時) GALAPAGOS NV (BE)

比利時

(72)發明人：布萊斯 瑞吉納德 克里斯多夫 薩維爾 BRYN, REGINALD CHRISTOPHE

XAVIER (BE)；道央 朱利安 喬治斯 皮亞爾－奧利維亞 DOYON, JULIEN

GEORGES PIERRE-OLIVIER (FR)；傑納 拉斐爾 珍 喬耶爾 GENEY,

RAPHAEL JEAN JOEL (FR)；強庫爾 艾內 瑪莉 JONCOUR, AGNES MARIE

(FR)；拉貝吉葉赫 菲迪克 吉爾柏 LABEGUERE, FREDERIC GILBERT (FR)；

樂法蘭斯 金－麥可 LEFRANCOIS, JEAN-MICHEL (FR)；瑪摩利堤 奧斯卡

MAMMOLITI, OSCAR (IT)；米那 克里斯托 奇尼 馬瑞 MENET, CHRISTEL

JEANNE MARIE (FR)；舒密特 班奴瓦 安圖瓦內 SCHMITT, BENOIT ANTOINE

(FR)；凡 德 普拉斯 史蒂芬 艾蜜勒 VAN DER PLAS, STEVEN EMIEL (BE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 138 頁

(54)名稱

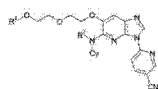
用於發炎、自體免疫及/或增生性疾病之治療之新穎化合物及其醫藥組合物

NOVEL COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF FOR THE

TREATMENT OF INFLAMMATORY, AUTOIMMUNE AND/OR PROLIFERATIVE DISEASES

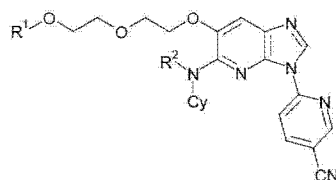
(57)摘要

本發明揭示式 I 化合物：



I 其中 R^1 、 R^2 及 Cy 係如本文所定義。本發明係關於抑制 IRAK 家族激酶之化合物、該等化合物產生之方法、包含該等化合物之醫藥組合物及使用該等化合物治療之方法，其藉由投與本發明化合物來預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。

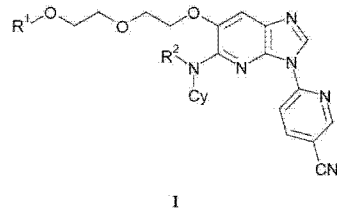
The present invention discloses compounds according to Formula I:



I

wherein R^1 , R^2 , and Cy are as defined herein. The present invention relates to compounds inhibiting IRAK family kinases, methods for their production, pharmaceutical compositions comprising the same, and methods of treatment using the same, for the prophylaxis and/or treatment of inflammatory diseases, autoimmune diseases and/or proliferative diseases by administering the compound of the invention.

特徵化學式：





201718582

【發明摘要】

申請日: 105/10/18

IPC分類: **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

【中文發明名稱】

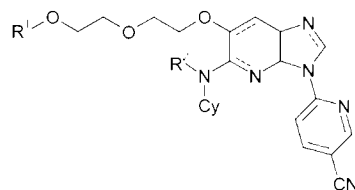
用於發炎、自體免疫及/或增生性疾病之治療之新穎化合物及其醫藥組合物

【英文發明名稱】

NOVEL COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY, AUTOIMMUNE AND/OR PROLIFERATIVE DISEASES

【中文】

本發明揭示式I化合物：



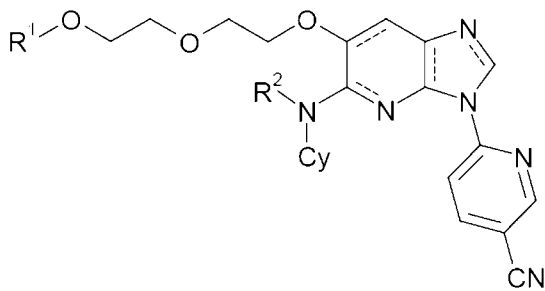
I

其中R¹、R²及Cy係如本文所定義。

本發明係關於抑制IRAK家族激酶之化合物、該等化合物產生之方法、包含該等化合物之醫藥組合物及使用該等化合物治療之方法，其藉由投與本發明化合物來預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。

【英文】

The present invention discloses compounds according to Formula I:



I

wherein R¹, R², and Cy are as defined herein.

The present invention relates to compounds inhibiting IRAK family kinases, methods for their production, pharmaceutical compositions comprising the same, and methods of treatment using the same, for the prophylaxis and/or treatment of inflammatory diseases, autoimmune diseases and/or proliferative diseases by administering the compound of the invention.

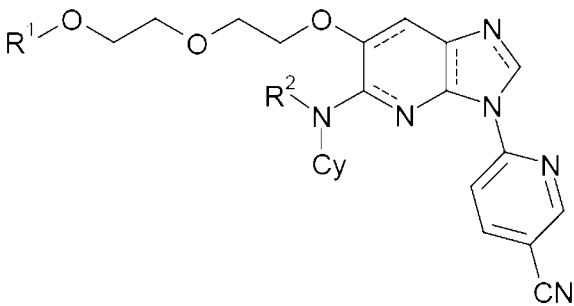
【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



I

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於發炎、自體免疫及/或增生性疾病之治療之新穎化合物及其醫藥組合物

【英文發明名稱】

NOVEL COMPOUNDS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY, AUTOIMMUNE AND/OR PROLIFERATIVE DISEASES

【技術領域】

本發明係關於可用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之化合物。具體而言，本發明化合物可抑制介白素-1受體相關性激酶(IRAK)，參與發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之激酶之家族，且更具體而言IRAK-4。本發明亦提供產生本發明化合物之方法、包含本發明化合物之醫藥組合物、藉由投與本發明化合物預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之方法。

【先前技術】

激酶參與細胞生理學之許多基本過程，例如蛋白質磷酸化。具體而言，蛋白質及脂質激酶參與細胞之活化、生長、分化及存活。蛋白質激酶可分為優先磷酸化酪胺酸殘基之彼等及優先磷酸化絲胺酸及/或蘇胺酸殘基之彼等。

多年來，激酶已發展成為消炎藥研發之極重要靶標(Cohen 2009)。具體而言，IRAK激酶且更具體而言IRAK-4已經鑒定為在發炎及自體免疫疾病中起作用(Ringwood及Li 2008；Wang等人2009)。

IRAK在許多細胞類型中表現且介導來自各種細胞受體(包括介白素-1 (IL-1)及類鐸受體(TLR))之信號。在IRAK家族中,已鑒定4個成員,即IRAK 1至4 (Wang等人2009),且IRAK-4(該家族之最新成員)代表有吸引力之治療靶標(Li等人2002)。實際上,據信IRAK-4為在IL-1受體及TLR (除TLR3以外)之早期下游活化之關鍵蛋白質激酶,其經由IRAK-1及IRAK-2之快速活化起始信號傳導,引起先天免疫反應。而且,其他介白素(例如IL-18及IL-33)依賴於IRAK-4用於信號傳導。因此,該等細胞介素參與致病過程之疾病(例如,纖維化(Li等人2014; McHedlidze等人2013; Rankin等人2010)及異位性皮炎(Salimi等人2013))係藉由IRAK-4抑制劑治療之潛在靶標疾病。

在表現無活性IRAK-4突變體而非野生型之小鼠中,觀察到由若干TLR激動劑觸發之完全耐敗血性休克性以及對IL-1之受損反應。此外,表現無活性IRAK-4突變體而非野生型之小鼠在若干自體免疫疾病模型(例如類風濕性關節炎(Koziczak-Holbro等人2009)及多發性硬化症(Staschke等人2009))中部分地受到保護。有趣地,類風濕性關節炎及全身性紅斑狼瘡患者之血清已顯示以IRAK-4依賴性方式活化漿細胞樣樹突細胞(Chiang等人2011)。最後,已在罹患導致IRAK-4無活性之遺傳缺陷之兒童中觀察到反覆化膿性細菌感染。由於在攜載去活化IRAK-4突變之成人中未觀察到該等化膿性感染,故IRAK-4信號傳導系統對於成人先天免疫性之某些態樣似乎係冗餘的。

先天免疫系統之信號傳導組份之失調亦越來越被認為係癌症起始及進展中的重要因素(Rhyasen及Starczynowski 2015)。實際上,有證據證明IL-1在腫瘤細胞生長、血管生成、侵襲、耐藥性及轉移中起直接作用(Carmi

等人2013；Vidal-Vanaclocha等人 2000)。另外，TLR參與眾多促腫瘤反應，此端視腫瘤細胞背景而定。作為IL-1受體及TLR信號傳導之必需介質，IRAK家族激酶代表有前景的癌症藥物靶標。另外，已顯示若干癌症類型依賴於MYD88之活化形式，其係TLR及IL-1R下游之承接分子，其活化IRAK-4。已在(例如)瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)(Ngo等人2011)及瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia) (Treon等人2012)中鑑別活化MYD88突變。另一報導支持IRAK-4在腫瘤學領域、具體而言T細胞急性淋巴母細胞白血病(T-ALL)中之作用(Li等人 2015)。已顯示IRAK-4之藥理學抑制可增強T-ALL對化學治療劑之敏感性。

已顯示IL-33在纖維變性及過敏疾病、具體而言氣喘及異位性皮炎之發展中起作用(Nabe 2014)。由於此細胞介素藉助IRAK-4依賴性路徑進行信號傳導(Kroeger等人2009)，故該等疾病亦可代表IRAK-4抑制劑之靶標。

最後，已顯示若干自體發炎疾病依賴於IL-1活性，且因此，IL-1阻斷生物製劑顯示對該等患者之一些益處。痛風、幼年型特發性關節炎、馬-韋二氏疾病、家族性地中海熱、貝西氏疾病(Behçet's disease)、成人斯蒂爾病(adult onset Still's disease)係該等自體發炎疾病之實例(Dinarello等人2012)。

用小分子抑制細胞介素信號傳導可有助於減輕免疫-發炎疾病之疾病結果(Sundberg等人2014)。具體而言，細胞介素可在生物體防禦病原體及感染中起作用。然而，當研發免疫-發炎疾病之新療法時，一方面至關重要的是選擇可在不損害適當及/或先天免疫反應之情況下被抑制之路徑中所涉及之靶標，乃因同時抑制多個細胞介素反應路徑可過度削弱免疫系統。然而，難以達成藥物對激酶之選擇性(Bain等人2003；Fabian等人2005)，

但其係高度合意的以便避免脫靶相關之副作用，特別是在長期治療之背景下(Broekman等人2011；Dy及Adjei 2013；Force及Kolaja 2011)。

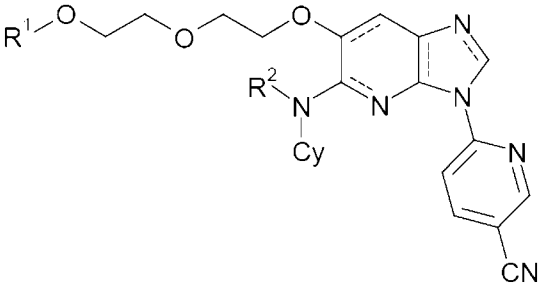
具體而言，最近顯示伴隨使用IL-1阻斷劑(阿那白滯素(Anakinra))及TNF α 阻斷劑(依那西普(Etanercept))導致嗜中性白血球減少症及感染之風險有所增加。(Genovese等人，2003，EMA public statement EMA/31631/02, 2003年2月5日)。此發現強調選擇性在研發新穎醫藥時係關鍵要素，且因此，可合意地研發能夠選擇性地調節信號傳導路徑而不影響其他路徑之化合物，具體而言能夠選擇性地調節IL-1反應而不影響TNF α 信號傳導路徑之化合物。

目前療法並不令人滿意，且因此需要鑑別可用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病且具有降低之脫靶相關性副作用之其他化合物。

【發明內容】

本發明係基於新穎化合物之鑑別，及其在預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病中之用途。具體而言，本發明化合物可為IRAK抑制劑，且更具體而言IRAK-4抑制劑。本發明亦提供產生該等化合物之方法、包含該等化合物之醫藥組合物、及藉由投與本發明化合物預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之方法。

因此，在本發明之第一態樣中，提供具有式(I)之本發明化合物：



I

其中

Cy係

- 單環C₃₋₇環烷基，其視情況經一或多個獨立地選擇之R³取代，或
- 4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原

子且視情況經一或多個獨立地選擇之R³取代；

R¹係

- H，
- -SO₃H，
- -P(=O)(OH)₂，
- C₁₋₄烷基，
- -C(=O)-(包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子之4至7員單環

雜環烷基)，或

- -C(=O)C₁₋₆烷基，該C₁₋₆烷基視情況經一或多個獨立地選擇之R⁴基

團取代；

R²係H或C₁₋₄烷基；

每一R³獨立地選自：

- OH，
- =O，
- 鹵基，及
- C₁₋₄烷基；

每一R⁴獨立地選自：

- -NR^{5a}R^{5b}，
- -C(=O)OH，

- 4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一或多個獨立地選擇之C₁₋₄烷基取代，及

- -NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂；且

R^{5a}及R^{5b}獨立地係H或C₁₋₄烷基。

在一個態樣中，提供本發明化合物用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。在具體態樣中，本發明化合物可抑制IRAK激酶家族成員，且更具體而言IRAK-4。在另一具體態樣中，與密切相關之類似物相比，本發明化合物可顯示針對IRAK家族激酶且更具體而言IRAK-4有所改良之選擇性，由此使得脫靶相關之毒性有所降低。在另一態樣中，本發明化合物可展現良好代謝穩定性，此可改良口服生物利用度。

在再一態樣中，本發明化合物可顯示針對IRAK-4之選擇性，此可改良安全性並降低脫靶相關之副作用。在具體態樣中，本發明化合物可為IL-1之選擇性抑制劑。

在另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含本發明化合物及醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑。在具體態樣中，醫藥組合物可另外包含適宜與本發明化合物組合使用之其他治療活性成份。在更具體態樣中，該其他治療活性成份係用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之藥劑。

另外，可用於本文所揭示之醫藥組合物及治療方法中之本發明化合物在製備及使用時係醫藥上可接受的。

在本發明之另一態樣中，本發明提供治療患有尤其選自本文所揭示之彼等且具體而言發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之病況之哺乳動物、具體而言人類的方法，該方法包含投與有效量之如本文所闡述之本發

明醫藥組合物或化合物。

本發明亦提供包含本發明化合物及適宜醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑之醫藥組合物，其用於醫藥中。在具體態樣中，醫藥組合物用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。

在其他態樣中，本發明提供合成本發明化合物之方法，且代表性合成方案及路徑稍後揭示於本文中。

藉由考慮隨後之詳細說明，熟習此項技術者將明瞭其他目的及優點。

應瞭解，本發明化合物可經代謝以產生生物活性代謝物。

【實施方式】

定義

以下術語意欲具有下文所闡述關於其之含義且可用於理解本發明之說明及預期範圍。

當闡述本發明(其可包括化合物、含有該等化合物之醫藥組合物及使用該等化合物及組合物之方法)時，除非另有指示，否則以下術語(若存在)具有以下含義。亦應理解，當在本文中闡述時，任何下文所定義之部分可經各種取代基取代，且各別定義意欲將該等經取代部分包括於其下述範圍內。除非另有說明，否則術語「經取代」應如下文所闡述來定義。應進一步理解，在本文中使用時認為術語「基團(group)」及「基團(radical)」可互換。

本文可使用之冠詞「一(a及an)」係指一個或一個以上(亦即至少一個)的該冠詞之文法受詞。舉例而言，「類似物」意指一種類似物或一種以上類似物。

「烷基」意指具有指定數目之碳原子之直鏈或具支鏈脂肪族烴。具體

烷基具有1至6個碳原子或1至4個碳原子。具支鏈意指一或多個烷基(例如甲基、乙基或丙基)附接至直鏈烷基鏈。具體烷基係甲基($-\text{CH}_3$)、乙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、正丙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、異丙基($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、正丁基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、第三丁基($-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、第二丁基($-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、正戊基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、正己基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)及1,2-二甲基丁基($-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)。具體烷基具有介於1個與4個之間之碳原子。

「烷氧基」係指基團O-烷基，其中該烷基具有指定數目之碳原子。具體而言，該術語係指基團-O- C_{1-6} 烷基。具體烷氧基係甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第三丁氧基、第二丁氧基、正戊氧基、正己氧基及1,2-二甲基丁氧基。具體烷氧基係低碳數烷氧基，即具有介於1個與6個之間之碳原子。其他具體烷氧基具有介於1個與4個之間之碳原子。

「烯基」係指具有指定數目碳原子之單價烯系(不飽和)烴基團。具體烯基具有2至8個碳原子，且更具體而言，2至6個碳原子，其可為直鏈或具支鏈且具有至少1個且具體而言1至2個烯系不飽和位點。具體烯基包括乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、正丙烯基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、異丙烯基($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$)及諸如此類。

「胺基」係指基團 $-\text{NH}_2$ 。

「芳基」係指藉由自母體芳香族環系統之單一碳原子去除一個氫原子衍生之單價芳香族烴基團。具體而言，芳基係指具有指定數目之還原子之芳香族環結構(單環或多環)。特定而言，該術語包括包含6至10個環成員之基團。倘若芳基係單環系統，則其優先含有6個碳原子。具體而言，芳基包

括苯基及萘基。

「環烷基」係指具有指定數目之還原子之非芳香族烴基環結構(單環、稠合多環、橋接多環或螺環)。環烷基可具有3至12個碳原子，具體而言3至10個，且更具體而言3至7個碳原子。該環烷基包括(例如)單一環結構，例如環丙基、環丁基、環戊基、環己基及環庚基。

「氰基」係指基團-CN。

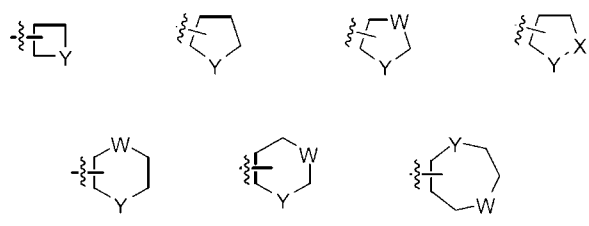
「鹵基」或「鹵素」係指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)及碘(I)。具體鹵基係氟或氯。

「雜」在用於闡述化合物或存於化合物上之基團時意指該化合物或基團中之一或多個碳原子已由氮、氧或硫雜原子替代。雜可應用於上文所闡述烴基中之任一者，例如具有1至4個且具體而言1個、2個或3個雜原子、更通常一或兩個雜原子(例如單一雜原子)之烷基(例如，雜烷基)、環烷基(例如，雜環烷基)、芳基(例如，雜芳基)及諸如此類。

「雜環烷基」意指包括一或多個獨立地選自O、N及S之雜原子及指定數目之環原子之非芳香族完全飽和環結構(單環、稠合多環、螺環或橋接多環)。雜環烷基環結構可具有4至12個環成員，具體而言4至10個環成員且更具體而言4至7個環成員。每一環可含有至多四個通常選自氮、硫及氧之雜原子。通常，雜環烷基環將含有至多4個雜原子、更通常至多3個雜原子、更通常至多2個、例如單一雜原子。雜環之實例包括(但不限於)氮雜環丁基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、吡咯啉基(例如，1-吡咯啉基、2-吡咯啉基及3-吡咯啉基)、四氫呋喃基(例如，1-四氫呋喃基、2-四氫呋喃基及3-四氫呋喃基)、四氫噻吩基(例如，1-四氫噻吩基、2-四氫噻吩基及3-四氫噻吩基)、六氫吡啶基(例如，1-六氫吡啶基、2-六氫吡啶基、3-六氫吡啶基及4-

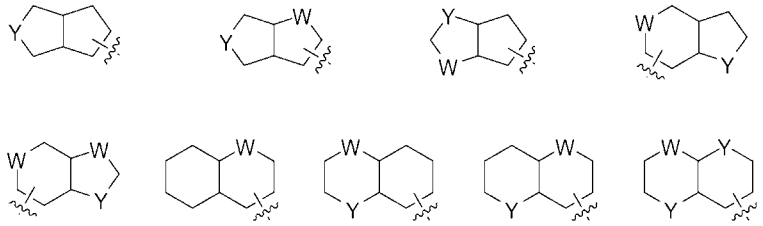
六氫吡啶基)、四氫吡喃基(例如, 4-四氫吡喃基)、四氫硫吡喃基(例如, 4-四氫硫吡喃基)、嗎啉基、硫嗎啉基、二噁烷基或六氫吡嗪基。

以下闡釋性實例中顯示單環之具體實例：



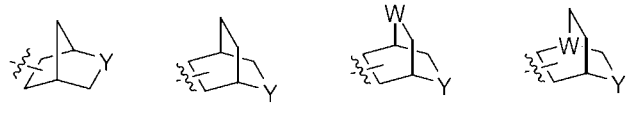
其中每一W及Y獨立地選自-CH₂-、-NH-、-O-及-S-。

以下闡釋性實例中顯示稠合雙環之具體實例：



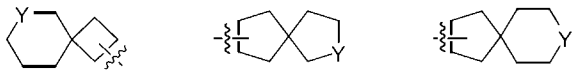
其中每一W及Y獨立地選自-CH₂-、-NH-、-O-及-S-。

以下闡釋性實例中顯示橋接雙環之具體實例：



其中每一W及Y獨立地選自-CH₂-、-NH-、-O-及-S-。

以下闡釋性實例中顯示螺環之具體實例：



其中每一Y係選自-CH₂-、-NH-、-O-及-S-。

「羥基」係指基團-OH。

「側氧基」係指基團=O。

「經取代」係指其中一或多個氫原子各自獨立地經相同或不同取代基替代之基團。

「磺基」或「磺酸」係指諸如-SO₃H等基團。

如本文所用術語「經一或多個取代」係指一至四個取代基。在一個實施例中，其係指一至三個取代基。在其他實施例中，其係指一或兩個取代基。在又一實施例中，其係指一個取代基。

熟習有機合成技術者應認識到，化學上可行之穩定雜環(不論其係芳族抑或非芳族)中之雜原子之最大數目係由環之大小、不飽和度及雜原子之價決定。一般而言，雜環可具有一至四個雜原子，只要雜芳香族環在化學上可行且穩定即可。

「醫藥上可接受」意指已獲得聯邦或州政府管理機構或除美國外之國家的相應機構批准或可獲得批准或已列示於美國藥典(US Pharmacopeia)或其他公認藥典中用於動物(且更具體而言用於人類)中。

「醫藥上可接受之鹽」係指醫藥上可接受且具有母體化合物之期望藥理活性之本發明化合物的鹽。具體而言，該等無毒性鹽可為無機或有機酸加成鹽及鹼加成鹽。特定而言，該等鹽包括：(1)酸加成鹽，由無機酸形成，該等無機酸係(例如)鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及諸如此類；或由有機酸形成，該等有機酸係(例如)乙酸、丙酸、己酸、環戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、蘋果酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、3-(4-羥基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、苯乙醇酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羥基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟腦磺酸、4-甲基雙環[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸，葡萄糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、第三丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、麩胺酸、羥基萘甲酸、水楊酸、硬脂酸、黏康酸(muconic acid)及諸如此類；或(2)當存在於母體化合物中之酸性質子由金屬離子(例如，鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)替代時或與有機鹼(例如乙醇胺、二乙醇胺、

三乙醇胺、N-甲基葡萄糖胺及諸如此類)配位時形成之鹽。鹽進一步包括(僅例如)鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽、銨鹽、四烷基銨鹽及諸如此類；且當化合物含有鹼性官能基時，為無毒性有機或無機酸之鹽，例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、酒石酸鹽、甲磺酸鹽、乙酸鹽、馬來酸鹽、草酸鹽及諸如此類。術語「醫藥上可接受之陽離子」係指酸性官能基之可接受之陽離子抗衡離子。該等陽離子例示為鈉、鉀、鈣、鎂、銨、四烷基銨陽離子及諸如此類。

「醫藥上可接受之媒劑」係指與本發明化合物一起投與之稀釋劑、佐劑、賦形劑或載劑。

「前藥」係指具有可裂解基團且可藉由溶劑分解或在生理學條件下變為在活體內具有醫藥活性之本發明化合物的化合物，包括本發明化合物之衍生物。該等實例包括(但不限於)膽鹼酯衍生物及諸如此類、N-烷基嗎啉酯及諸如此類。

「溶劑合物」係指通常藉由溶劑分解反應與溶劑締合之化合物形式。此物理締合包括氫鍵結。習用溶劑包括水、乙醇、乙酸及諸如此類。本發明化合物可以(例如)結晶形式製備且可發生溶合或水合。適宜溶劑合物包括醫藥上可接受之溶劑合物(例如水合物)，且進一步包括化學計量溶劑合物及非化學計量溶劑合物二者。在某些情形中，例如，在一或多種溶劑分子納入結晶固體之晶格中時，溶劑合物能夠分離。「溶劑合物」涵蓋溶液相及可分離溶劑合物二者。代表性溶劑合物包括水合物、乙醇合物及甲醇合物。

「個體」包括人類。術語「人類」、「患者」及「個體」在本文中可互換使用。

「治療有效量」意指本發明化合物在投與個體以治療疾病時足以實現

該疾病治療之量。「治療有效量」可端視該化合物、疾病及其嚴重程度以及欲治療個體之年齡、體重等而變化。

「預防(preventing或prevention)」係指降低患上或發生疾病或病症之風險(即在疾病發作前使得在可能暴露於致病劑或易感染該疾病之個體中不發生該疾病之至少一種臨床症狀)。

術語「預防(prophylaxis)」係指「預防(prevention)」，且係指目的為預防而非治療或治癒疾病之措施或程序。預防性措施之非限制性實例可包括投與疫苗；向由於(例如)缺少運動而具有血栓形成風險之住院患者投與低分子量肝素；及在逗留瘧疾係地方病或感染瘧疾之風險較高之地理區域時提前投與抗瘧疾劑(例如氯喹(chloroquine))。

在一實施例中，任一疾病或病症之「治療(treating或treatment)」係指改善該疾病或病症(亦即，阻止該疾病或減緩其至少一種臨床症狀之表現、程度或嚴重性)。在另一實施例中，「治療」係指改善個體不能感受到之至少一個身體參數。在又一實施例中，「治療」係指在物理方面調節疾病或病症(例如穩定可感受到之症狀)或在生理學方面調節疾病或病症(例如穩定物理參數)或二者兼有。在另一實施例中，「治療」係指減緩疾病之進展。

如本文所使用，術語「過敏疾病」係指特徵在於免疫系統之高敏病症之病況之群，包括過敏性氣道疾病(例如氣喘、鼻炎)、異位性皮炎、鼻竇炎、濕疹及蕁麻疹以及食物過敏或昆蟲毒液過敏。

如本文所用術語「氣喘」係指特徵在於與無論何種原因(內源性、外源性或二者；過敏或非過敏)之氣道收縮相關之肺氣流變化之任一肺病症。術語氣喘可與一或多個用以指示原因之形容詞一起使用。

如本文所用術語「發炎疾病」係指包括以下之病況之群：類風濕性關

節炎、骨關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、過敏性氣道疾病(例如，氣喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、發炎性腸病(IBM，例如，克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎)、腸易激症候群、內毒素引發之疾病狀態(例如，繞道手術後併發症或促成(例如)慢性心臟衰竭之慢性內毒素狀態)、成人斯蒂爾病、馬-韋二氏症候群、家族性寒冷性自體發炎症候群(FCAS)、貝西氏疾病、家族性地中海熱(familial Mediterranean fever)、痛風、新生兒多系統發炎性疾病(NOMID)、施尼茨勒症候群(Schnitzler syndrome)及涉及軟骨之相關疾病(例如關節之相關疾病)。具體而言，該術語係指類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如，氣喘)、慢性阻塞性肺病(COPD)及發炎性腸病。更具體而言，該術語係指類風濕性關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、慢性阻塞性肺病(COPD)及發炎性腸病。

如本文所用術語「自體免疫疾病」係指包括以下之疾病之群：阻塞性氣道疾病(包括以下病況：例如COPD、氣喘(例如，內源性氣喘、外源性氣喘、粉塵性氣喘、小兒氣喘)、特別地慢性或頑固性氣喘(例如，遲發性氣喘及氣道高反應性)、支氣管炎(包括支氣管性氣喘))、全身性紅斑狼瘡(SLE)、皮膚紅斑狼瘡、狼瘡性腎炎、皮肌炎、薛格連氏症候群(Sjögren's syndrome)、多發性硬化、牛皮癬、乾眼病、I型糖尿病及其相關性併發症、異位性濕疹(異位性皮炎)、甲狀腺炎(橋本氏(Hashimoto's)及自體免疫甲狀腺炎)、接觸性皮炎及其他濕疹性皮炎、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、動脈粥樣硬化及肌肉萎縮性脊髓側鎖硬化。具體而言，該術語係指COPD、氣喘、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病及發炎性腸病。

如本文所用術語「纖維化」係指全身性硬化症、特發性肺纖維化及其

他形式之肺纖維化及間質性肺疾病、酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、腎纖維化及由發炎性腸病引起之結腸纖維化。

如本文所用術語「增生性疾病」係指以下病況：例如癌症(例如，子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性病征(例如，真性紅細胞增多症、原發性血小板增多症及骨髓纖維化)、白血病(例如，急性骨髓樣白血病、急性及慢性淋巴母細胞性白血病)、多發性骨髓瘤、牛皮癬、再狹窄症、硬皮病或纖維化。具體而言，該術語係指癌症、白血病、多發性骨髓瘤及牛皮癬。

如本文所使用，術語「癌症」係指皮膚或身體器官(例如(但不限於)乳房、前列腺、肺、腎、胰臟、胃或腸)中細胞之惡性或良性贅生物。癌症易於浸潤至毗鄰組織中並擴散(轉移)至遠端器官，例如骨、肝臟、肺或腦。如本文所使用，術語癌症包括轉移性腫瘤細胞類型(例如(但不限於)黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及肥胖細胞瘤)及組織癌瘤類型(例如(但不限於)結腸直腸癌、前列腺癌、小細胞肺癌及非小細胞肺癌、乳癌、胰臟癌、膀胱癌、腎癌、胃癌、膠質母細胞瘤、原發性肝癌、卵巢癌、前列腺癌及子宮平滑肌肉瘤)二者。具體而言，術語「癌症」係指急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓樣白血病、腎上腺皮質癌、肛門癌、闌尾癌、星形細胞瘤、非典型畸胎樣/橫紋肌樣腫瘤、基底細胞癌、膽管癌、膀胱癌、骨癌(骨肉瘤及惡性纖維性組織細胞瘤)、腦幹神經膠質瘤、腦瘤、腦及脊髓瘤、乳癌、支氣管瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、宮頸癌、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓性白血病、結腸癌、結腸直腸癌、顱咽管瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、胚胎瘤、子宮內膜癌、室管膜母細胞瘤、室管膜瘤、食道癌、尤因氏肉瘤家族之腫瘤(Ewing sarcoma family of tumor)、眼癌、

視網膜母細胞瘤、膽囊癌、胃(gastric, stomach)癌、胃腸道類癌腫瘤、胃腸道基質瘤(GIST)、胃腸道基質細胞瘤、生殖細胞瘤、神經膠質瘤、毛細胞白血病、頭頸癌、肝細胞(肝)癌、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下嚥癌、眼內黑色素瘤、胰島細胞瘤(內分泌胰腺)、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、腎癌、蘭格漢氏細胞組織細胞增多症、喉頭癌、白血病、急性淋巴母細胞白血病、急性骨髓樣白血病、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓性白血病、毛細胞白血病、肝癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、伯基特淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、淋巴瘤、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症、髓母細胞瘤、髓質上皮瘤、黑色素瘤、間皮瘤、口腔癌、慢性骨髓性白血病、骨髓樣白血病、多發性骨髓瘤、鼻咽癌、神經母細胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、非小細胞肺癌，口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、骨惡性纖維性組織細胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖細胞瘤、卵巢低度惡性潛能腫瘤、胰臟癌、乳頭狀瘤病、副甲狀腺癌、陰莖癌、咽癌、中間分化之松果體實質瘤、松果體母細胞瘤及幕上原始神經外胚層腫瘤、垂體腫瘤、漿細胞贅瘤/多發性骨髓瘤、胸膜肺母細胞瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤、前列腺癌、直腸癌、腎細胞(腎)癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、尤因氏肉瘤家族之腫瘤、卡波西氏肉瘤、塞紮裡氏症候群(Sézary syndrome)、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、幕上原始神經外胚層腫瘤、T細胞淋巴瘤、睪丸癌、喉癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉瘤、陰道癌、陰門癌、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症及威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)。

如本文所使用，術語「白血病」係指血液及血液形成器官之腫瘤病。

該等疾病可造成骨髓及免疫系統功能障礙，此致使宿主極易受感染及出血之影響。具體而言，該術語白血病係指急性骨髓樣白血病(AML)及急性淋巴母細胞性白血病(ALL)及慢性淋巴母細胞性白血病(CLL)。

「本發明化合物」及等效表達意欲涵蓋如本文所闡述之式(e)化合物，若上下文允許，則該表達包括醫藥上可接受之鹽及溶劑合物(例如水合物)及醫藥上可接受鹽之溶劑合物。類似地，對中間體之提及，不管是否主張該等中間體本身，若上下文允許，則意欲涵蓋該等中間體之鹽及溶劑合物。

當在本文中提及範圍(例如(但不限於) C_{1-8} 烷基)時，所引用範圍應視為該範圍每一成員之表示。

本發明化合物之其他衍生物之酸及酸衍生物形式具有活性，但其酸敏感形式通常在哺乳動物生物體內提供溶解性、組織相容性或延遲釋放之優點(Bundgaard 1985)。前藥包括業內從業者熟知之酸衍生物，例如藉由使母體酸與適宜醇反應製備之酯，或藉由使母體酸化合物與經取代或未經取代之胺反應製備之醯胺，或酸酐或混合酐。衍生自懸掛於本發明化合物上之酸性基團之簡單脂肪族或芳族酯、醯胺及酐係特別有用之前藥。在一些情形下，期望製備雙酯型前藥，例如(醯氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯。具體而言，該等前藥係本發明化合物之 C_{1-8} 烷基、 C_{2-8} 烯基、 C_{6-10} 視情況經取代之芳基及(C_{6-10} 芳基)-(C_{1-4} 烷基)酯。

如本文所使用，術語「同位素變體」係指於構成化合物之一或多個原子處以非天然比例含有同位素之該化合物。舉例而言，化合物之「同位素變體」可含有一或多個非放射性同位素，例如氘(2H 或D)、碳-13(^{13}C)、氮-15(^{15}N)或諸如此類。應理解，在進行該同位素取代之化合物中，以下原子(若存在)可變化以使(例如)任一氫可為 $^2H/D$ ，任一碳可為 ^{13}C ，或任一氮

可為 ^{15}N ，且該等原子之存在及替換可由熟習此項技術者決定。同樣，在(例如)所得化合物可用於藥物及/或基質組織分佈研究之情形下，本發明可包括製備具有放射性同位素之同位素變體。放射性同位素氚(即 ^3H)及碳-14(即 ^{14}C)因易於納入且容易檢測而尤其可用於此目的。另外，可製備經正電子發射同位素(例如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及 ^{13}N)取代之化合物且該等化合物可在正電子發射斷層掃描(PET)研究中用來檢查基質受體佔據情況。

亦應理解，具有相同分子式但其原子之鍵結的性質或順序不同或其原子空間排列不同之化合物稱為「異構物」。原子空間排列不同之異構物稱為「立體異構物」。

彼此非鏡像之立體異構物稱為「非鏡像異構物」，且彼等彼此為不可重疊鏡像者稱為「鏡像異構物」。當化合物具有不對稱中心(例如其與4個不同基團鍵結)時，可能存在一對鏡像異構物。鏡像異構物之特徵在於其不對稱中心之絕對構型且可藉由Cahn及Prelog之R-及S排序規則或藉由分子旋轉偏振光平面之方式來闡述並稱為右旋或左旋(亦即，分別稱為(+)或(-)-異構物)。對掌性化合物可以個別鏡像異構物或其混合物之形式存在。含有相同比例之鏡像異構物之混合物稱為「外消旋混合物」。

「互變異構物」係指具有特定化合物結構之可相互轉換形式且在氫原子及電子置換方面有所不同之化合物。因此，兩種結構可經由 π 電子及原子(通常為H)移動達到平衡。例如，烯醇及酮係互變異構物，此乃因其可藉由用酸或鹼處理快速地發生互變。互變異構現象之另一實例係苯基硝基甲烷之酸式及硝基形式，其同樣係藉由用酸或鹼處理形成。

互變異構形式可能與達成目標化合物之最佳化學反應性及生物活性相關。

本發明化合物可具有一或多個不對稱中心；因此，該等化合物可以個別(R)-或(S)-立體異構物或以其混合物產生。

除非另有指示，否則當本說明書及申請專利範圍中對具體化合物之闡述或命名意欲包括個別鏡像異構物及其混合物(外消旋或相反)二者。確定立體化學之方法及分離立體異構物之方法已為此項技術熟知。

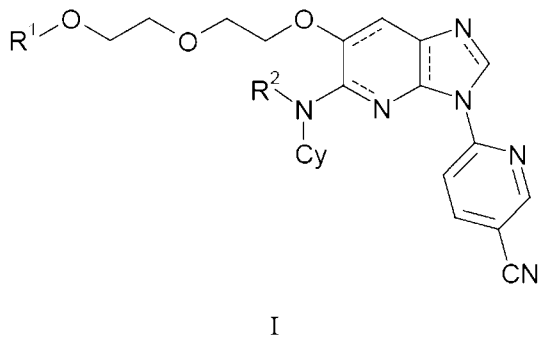
應瞭解，本發明化合物可經代謝以產生生物活性代謝物。

本發明

本發明係基於新穎化合物之鑑別，其在預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病中之用途。具體而言，該等化合物可抑制IRAK且更具體而言IRAK-4。

本發明亦提供產生該等化合物之方法、包含該等化合物之醫藥組合物，及藉由投與本發明化合物預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之方法。

因此，在本發明之第一態樣中，提供具有式(I)之本發明化合物：



其中

Cy係

- 單環C₃₋₇環烷基，其視情況經一個、兩個或三個獨立地選擇之R³取代，或
- 4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原

子且視情況經一個、兩個或三個獨立地選擇之 R^3 取代；

R^1 係

- H，
- $-\text{SO}_3\text{H}$ ，
- $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$ ，
- C_{1-4} 烷基，
- $-\text{C}(=\text{O})$ -(包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子之4至7員單環

雜環烷基)，或

- $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基視情況經一或多個獨立地選擇之 R^4 取

代；

R^2 係H或 C_{1-4} 烷基；

每一 R^3 獨立地選自：

- OH，
- $=\text{O}$ ，
- 鹵基，及
- C_{1-4} 烷基；

每一 R^4 獨立地選自：

- $-\text{NR}^{5a}\text{R}^{5b}$ ，
- $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ ，
- 4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一或多個獨立地選擇之 C_{1-4} 烷基取代，及

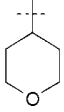
- $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{C}_{1-4}$ 烷基- NH_2 ；且

R^{5a} 及 R^{5b} 獨立地係H或 C_{1-4} 烷基。

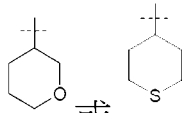
在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中Cy係單環C₃₋₇環烷基。在具體實施例中，Cy係環己基。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中Cy係經一個、兩個或三個獨立地選擇之R³取代之單環C₃₋₇環烷基。在具體實施例中，Cy係經一個、兩個或三個獨立地選擇之R³取代之環己基。在另一具體實施例中，Cy係經一或兩個R³取代之單環C₃₋₇環烷基。在更具體實施例中，Cy係經一或兩個獨立地選擇之R³取代之環己基。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中Cy係包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子之4至7員單環雜環烷基。在具體實施例中，Cy係四氫吡喃基或四氫硫吡喃基。在更具體實施例中，Cy係

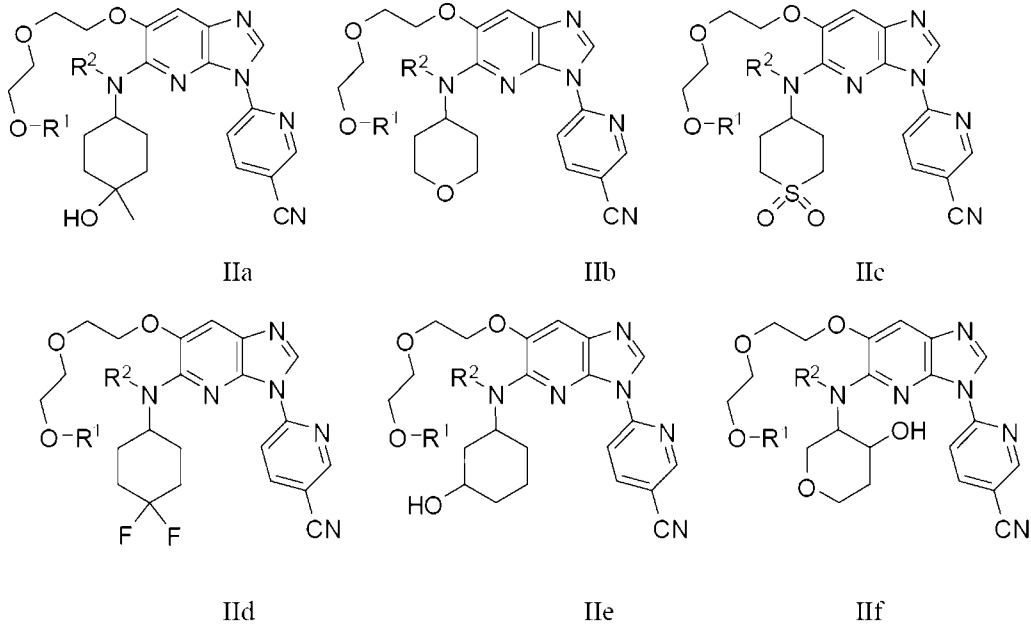


在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中Cy係單環4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子，其經一個、兩個或三個獨立地選擇之R³取代。在另一實施例中，Cy係四氫吡喃基或四氫硫吡喃基，其每一者經一個、兩個或三個獨立地選擇之R³取代。在具體實施例中，Cy係4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子，其經一或兩個R³取代。在另一具體實施例中，Cy係四氫吡喃基或四氫硫吡喃基，其每一者經一或兩個獨立地選擇之R³取代。在更具體實施例中，Cy係



在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中每一R³係選自OH、=O、鹵基及C₁₋₄烷基。在具體實施例中，每一R³係選自OH、=O、F、及-CH₃。在更具體實施例中，每一R³係選自OH及-CH₃。在另一更具體實施例中，每一R³係F。在再一更具體實施例中，每一R³係=O。

在一個實施例中，本發明化合物符合式IIa、IIb、IIc、IIe或IIf：



其中 R^1 及 R^2 係如本文所定義。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^1 係H、 $-SO_3H$ 或 $-P(=O)(OH)_2$ 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^1 係 C_{1-4} 烷基。在具體實施例中， R^1 係 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 或 $-CH(CH_3)_2$ 。在更具體實施例中， R^1 係 $-CH_3$ 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^1 係 $-C(=O)-$ (包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子之4至7員單環雜環烷基)。在具體實施例中， R^1 係 $-C(=O)-$ 吡咯啉基。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基。在具體實施例中， R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基係選自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$ 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基經一或多個獨立地選擇之 R^4 取代。在具體實施

例中， R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基係選自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$ ，其每一者經一或多個獨立地選擇之 R^4 取代。在另一具體實施例中， R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基經一或兩個獨立地選擇之 R^4 取代。在更具體實施例中， R^1 係 $-C(=O)C_{1-6}$ 烷基，該 C_{1-6} 烷基係選自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 或 $-CH_2(CH(CH_3)_2)$ ，其每一者經一或兩個獨立地選擇之 R^4 取代。

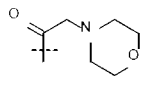
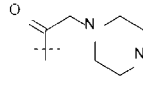
在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，且 R^4 係 $-NR^{5a}R^{5b}$ ，其中每一 R^{5a} 及 R^{5b} 獨立地係H或 C_{1-4} 烷基。在具體實施例中，每一 R^{5a} 及 R^{5b} 獨立地係H、 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在更具體實施例中， R^{5a} 係H，且 R^{5b} 係H、 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在最具體實施例中， R^4 係 $-NH_2$ 、 $-NHCH_3$ 或 $-N(CH_3)_2$ 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^4 係 $-C(=O)OH$ 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中 R^4 係4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一或多個獨立地選擇之 C_{1-4} 烷基取代。在具體實施例中， R^4 係嗎啉基、六氫吡啶基或六氫吡嗪基，其每一者視情況經一或多個獨立地選擇之 C_{1-4} 烷基取代。在另一具體實施例中， R^4 係4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一個 C_{1-4} 烷基取代。在更具體實施例中， R^4 係4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一個 $-CH_3$ 取代。在另一更具體實施例中， R^4 係嗎啉基、六氫吡啶基或六氫吡嗪基，其每一者視情況經一或多個 $-CH_3$ 取代。在最具體實施例中， R^4 係嗎啉基、六氫吡啶基或六氫吡嗪基，其每一者視

情況經一個-CH₃取代。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中R⁴係-NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂。在具體實施例中，R⁴係-NHC(=O)-CH₂-NH₂。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中R¹係
-C(=O)CH₂NH₂、-C(=O)CH₂NHCH₃、-C(=O)CH₂N(CH₃)₂、
-C(=O)CH₂CH₂N(CH₃)₂、-C(=O)CH(NH₂)CH(CH₃)₂、
-C(=O)CH₂CH₂C(=O)OH、-C(=O)CH(NH₂)CH₂C(=O)OH、
-C(=O)CH(NH₂)CH₂CH₂C(=O)OH、
-C(=O)CH(CH(CH₃)₂)NHC(=O)CH₂NH₂、
 或 。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中R²係H。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I-IIf中之任一者，其中R²係C₁₋₄烷基。在具體實施例中，R²係-CH₃。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中該化合物係選自：

6-[6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈，

6-{5-(1,1-二側氧基-四氫-2H-硫吡喃-4-基胺基)-6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈，

6-{6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基-環己基]-甲基-胺基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈，

6-{6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-[甲基-(四氫-吡喃-4-基)-胺基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈，

6-[6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈，

6-{5-(3-羥基-環己基胺基)-6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈，

6-{5-(4,4-二氟-環己基胺基)-6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈，

硫酸單-(2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基)酯，

(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯，

(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯草酸鹽，

6-[6-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]-5-[(順式-3,4)-4-羥基四氫吡喃-3-基]胺基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈，

6-[6-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]-5-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基環己基]胺基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈，

6-[5-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基環己基)-甲基-胺基]-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈，

6-[5-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基環己基)胺基]-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈，

2-(二甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

2-胺基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

2-(甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)

咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

(2S)-吡咯啉-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

(2S)-2-[(2-胺基乙醯基)胺基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

2-嗎啉基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

2-(4-甲基六氫吡嗪-1-基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

3-(二甲基胺基)丙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯，

2-(二甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

2-胺基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

2-(甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

(2S)-吡咯啉-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

(3S)-3-胺基-4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-側氧基-丁酸鹽酸鹽，

(4S)-4-胺基-5-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-5-側氧基-戊酸鹽酸鹽，

(2S)-2-[(2-胺基乙醯基)胺基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

2-嗎啉基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

2-(4-甲基六氫吡嗪-1-基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，

3-(二甲基胺基)丙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯草酸鹽，及

4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-側氧基-丁酸。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中該化合物係6-[6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中該化合物不為6-[6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中該化合物係(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

在一個實施例中，本發明化合物符合式I，其中該化合物不為(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

在一實施例中，本發明化合物不為同位素變體。

在一態樣中，任一本文所述實施例之本發明化合物係作為游離鹼存在。

在一態樣中，任一本文所闡述實施例之本發明化合物係醫藥上可接受之鹽。

在一態樣中，任一本文所闡述實施例之本發明化合物係該化合物之溶劑合物。

在一態樣中，任一本文所闡述實施例之本發明化合物係化合物之醫藥上可接受鹽之溶劑合物。

儘管上文已單獨大致列示每一實施例之指定基團，但本發明化合物包括其中上述式以及本文所呈現之其他式中之若干或每一實施例係選自針對每一變量分別指定之具體成員或基團中之一或多者的化合物。因此，本發明意欲包括在其範圍內之該等實施例之所有組合。

儘管上文已單獨大致列示每一實施例之指定基團，但本發明化合物可為一或多個變量(例如R基團)係選自任一上文所列示式之一或多個實施例者。因此，本發明意欲包括在其範圍內之任一所揭示實施例之變量之所有組合。

或者，本發明亦涵蓋自基團或實施例排除指定變量中之一或多者或其組合。

在某些態樣中，本發明提供上述式之化合物之前藥及衍生物。前藥係本發明化合物之衍生物，其具有代謝可裂解基團且藉由溶劑分解或在生理條件下變為在活體內具有醫藥活性之本發明化合物。該等實例包括(但不限於)膽鹼酯衍生物及諸如此類、N-烷基嗎啉酯及諸如此類。

本發明化合物之其他衍生物之酸及酸衍生物形式具有活性，但酸敏感形式通常在哺乳動物生物體內提供溶解性、組織相容性或延遲釋放之優點 (Bundgaard 1985)。前藥包括業內從業者熟知之酸衍生物，例如藉由使母體酸與適宜醇反應製備之酯，或藉由使母體酸化合物與經取代或未經取代之胺反應製備之鹽胺，或酸酐或混合酐。衍生自懸掛於本發明化合物上之酸性基團之簡單脂肪族或芳族酯、鹽胺及酐係較佳前藥。在一些情形下，期望製備雙酯型前藥，例如(鹽氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯。特別有用者係本發明化合物之C₁至C₈烷基、C₂-C₈烯基、芳基、C₇-C₁₂經取代之芳基及C₇-C₁₂芳基烷基酯。

醫藥組合物

在用作藥物時，本發明化合物通常以醫藥組合物形式投與。該等組合物可以醫藥業內熟知之方式製備且包含至少一種本發明式I之活性化合物。通常，本發明化合物係以醫藥有效量投與。本發明化合物之實際投與量通常可由醫師根據包括以下之相關情況來確定：欲治療之病況、所選投與途徑、實際投與之本發明化合物、個別患者之年齡、重量及反應、患者症狀之嚴重程度及諸如此類。

本發明之醫藥組合物可藉由各種途徑(包括經口、直腸、經皮、皮下、關節內、靜脈內、肌內及鼻內)來投與。端視預期遞送途徑而定，較佳地將本發明化合物調配為可注射或口服組合物或調配為皆用於經皮投與之油膏、洗劑或貼劑。

用於經口投與之組合物可採取散裝液體溶液或懸浮液或散裝粉末形式。然而，更通常地，該等組合物係以單位劑型呈現以有利於精確投藥。術語「單位劑型」係指適於作為單一劑量用於人類個體及其他哺乳動物之

物理離散單位，各單位含有經計算可產生期望治療效應之預定量的活性材料以及適宜的醫藥賦形劑、媒劑或載劑。典型單位劑型包括液體組合物之預填充、預量測安瓿或注射器或在固體組合物之情形下包括丸劑、錠劑、膠囊或諸如此類。在該等組合物中，本發明式I化合物通常係次要組份(約0.1重量%至約50重量%或較佳約1重量%至約40重量%)，且剩餘部分係有利於形成期望劑型之各種媒劑或載劑及處理助劑。

適於經口投與之液體形式可包括具有緩衝液、懸浮及分散劑、著色劑、矯味劑及諸如此類之適宜水性或非水性媒劑。固體形式可包括(例如)以下成份中之任一者或具有類似性質之本發明化合物：黏合劑，例如微晶纖維素、黃耆膠或明膠；賦形劑，例如澱粉或乳糖；崩解劑，例如海藻酸、Primojel[®]或玉米澱粉；潤滑劑，例如硬脂酸鎂；助流劑，例如膠質二氧化矽；甜味劑，例如蔗糖或糖精；或矯味劑，例如薄荷或橙味矯味劑。

可注射組合物通常係基於可注射無菌鹽水或磷酸鹽緩衝鹽水或業內已知之其他可注射載劑。如前文所闡述，該等組合物中之本發明式I之活性化合物通常係次要組份，通常為約0.05重量%至10重量%，且剩餘部分係可注射載劑及諸如此類。

通常將經皮組合物調配為含有活性成份之局部軟膏或乳霜，該等活性成份之量通常在以下範圍內：約0.01重量%至約20重量%、較佳地約0.1重量%至約20重量%、較佳地約0.1重量%至約10重量%、且更佳地約0.5重量%至約15重量%。當調配為軟膏時，活性成份通常將與石蠟或水可混溶軟膏基質組合。另一選擇為，可使用(例如)水包油乳霜基質將活性成份調配成乳霜。該等經皮調配物已為業內所熟知且通常包括其他成份以增強活性成份或調配物之真皮滲透之穩定性。所有該等已知經皮調配物及成份皆

包括在本發明範圍內。

本發明化合物亦可藉由經皮裝置投與。因此，經皮投與可使用儲層或多孔膜型貼片或固體基質類貼片來實現。

可經口投與、可注射或局部投與之組合物的上述組份僅具代表性。其他材料以及處理技術及諸如此類闡述於 **Remington's Pharmaceutical Sciences** (第 17 版, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania) 之第 8 部分中, 該文件係以引用方式併入本文中。

本發明化合物亦可以緩釋形式或自緩釋藥物遞送系統投與。代表性緩釋材料之說明可參見 **Remington's Pharmaceutical Sciences**。

以下調配物實例闡釋可根據本發明製備之代表性醫藥組合物。然而, 本發明並不限於以下醫藥組合物。

調配物 1-錠劑

可將本發明式 I 化合物與乾燥明膠黏合劑以約 1:2 之重量比混合成乾燥粉末。可添加少量硬脂酸鎂作為潤滑劑。該混合物可在壓錠機中形成 240-270 mg 錠劑 (80-90 mg 本發明式 I 之活性化合物/錠劑)。

調配物 2-膠囊

可將本發明式 I 化合物與澱粉稀釋劑以約 1:1 之重量比混合成乾燥粉末。該混合物可填充成 250 mg 膠囊 (125 mg 本發明式 I 之活性化合物/膠囊)。

調配物 3-液體

可將本發明式 I 化合物 (125 mg) 與蔗糖 (1.75 g) 及黃原膠 (4 mg) 混合且可摻和所得混合物、使其通過 10 號網目美國篩, 且然後與先前製備之微晶纖維素及羧甲基纖維素鈉 (11:89, 50 mg) 之水溶液混合。可用水稀釋苯甲酸鈉 (10 mg)、矯味劑及著色劑且邊攪拌邊添加。然後, 邊攪拌邊添加足夠

水。然後，可進一步添加足夠水以產生5 mL之總體積。

調配物4 -錠劑

可將本發明式I化合物與乾燥明膠黏合劑以約1:2之重量比混合成乾燥粉末。可添加少量硬脂酸鎂作為潤滑劑。該混合物可在壓錠機中形成450-900 mg錠劑(150-300 mg本發明式I之活性化合物)。

調配物5-注射劑

可將本發明式I化合物於緩衝無菌鹽水可注射水性介質中溶解或懸浮至約5 mg/mL之濃度。

調配物6-局部製劑

可在約75°C下將硬脂醇(250 g)及白石蠟脂(250 g)熔融且然後可添加溶解於水(約370 g)中之本發明式I化合物(50 g)、對羥基苯甲酸甲酯(0.25 g)、對羥基苯甲酸丙酯(0.15 g)、月桂基硫酸鈉(10 g)及丙二醇(120 g)之混合物且可攪拌所得混合物直至其凝結為止。

治療方法

在一個實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於醫藥中。在具體實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。

在另一實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於製造用以預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之醫藥。

在其他治療方法態樣中，本發明提供預防及/或治療患有發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之哺乳動物之方法，該等方法包含投與有效量

之本文所闡述用於治療或預防該病況之本發明化合物或一或多種醫藥組合物。

在一實施例中，本發明提供包含本發明化合物及另一治療劑之醫藥組合。在具體實施例中，該另一治療劑係用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之藥劑。

在一個實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於預防及/或治療發炎疾病。在具體實施例中，該發炎疾病係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、過敏性氣道疾病(例如，氣喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎)、內毒素引發之疾病狀態(例如，繞道手術後併發症或促成(例如)慢性心臟衰竭之慢性內毒素狀態)及涉及軟骨之相關疾病(例如關節之相關疾病)。更具體而言，該發炎疾病係牛皮癬或幼年型特發性關節炎。

在另一實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於製造用以預防及/或治療發炎疾病之醫藥。在具體實施例中，該發炎疾病係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、過敏性氣道疾病(例如，氣喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎)、內毒素引發之疾病狀態(例如，繞道手術後併發症或促成(例如)慢性心臟衰竭之慢性內毒素狀態)及涉及軟骨之相關疾病(例如關節之相關疾病)。更具體而言，該發炎疾病係牛皮癬或幼年型特發性關節炎。

在其他治療方法態樣中，本發明提供預防及/或治療患有發炎疾病之哺乳動物之方法，該等方法包含投與有效量之本文所闡述用於治療或預防該

病況之本發明化合物或一或多種醫藥組合物。在具體實施例中，該發炎疾病係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、過敏性氣道疾病(例如，氣喘、鼻炎)、慢性阻塞性肺病(COPD)、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎)、內毒素引發之疾病狀態(例如，繞道手術後併發症或促成(例如)慢性心臟衰竭之慢性內毒素狀態)及涉及軟骨之相關疾病(例如關節之相關疾病)。更具體而言，該發炎疾病係牛皮癬或幼年型特發性關節炎。

在一個實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於預防及/或治療自體免疫疾病。在具體實施例中，該自體免疫疾病係選自阻塞性氣道疾病(包括以下病況：例如COPD、氣喘(例如，內源性氣喘、外源性氣喘、粉塵性氣喘、小兒氣喘)、特別地慢性或頑固性氣喘(例如，遲發性氣喘及氣道高反應性)、支氣管炎(包括支氣管性氣喘))、全身性紅斑狼瘡(SLE)、皮膚紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、薛格連氏症候群、多發性硬化、牛皮癬、乾眼病、I型糖尿病及其相關性併發症、異位性濕疹(異位性皮炎)、甲狀腺炎(橋本氏及自體免疫甲狀腺炎)、接觸性皮炎及其他濕疹性皮炎、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、動脈粥樣硬化及肌肉萎縮性脊髓側鎖硬化。更具體而言，該自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。

在另一實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於製造用以預防及/或治療自體免疫疾病之醫藥。在具體實施例中，該自體免疫疾病係選自阻塞性氣道疾病(包括以下病況：例如COPD、氣喘(例如，內源性氣喘、外源性氣喘、粉塵性氣喘、小兒氣喘)、特別地慢性或頑固性氣喘(例如，遲發性氣喘及氣道高反應性)、支氣管炎

(包括支氣管性氣喘))、全身性紅斑狼瘡(SLE)、皮膚紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、薛格連氏症候群、多發性硬化、牛皮癬、乾眼病、I型糖尿病及其相關性併發症、異位性濕疹(異位性皮炎)、甲狀腺炎(橋本氏及自體免疫甲狀腺炎)、接觸性皮炎及其他濕疹性皮炎、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、動脈粥樣硬化及肌肉萎縮性脊髓側鎖硬化。更具體而言，該自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。

在其他治療方法態樣中，本發明提供預防及/或治療患有自體免疫疾病之哺乳動物之方法，該等方法包含投與有效量之本文所闡述用於治療或預防該病況之本發明化合物或一或多種醫藥組合物。在具體實施例中，該自體免疫疾病係選自阻塞性氣道疾病(包括以下病況：例如COPD、氣喘(例如，內源性氣喘、外源性氣喘、粉塵性氣喘、小兒氣喘)、特別地慢性或頑固性氣喘(例如，遲發性氣喘及氣道高反應性)、支氣管炎(包括支氣管性氣喘))、全身性紅斑狼瘡(SLE)、皮膚紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、薛格連氏症候群、多發性硬化、牛皮癬、乾眼病、I型糖尿病及其相關性併發症、異位性濕疹(異位性皮炎)、甲狀腺炎(橋本氏及自體免疫甲狀腺炎)、接觸性皮炎及其他濕疹性皮炎、發炎性腸病(例如，克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、動脈粥樣硬化及肌肉萎縮性脊髓側鎖硬化。更具體而言，該自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。

在一個實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於預防及/或治療增生性疾病。在具體實施例中，該增生性疾病係選自癌症(例如，子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性病(例如，真性紅細胞增多症、原發性血小板增多症及骨髓纖維化)、白血病(例如，急性骨髓樣白血病、急性及慢性淋巴母細胞性白血病)、多發性骨髓瘤、

牛皮癬、再狹窄症、硬皮病或纖維化。

在另一實施例中，本發明提供本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物，其用於製造用以預防及/或治療增生性疾病之醫藥。在具體實施例中，該增生性疾病係選自癌症(例如，子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性病變(例如，真性紅細胞增多症、原發性血小板增多症及骨髓纖維化)、白血病(例如，急性骨髓樣白血病、急性及慢性淋巴母細胞性白血病)、多發性骨髓瘤、牛皮癬、再狹窄症、硬皮病或纖維化。

在其他治療方法態樣中，本發明提供預防及/或治療患有增生性疾病之哺乳動物之方法，該等方法包含投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病況之本發明化合物或一或多種醫藥組合物。在具體實施例中，該增生性疾病係選自癌症(例如，子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性病變(例如，真性紅細胞增多症、原發性血小板增多症及骨髓纖維化)、白血病(例如，急性骨髓樣白血病、急性及慢性淋巴母細胞性白血病)、多發性骨髓瘤、牛皮癬、再狹窄症、硬皮病或纖維化。

注射劑量在約0.1 mg/kg/h至至少10 mg/kg/h之範圍內，其皆係投與約1 h至約120 h，且尤其24 h至96 h。亦可投與約0.1 mg/kg至約10 mg/kg或更高劑量之預裝載濃注以達成適當穩態值。對於40 kg至80 kg之人類患者而言，預期最大總劑量不超過約1 g/天。

為預防及/或治療長期病況(例如退化性病況)，治療方案通常延長至數月或數年，因此經口投藥對於患者具有較佳便利性及耐受性。對於經口投藥，一至四(1-4)次常規劑量/天、尤其一至三(1-3)次常規劑量/天、通常一至二(1-2)次常規劑量/天、且最通常一(1)次常規劑量/天為代表性方案。另一選擇為，對於長期效應藥物，對於經口投藥，每隔一週一次、每週一次

及每天一次為代表性方案。具體而言，劑量方案可為每1至14天一次、更具體而言每1至10天一次、甚至更具體而言每1至7天一次且最具體而言每1至3天一次。

使用該等投藥型式，每一劑量提供約1 mg至約1000 mg本發明化合物，其中具體劑量各自提供約10 mg至約500 mg且尤其約30 mg至約250 mg。

通常選擇經皮劑量以提供類似於或低於使用注射劑量達成之血液含量。

當用於預防病況發作時，通常可根據建議及在醫師監督下、以上述劑量向具有發生該病況之風險之患者投與本發明化合物。具有發生特定病況之風險之患者通常包括具有該病況之家族病史者或已藉由基因測試或篩選確定尤其易於發生該病況者。

本發明化合物可作為單一活性藥劑投與或其可與其他治療劑組合投與，該等其他治療劑包括顯示相同或類似治療活性之本發明之其他化合物及已確定可安全有效地進行該組合投與之本發明之其他化合物。在特定實施例中，兩種(或更多種)藥劑之共投與使得可顯著降低欲使用之每種藥劑之劑量，藉此減少所觀察到之副作用。

在一實施例中，投與本發明化合物或包含本發明化合物之醫藥組合物作為醫藥。在特定實施例中，該醫藥組合物另外包含另一活性成份。

在一實施例中，將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防涉及發炎之疾病，具體藥劑包括(但不限於)免疫調節劑(例如，硫唑嘌呤(azathioprine))、皮質類固醇(例如，潑尼松龍(prednisolone)或地塞米松(dexamethasone))、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環孢素A (cyclosporin

A)、他克莫司(tacrolimus)、嗎替麥考酚酯(mycophenolate mofetil)、莫羅單抗-CD3 (muromonab-CD3) (OKT3, 例如Orthocolone®)、ATG、阿司匹林(aspirin)、乙醯胺基酚、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)及吡羅西康(piroxicam)。

在一實施例中,將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防關節炎(例如,類風濕性關節炎);具體藥劑包括(但不限於)鎮痛藥、非類固醇消炎藥(NSAID)、類固醇、合成DMARD (例如(但不限於)甲胺蝶呤(methotrexate)、來氟米特(leflunomide)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、金諾芬(auranofin)、金硫丁二鈉(sodium aurothiomalate)、青黴胺(penicillamine)、氯喹、羥基氯喹、硫唑嘌呤、托法替尼(tofacitinib)、巴西替尼(baricitinib)、福他替尼(fostamatinib)及環孢素)及生物DMARD (例如(但不限於)英夫利昔單抗(infliximab)、依那西普、阿達木單抗(adalimumab)、利妥昔單抗(rituximab)及阿巴他塞(abatacept))。

在一實施例中,將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防增生性病征;具體藥劑包括(但不限於):尼特達尼(nintedanib)、吡非尼酮(pirfenidone)、甲胺蝶呤、甲醯四氫葉酸(leukovorin)、阿德力黴素(adriamycin)、潑尼松(prenisone)、博萊黴素(bleomycin)、環磷醯胺、5-氟尿嘧啶、紫杉醇(paclitaxel)、多西他賽(docetaxel)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、多柔比星(doxorubicin)、他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、阿那曲唑(anastrozole)、戈舍瑞林(goserelin)、抗HER2單株抗體(例如, Herceptin™)、卡培他濱(capecitabine)、鹽酸雷洛昔芬(raloxifene hydrochloride)、EGFR抑制劑(例如Iressa®、Tarceva™、

Erbitux™)、VEGF抑制劑(例如, Avastin™)、蛋白酶體抑制劑(例如, Velcade™)、Glivec®及hsp90抑制劑(例如, 17-AAG)。另外, 可將本發明式I化合物與其他療法(包括(但不限於)放射療法或外科手術)組合投與。在特定實施例中, 增生性病徵係選自纖維化、癌症、骨髓增生性病徵或白血病。

在一實施例中, 將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防自體免疫疾病, 具體藥劑包括(但不限於): 糖皮質激素、細胞生長抑制劑(例如嘌呤類似物)、烷基化藥劑(例如, 氮芥(環磷醯胺)、亞硝基脲、鉑配位錯合物及其他)、抗代謝藥(例如, 甲胺蝶呤、硫唑嘌呤及巯基嘌呤)、細胞毒性抗生素(例如, 放線菌素D (dactinomycin)、蒽環(anthracyclines)、絲裂黴素C (mitomycin C)、博萊黴素及光輝黴素(mithramycin))、抗體(例如, 抗CD20、抗CD25或抗CD3 (OTK3) 單株抗體、Atgam®及Thymoglobuline®)、環孢素、他克莫司、雷帕黴素(rapamycin) (西羅莫斯(sirosimus))、干擾素(例如, IFN-β)、TNF結合蛋白(例如, 英夫利昔單抗、依那昔普或阿達木單抗)、麥考酚酯、芬戈莫德(fingolimod)及多球菌殼素(myriocin)。

在一個實施例中, 將本發明化合物與另一治療劑一起共投與以治療及/或預防氣喘及/或鼻炎及/或COPD, 具體藥劑包括(但不限於): β2-腎上腺素受體激動劑(例如, 沙丁胺醇(salbutamol)、左旋沙丁胺醇(levabuterol)、特布他林(terbutaline)及比托特羅(bitolterol))、腎上腺素(吸入式或錠劑)、抗膽鹼劑(例如, 異丙托溴銨(ipratropium bromide))及糖皮質激素(口服或吸入式)。長效β2-激動劑(例如, 沙美特羅(salmeterol)、福莫特羅(formoterol)、班布特羅(bambuterol)及緩釋口服沙丁胺醇)、吸入式類固醇

及長效支氣管擴張劑之組合(例如，氟替卡松(fluticasone)/沙美特羅、布地奈德(budesonide)/福莫特羅)、白三烯拮抗劑及合成抑制劑(例如，孟魯司特(montelukast)、紮魯司特(zafirlukast)及齊留通(zileuton))、介質釋放之抑制劑(例如，色甘酸鹽及酮替芬(ketotifen))、IgE反應之生物調節劑(例如，奧馬佐單抗(omalizumab))、抗組織胺(例如，西替利嗪(cetirizine)、桂利嗪(cinnarizine)、非索非那定(fexofenadine))及血管收縮劑(例如，羥甲唑啉(oxymetazoline)、賽洛唑啉(xylometazoline)、萘甲唑啉(naphazoline)及曲馬唑啉(tramazoline))。

另外，可將本發明化合物與緊急療法組合投與用於氣喘及/或COPD，該等療法包括氧或氦氧混合氣(heliox)投與、霧化沙丁胺醇或特布他林(視情況與抗膽鹼劑(例如，異丙托銨(ipratropium))組合)、全身性類固醇(口服或靜脈內，例如，潑尼松、潑尼松龍、甲潑尼松龍、地塞米松或氫化可的松)、靜脈內沙丁胺醇、非特異性 β -激動劑(注射或吸入，例如，腎上腺素、異他林(isoetharine)、異丙腎上腺素、奧西那林(metaproterenol))、抗膽鹼劑(IV或霧化，例如，格隆溴銨(glycopyrrolate)、阿托品(atropine)、異丙托銨)、甲基黃嘌呤(茶鹼、胺茶鹼、苄胺茶鹼)、具有支氣管擴張效應之吸入麻醉劑(例如，異氟烷、鹵神(halothane)、安氟醚(enflurane))、克他明(ketamine)及靜脈內硫酸鎂。

在一實施例中，將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防發炎性腸病(IBD)，具體藥劑包括(但不限於)：改善疾病之合成糖皮質激素(例如，潑尼松、布地奈德)、免疫調節劑(例如，甲胺蝶呤、來氟米特、柳氮磺吡啶、美沙拉嗪(mesalazine)、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤及環孢素)及改善疾病之生物製劑、免疫調節劑(英夫利昔單抗、阿達木單抗、賽妥珠單抗

(certolizumab)、依曲珠單抗(etrolizumab)、維多珠單抗(vedolizumab)、優特克單抗(ustekinumab)、利妥昔單抗及阿巴他賽)。

在一個實施例中，將本發明化合物與另一治療劑一起共投與用於治療及/或預防SLE，具體藥劑包括(但不限於)：人類單株抗體(貝利木單抗(belimumab) (Benlysta[®]))、疾病改善抗風濕藥(DMARD)，例如抗瘡疾藥(例如，Plaquenil[®]、羥基氯喹)、免疫抑制劑(例如，甲胺蝶呤及硫唑嘌呤)、環磷醯胺及黴酚酸、免疫抑制藥及鎮痛藥，例如非類固醇消炎藥物、阿片劑(opiate) (例如，右丙氧芬(dextropropoxyphene)及複方可待因及撲熱息痛(co-codamol))、類阿片(例如，氫可酮(hydrocodone)、羥可酮(oxycodone)、MS Contin[®]或美沙酮(methadone))及Duragesic[®]芬太尼透皮貼劑(Duragesic[®] fentanyl transdermal patch)。

在一實施例中，將本發明化合物與另一治療劑一起共投與以治療及/或預防牛皮癬，具體藥劑包括(但不限於)：局部治療劑，例如含有煤焦油、二羥基蒽酚(dithranol)(地蒽酚(anthralin))、皮質類固醇(如去羥米松(desoximetasone) (Topicort[™]))、乙酸氟輕鬆(fluocinonide)、維生素D3類似物(例如，卡泊三醇(calcipotriol))、阿甘油(argan oil)及類視色素(阿維a酯(etretinate)、維生素A酸(acitretin)、他紮羅汀(tazarotene))之電解液、濕潤劑、醫用乳霜及軟膏，全身性治療劑，例如甲胺蝶呤、環孢素、類視色素、硫烏嘌呤、羥基脲、柳氮磺吡啶、嗎替麥考酚酯、硫唑嘌呤、他克莫司、富馬酸酯或生物製劑，例如Amevive[™]、Enbrel[™]、Humira[™]、Remicade[™]、Raptiva[™]及優特克單抗(IL-12及IL-23阻斷劑)。另外，可將本發明化合物與其他療法組合投與，該等療法包括(但不限於)光療法或光化學療法(例如，補骨脂素及紫外線A光療法(PUVA))。

在一實施例中，將本發明化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防過敏反應，具體藥劑包括(但不限於)：抗組織胺(例如西替利嗪、苯海拉明(diphenhydramine)、非索非那定、左西替立嗪(levocetirizine))、糖皮質激素(例如潑尼松、倍他米松(betamethasone)、倍氯米松(beclomethasone)、地塞米松)、腎上腺素、茶鹼或抗白三烯(例如孟魯斯特(montelukast)或紮魯斯特(zafirlukast))、抗膽鹼劑及減充血劑。

熟習此項技術者應明瞭，向患者遞送兩種或更多種治療劑之任何方式可包括共投與作為同一治療方案之一部分。儘管可以單一調配物形式(即以單一醫藥組合物形式)同時投與兩種或更多種藥劑，但此並非必需。該等藥劑可以不同調配物在不同時間投與。

化學合成程序

概述

本發明化合物可使用以下一般方法及程序自容易獲得之起始材料製備。應瞭解，儘管給出典型或較佳製程條件(即反應溫度、時間、反應物之莫耳比、溶劑、壓力等)，但除非另有說明，否則亦可使用其他製程條件。最佳反應條件可隨所用具體反應物或溶劑而變化，但該等條件可由熟習此項技術者藉由常規最佳化程序來確定。

另外，如熟習此項技術者所瞭解，可能需要習用保護基團來防止某些官能基發生不期望之反應。用於具體官能基之適宜保護基團以及用於保護及去保護之適宜條件之選擇已為業內熟知。例如，T. W. Greene及P. G. M. Wuts，*Protecting Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Blackwell；第4修訂版(2006)及其中所引用之參考文獻(Wuts及Greene 2006)中闡述眾多保護基團及其引入及去除。

提供以下方法之細節以製備如上文所定義之本發明化合物及比較實例。本發明化合物可由熟習有機合成技術者自習知或市售起始材料及反應物來製備。

除非另有說明，否則所有試劑皆係商業級且未經進一步純化即可接受使用。使用市售無水溶劑在惰性氣氛下實施反應。除非另有說明，否則在所有其他情形下皆使用試劑級溶劑。在矽膠標準品(30 μm 至70 μm)上實施管柱層析。使用經預塗覆之矽膠60 F-254板(厚度為0.25 mm)實施薄層層析。 ^1H NMR光譜係在400 MHz Bruker Avance光譜儀或300 MHz Bruker Avance DPX光譜儀上來報告。 ^1H NMR光譜之化學位移(δ)係相對於作為內標之四甲基矽烷(δ 0.00)或適當殘餘溶劑峰以百萬份數(ppm)來報告。多重性係以單峰(s)、雙峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)、五重峰(quin)、多重峰(m)及寬峰(br)給出。電噴射MS光譜係在Waters platform LC/MS光譜儀上或利用具有Waters Acquity PDA檢測器及SQD質譜儀之Waters Acquity UPLC獲得。所用管柱：UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 $\times$ 5mm VanGuard前置管柱以及Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 $\times$ 30mm管柱或Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 $\times$ 50mm管柱。所有方法皆使用MeCN/H₂O梯度。MeCN及H₂O含有0.1%甲酸或0.05% NH₃。製備型LCMS：所用管柱，Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 30 $\times$ 100mm (製備型管柱)及Waters XBridge C18 5 μm , 4.6mm $\times$ 100mm (分析型管柱)。所有方法皆使用MeCN/H₂O梯度。MeCN及H₂O含有0.1%甲酸或0.1%二乙胺。

表I. 實驗部分中所使用縮寫之列表.

AcOH	乙酸
APMA	乙酸4-胺基苯基汞
aq.	水性

atm	大氣壓
BINAP	(+/-)-2,2'-雙(二苯基膦基)-1,1'-聯萘
Boc	第三丁氧基-羰基
br	寬峰信號
BSA	牛血清白蛋白
Calc	計算值
Cpd	化合物
d	雙峰
δ	化學位移
DCM	二氯甲烷
dd	雙峰之雙峰
DIPEA	二異丙基乙胺
DMAP	二甲基胺基吡啶
DMF	二甲基甲醯胺
DMSO	二甲基亞砜
dt	三重峰之雙峰
DTT	二硫蘇糖醇
EDCI	<i>N</i> -(3-二甲基胺基丙基)- <i>N'</i> -乙基碳化二亞胺鹽酸鹽
EDTA	乙二胺四乙酸
eq.	當量
ES-	電噴射負性
ES+	電噴射正性
Et ₂ O	乙醚
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
g	克
h	小時
HPLC	高效液相層析
Hz	赫茲
Int	中間體

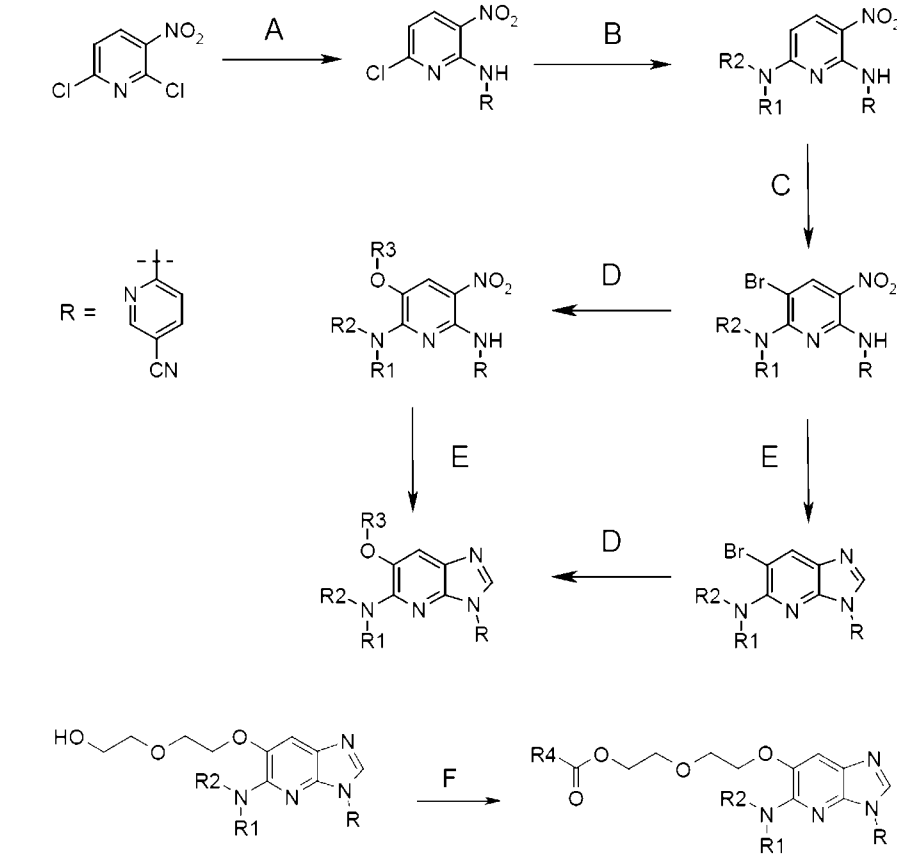
iPrOH	異丙醇
LiOMe	甲醇鋰
LiOtBu	第三丁醇鋰
m	多重峰
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
mg	毫克
MgOAc	乙酸鎂
MHz	百萬赫
min	分鐘
mL	毫升
mmol	毫莫耳
mol	莫耳
MOPS	3-(N-嗎啉基)丙烷磺酸
MS	質譜
MW	分子量
N	當量濃度
NaBH(OAc) ₃	三乙氧基硼氫化鈉
NaOtBu	第三丁醇鈉
NBS	<i>N</i> -溴琥珀醯亞胺
NMR	核磁共振
Obsvd	觀察值
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
PBST	具有Tween 20之磷酸鹽緩衝鹽水
Pd(OAc) ₂	二乙酸鈰
Pd/C	炭載鈰
ppm	百萬分率
q	四重峰
qd	雙峰之四重峰
quin	五重峰

r.t.	室溫
s	單峰
sat.	飽和
SEM	平均值標準誤差
t	三重峰
td	雙峰之三重峰
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
UPLC	超高效液相層析

本發明化合物之合成製備

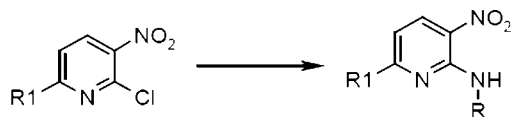
實例1. 一般合成方法

1.1. 合成方法概述



1.2. 一般方法

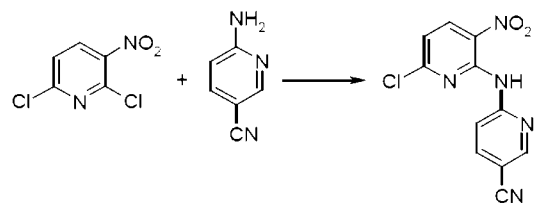
1.2.1. 一般方法A



向NaH (2當量, 60%於礦物油中)於在0°C下冷卻之無水THF中之溶液中添加相應6-胺基-菸鹼甲腈(1.1至1.2當量)。30 min後, 在0°C下, 添加2-氯-3-硝基吡啶(1當量)並在r.t.下攪拌反應物並藉由UPLC-MS監測。若反應未完成, 則在0°C下再次冷卻反應物, 且相繼添加更多NaH及更多胺。將反應混合物倒入冰水中並攪拌2 h。過濾出沈澱物, 用H₂O洗滌, 並在真空下風乾, 得到期望之化合物。

一般方法A之闡釋性合成：

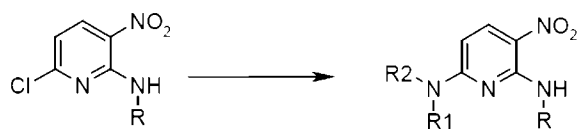
6-(6-氯-3-硝基-吡啶-2-基胺基)-菸鹼甲腈(中間體1)



向NaH (2.07 g, 51.81 mmol, 2當量, 60%於礦物油中)於在0°C下冷卻之無水THF (50mL)中之溶液中添加6-胺基-菸鹼甲腈(3.4 g, 28.5 mmol, 1.1當量)。30 min後, 在0°C下, 添加2,6-二氯-3-硝基-吡啶(5 g, 25.91 mmol, 1當量)並將反應物在r.t.下攪拌16h。使反應物冷卻至0°C, 添加NaH (0.5 g, 13 mmol, 0.5當量)並將反應物在0°C下攪拌1 h, 然後在r.t.下攪拌2h。將反應混合物倒入冰水中並攪拌2h。過濾出沈澱物, 用H₂O洗滌, 並在真空下風乾。將所獲得固體吸收於MeCN (75 mL)中, 在r.t.下攪拌1h 30min且在0°C下攪拌 1h。然後將其過濾並用MeOH洗滌, 得到期望之化合物。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.81 (1H、br s), 8.73 (1H, dd), 8.61 (1H, d), 8.31 (1H, dd), 8.01 (1H, dd), 7.36 (1H, d)。

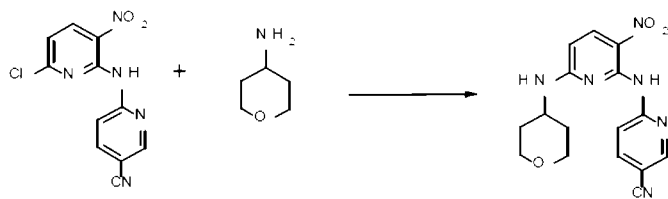
1.2.2. 一般方法B



向於DMSO中之6-氯-3-硝基-吡啶-2-基胺基衍生物(1當量)中添加相應胺(1.1當量)及DIPEA (2當量)，然後在110-130℃下微波處理反應混合物，直至完成反應為止。用H₂O稀釋混合物，過濾出沈澱物並在真空下風乾，得到期望之化合物。

一般方法B之闡釋性合成：

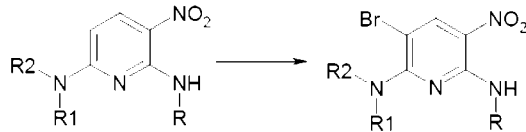
6-[3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體8)



向於DMSO (20 mL)中之6-(6-氯-3-硝基-吡啶-2-基胺基)-菸鹼甲腈(中間體1, 4 g, 14.51 mmol, 1當量)中添加四氫-吡喃-4-基胺(1.65mL, 15.96 mmol, 1.1當量)及DIPEA (5.05mL, 29.02 mmol, 2當量)，然後將反應混合物在130℃下微波處理20 min。用H₂O及Et₂O稀釋混合物，過濾出沈澱物並在真空下風乾，得到期望之化合物。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.38 (1H, s), 8.78 (1H, d), 8.47-8.63 (2H, m), 8.39 (1H, dd), 8.17 (1H, d), 6.27 (1H, d), 3.98-4.12 (1H, m), 3.91 (2H, d), 3.52 (2H, t), 1.94 (2H, d), 1.33-1.67 (2H, m)。

1.2.3. 一般方法C

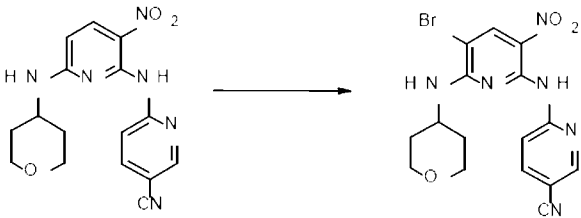


將NBS (1.1至2當量)添加至3-硝基-吡啶-2,6-二胺基衍生物(1當量)於無水MeCN中之溶液中，在r.t.下攪拌反應物並藉由UPLC-MS監測。若未達

成完全完成，則添加額外NBS直至沒有剩餘起始材料為止。過濾出所形成之沈澱物，用Et₂O洗滌並在真空下風乾，得到期望之化合物。

一般方法C之闡釋性合成：

6-[5-溴-3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體 11)



將NBS (2.04 g, 11.46 mmol, 1.3當量)添加至6-[3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體8, 3 g, 8.81 mmol, 1當量)於無水MeCN (150mL)中之溶液中並將反應物在r.t.下攪拌4h。添加NBS (0.31 g, 1.76 mmol, 0.2當量)並將反應物在r.t.下攪拌另一16h。過濾出所形成之沈澱物，用Et₂O洗滌並在真空下風乾，得到期望之化合物。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.10 (1H、br s), 8.80 (1H, m), 8.34-8.50 (3H, m), 7.72 (1H, d), 4.05-4.25 (1H, m), 3.93 (2H, m), 3.38-3.55 (2H, m), 1.70-1.87 (4H, m)。

1.2.4. 一般方法D

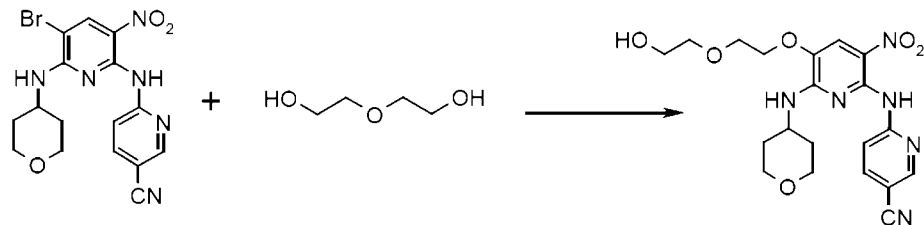


向相應醇(5當量)於無水1,4-二噁烷中或於用作溶劑之相應醇中之溶液中逐滴添加LiOtBu (3當量)。然後相繼添加2-胺基-3-溴吡啶衍生物(1當量)及CuI (0.6當量)。於微波輻照下將反應物加熱至80-120℃，或處於110-150℃下，直至完成反應為止。將混合物倒入冰水中或添加1N HCl水溶液。過濾出沈澱物並在真空下風乾。然後藉由在矽膠上急速層析純化殘

餘物，得到期望之化合物。

一般方法D之闡釋性合成：

6-[5-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體19)

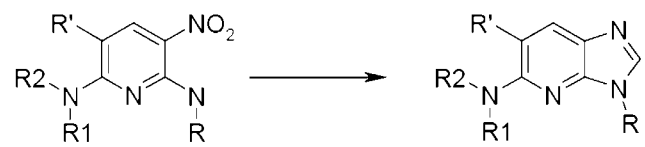


將LiOtBu (2.87 g, 35.8 mmol, 3當量)逐滴添加至2-(2-羥基-乙氧基)-乙醇(5.7 mL, 59.7 mmol, 5當量)於無水1,4-二噁烷(50 mL)中之溶液中。相繼添加6-[5-溴-3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體11, 5.0 g, 11.9 mmol, 1當量)及CuI (1.36 g, 7.2 mmol, 0.6當量)。然後將反應物加熱至120℃並保持4h。使混合物冷卻至0℃，添加1N HCl水溶液(50 mL)並將所得混合物在r.t.下攪拌20 min。過濾沈澱物並在真空下乾燥。然後藉由在矽膠上急速層析(於DCM中之0至5% MeOH溶析)純化殘餘物，得到期望之化合物。

MW (計算值)：444.45；MW (觀察值)：445.18 ES+。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.42 (1H, s), 8.75-8.79 (1H, m), 8.47-8.50 (1H, m), 8.38 (1H, dd), 7.87 (1H, d), 7.69 (1H, s), 4.58-4.72 (1H, m), 4.21-4.26 (2H, m), 4.11-4.21 (1H, m), 3.94 (2H, dd), 3.82 (2H, dd), 3.44-3.57 (6H, m), 1.81-1.90 (2H, m), 1.74 (2H, qd)。

1.2.5. 一般方法E



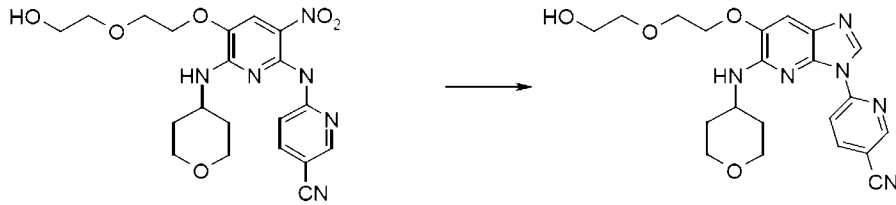
向2,6-二胺基-5-硝基-吡啶衍生物(1當量)於無水MeOH中之溶液中添加原甲酸三甲酯(約0.1 mL對於0.1 mmol 2,6-二胺基-5-硝基-吡啶衍生物)及甲酸(約0.1 mL對於0.1 mmol 2,6-二胺基-5-硝基-吡啶衍生物)。然後添加NH₄Cl (4當量)及Zn (4至5當量)並將混合物加熱至70℃，直至完成反應為止。然後使反應混合物冷卻至r.t。

若在冷卻後觀察到沈澱，則過濾固體並用DCM/CHCl₃及2%甲酸水溶液使其經受水性處理，得到期望之化合物。

若在冷卻後未發生沈澱，則蒸發溶劑且然後藉由在矽膠上急速層析純化殘餘物，得到期望之化合物。

一般方法E之闡釋性合成：

6-[6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈(化合物1)



向6-[5-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-3-硝基-6-(四氫-吡喃-4-基胺基)-吡啶-2-基胺基]-菸鹼甲腈(中間體19, 2.3 g, 5.2 mmol, 1當量)於無水MeOH (60 mL)中之溶液中添加原甲酸三甲酯(10 mL)及甲酸(10 mL)。然後添加NH₄Cl (1.1 g, 20.7 mmol, 4當量)及Zn (1.4 g, 20.7 mmol, 4當量)並將混合物加熱至回流並保持2h。添加MeOH (30 mL)並將反應混合物加熱至回流並保持1h。

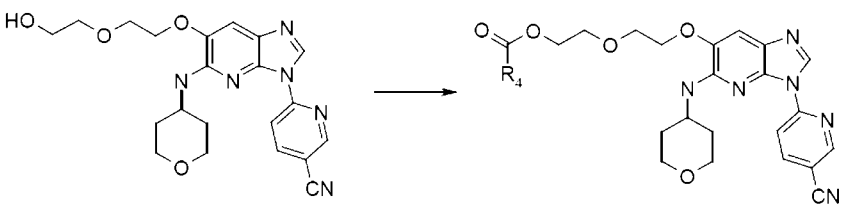
使混合物冷卻至r.t.，過濾所形成之沈澱物並在真空下乾燥。添加MeOH (100 mL)及甲酸(2 mL)並將所得混合物在回流下攪拌1h。使混合物冷卻至r.t.，將其倒入冰水中並過濾所形成之沈澱物並在真空下乾燥。將固

體懸浮於DCM及CHCl₃之混合物中，藉助矽藻土過濾並用2%甲酸水溶液洗滌濾液。將有機相經Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮至乾燥，得到期望之化合物。

MW (計算値) : 424.46 ; MW (觀察値) : 425.40 ES+

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.89-8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61-4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05-4.17 (1H, m), 3.90-3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50-3.60 (6H, m), 1.99 (2H, m), 1.55-1.70 (2H, m) °

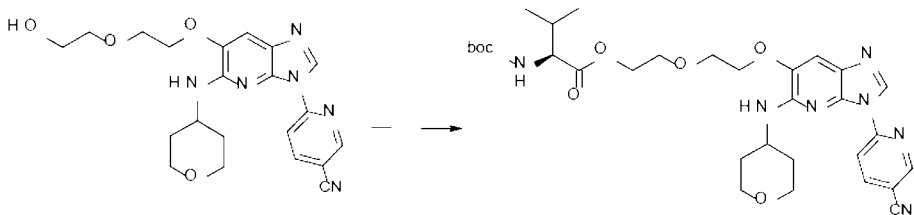
1.2.6. 一般方法F



在r.t.下在DCM中攪拌化合物**1**相應羧酸(1.5當量)、DMAP (1.5當量)及EDCI (2.25當量)之混合物，直至完成反應為止。用H₂O淬滅反應物，用DCM萃取，且然後將有機層經MgSO₄乾燥並蒸發至乾燥。藉由在矽膠上急速層析純化殘餘物，得到期望之化合物。

一般方法**F**之闡釋性合成：

(S)-2-第三丁氧基羰基胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯(中間體30)



將化合物**1** (42 mg, 0.1 mmol, 1當量)、*boc*-(*S*)-纈胺酸(33 mg, 0.15 mmol, 1.5當量)、DMAP (19 mg, 0.15 mmol, 1.5當量)及EDCI (45 mg,

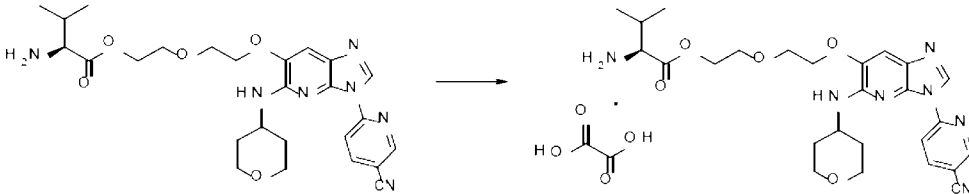
0.225 mmol, 2.25當量)之混合物在r.t.下在DCM (5 mL)中攪拌3h。用H₂O淬滅反應物，用DCM萃取，然後將有機層經MgSO₄乾燥並蒸發至乾燥。藉由在矽膠上急速層析(於庚烷中之0至100% EtOAc溶析)純化殘餘物，得到期望之化合物。

1.2.7. 一般方法G：成鹽方法

將起始材料溶解於熱EtOAc或EtOAc及MeOH (5/1)之熱混合物中。將草酸(0.2 M於EtOAc中, 1當量)添加至熱溶液中。形成沈澱物，過濾該沈澱物，用Et₂O沖洗並乾燥，得到呈起始材料之草酸鹽形式之期望化合物。

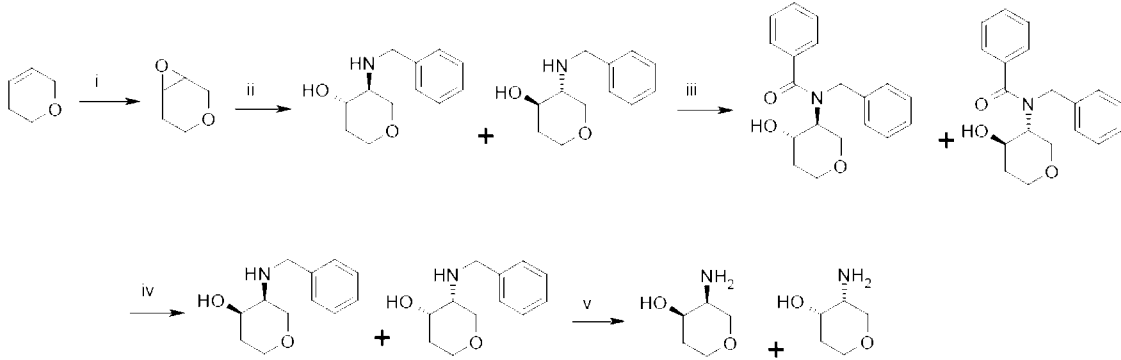
一般方法G之闡釋性合成：

(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯草酸鹽(化合物10)



將化合物9 (100 mg, 0.19 mmol, 1當量)溶解於熱EtOAc (10 mL)中並將草酸(0.2 M於EtOAc中, 0.96 mL, 0.19 mmol, 1當量)添加至該熱溶液中。過濾所形成之沈澱物，用Et₂O沖洗並乾燥，得到期望之化合物。

1.2.8. (3,4順式)-3-胺基-四氫-吡喃-4-醇(中間體28)之合成



步驟i):3,7-二氧雜-雙環[4.1.0]庚烷

向間氯過氧苯甲酸(23.51 g, 136.2 mmol, 2當量)於DCM (15 mL)中之溶液中添加3,6-二氫-2H-吡喃(5.73 g, 68.1 mmol, 1當量)於DCM (10 mL)中之溶液。將反應混合物在r.t.下攪拌6 h，此後添加間氯過氧苯甲酸(11.76 g, 68.1 mmol, 1當量)。將反應混合物在r.t.下攪拌16h並將其過濾出。用Na₂SO₃、NaHCO₃及水之飽和溶液洗滌濾液。然後將有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空中濃縮，得到期望之化合物，其未經進一步純化即用於下一步驟中。

步驟ii) : (3,4反式)-3-苄基胺基-四氫-吡喃-4-醇

將3,7-二氧雜-雙環[4.1.0]庚烷(2.7 mmol, 1當量)及苄基胺(300 μL, 2.7 mmol, 1當量)於EtOH (10 mL)中之混合物在回流溫度下加熱18h。然後蒸發EtOH並藉由在矽膠上管柱層析(用DCM:MeOH:NH₄OH 10:1:0.1溶析)純化粗製物，得到期望之化合物。

步驟iii): N-苄基-N-((3,4反式)-4-羥基-四氫-吡喃-3-基)-苯甲醯胺

將苯甲醯氯(78 μL, 0.68 mmol, 1當量)逐滴添加至來自先前步驟之(3,4 anti)-3-苄基胺基-四氫-吡喃-4-醇(140 mg, 0.68 mmol, 1當量)及TEA (280 μL, 2.03 mmol, 3當量)於DCM (2 mL)中之冰冷卻溶液中。將反應混合物在r.t.下攪拌1h。然後用2 N HCl水溶液將混合物洗滌兩次。用DCM萃取水層，且然後將合併之有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空中濃縮，得到期望之化合物。

步驟iv): (3,4順式)-3-苄基胺基-四氫-吡喃-4-醇

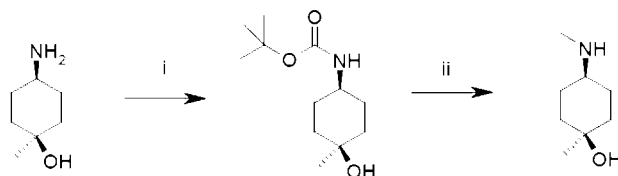
在0℃下將N-苄基-N-((3,4反式)-4-羥基-四氫-吡喃-3-基)-苯甲醯胺(220mg, 0.71 mmol, 1當量)於DCM (2.5 mL)中之溶液逐滴添加至亞硫醯氯(195 μL, 2.68mmol, 3.8當量)中。將反應混合物在r.t.下攪拌4h，且然後在

真空中濃縮。向殘餘物中添加6N HCl水溶液(2 mL)，並將所得混合物在回流溫度下加熱18h。冷卻後，過濾出沈澱物，用水洗滌，並用EtOAc萃取濾液。向水層中添加Et₂O並添加2N NaOH水溶液以使該混合物為鹼性。分離各相並用DCM及EtOAc萃取水相。然後將合併之有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並在真空中濃縮，得到期望之化合物。

步驟v): (3,4順式)-3-胺基-四氫-吡喃-4-醇

將(3,4順式)-3-苄基胺基-四氫-吡喃-4-醇(100mg, 0.48 mmol, 1當量)於MeOH (3 mL)中之溶液在r.t.及1 atm之H₂下在10% Pd/C (40 mg)上氫化1.5h。藉助矽藻土過濾來去除觸媒，用MeOH洗滌並蒸發濾液，得到期望之化合物。

1.2.9. (順式-1,4)-1-甲基-4-甲基胺基-環己醇(中間體29)之合成



步驟i): (順式-1,4)-(4-羥基-4-甲基-環己基)-胺基甲酸第三丁基酯

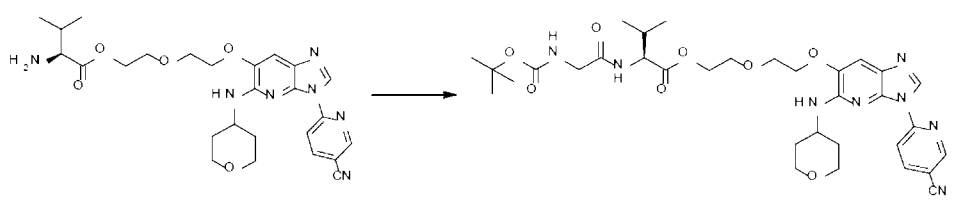
向順式-4-胺基-1-甲基環己醇(1.0 g, 7.74 mmol, 1當量)於MeCN (15 mL)中之懸浮液中添加二碳酸二第三丁基酯(1.85 g, 8.47 mmol, 1.1當量)並將混合物在r.t.下攪拌16h。過濾沈澱物，用己烷洗滌並乾燥，得到期望之化合物。

步驟ii): (順式-1,4)-1-甲基-4-甲基胺基-環己醇

在r.t.下向LiAlH₄於THF中之2.0 M溶液(7 mL, 14.0 mmol, 4.9當量)中逐滴添加(順式-1,4)-(4-羥基-4-甲基-環己基)-胺基甲酸第三丁基酯(660 mg, 2.9 mmol, 1當量)。將反應混合物在r.t.下攪拌1h且在回流下攪拌45 min。使反應混合物冷卻至r.t.，然後添加水及THF。過濾出沈澱並用THF

洗滌。將濾液濃縮至乾燥，得到期望之化合物。

1.2.10. 中間體34 : (2S)-2-[[2-(第三丁氧基羰基胺基)乙醯基]胺基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯

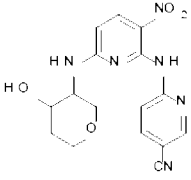
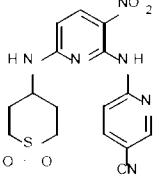
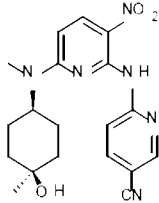
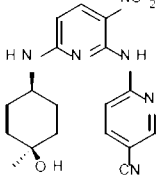


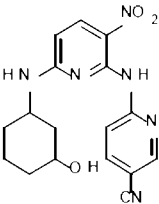
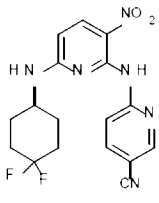
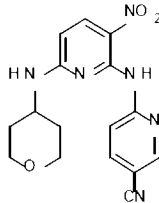
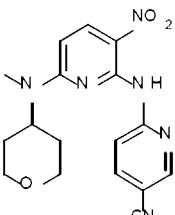
在DCM (4 mL)中混合化合物9 (170 mg, 0.40 mmol, 1當量)、2-(第三丁氧基羰基胺基)乙酸(Boc-Gly-OH、105 mg, 0.60 mmol, 1.5當量)、EDCI (173 mg, 0.90 mmol, 2.25當量)及DMAP (73 mg, 0.6 mmol, 1.5當量)並在 r.t.下攪拌過夜。用鹽水淬滅反應物，用DCM萃取並蒸發合併之有機相，得到期望之化合物。

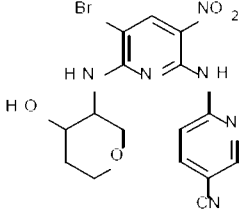
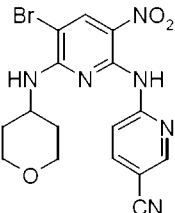
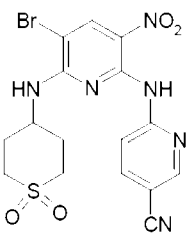
表II. 本發明化合物所使用之中間體.

SM = 起始材料， Mtd = 方法， MS Mes'd = 經量測質量

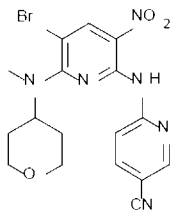
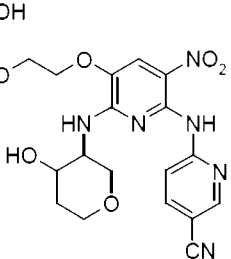
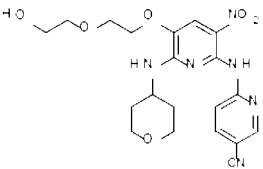
中間體編號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
1		6-[(6-氯-3-硝基-2-吡啶基)胺基]吡啶-3-甲腈	2,6-二氯-3-硝基吡啶	A	275.7	276.3

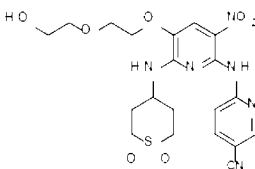
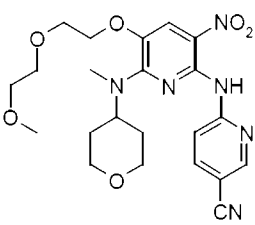
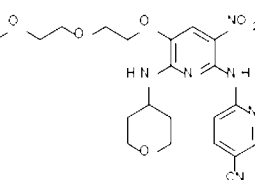
中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
2		6-[[6-[(順式-3,4)-4-羥基四氫吡喃-3-基]胺基]-3-硝基-2-吡啶基]胺基]吡啶-3-甲脞	中間體1 + 中間體28	B	356.3	357.4
3		6-[[6-[(1,1-二側氧基噻烷基-4-基)胺基]-3-硝基-2-吡啶基]胺基]吡啶-3-甲脞	中間體1	B	388.4	389.2
4		6-[[6-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基-環己基)-甲基-胺基]-3-硝基-2-吡啶基]胺基]吡啶-3-甲脞	中間體1 + 中間體29	B	382.4	-
5		6-[[6-[(順式1,4)-4-羥基-4-甲基-環己基)胺基]-3-硝基-2-吡啶基]胺基]吡啶-3-甲脞	中間體1	B	368.4	-

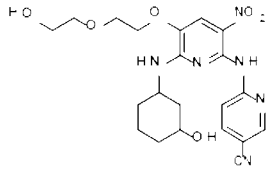
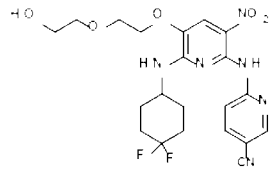
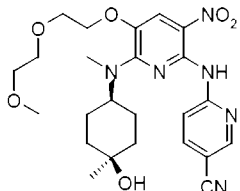
中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
6		6-[[6-[(3-羟基 环己基)胺 基]-3-硝基-2- 吡啶基]胺基] 吡啶-3-甲腈	中間體1	B	354.4	355.4
7		6-[[6-[(4,4-二 氟环己基)胺 基]-3-硝基-2- 吡啶基]胺基] 吡啶-3-甲腈	中間體1	B	374.4	375.4
8		6-[[3-硝基 -6-(四氢吡喃 -4-基胺基)-2- 吡啶基]胺基] 吡啶-3-甲腈	中間體1	B	340.3	341.4
9		6-[[6-[甲基(四 氢吡喃-4-基) 胺基]-3-硝基 -2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體1	B	354.4	-

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
10		6-[[5-溴 -6-[(順式 -3,4)-4-羟基四 氢吡喃-3-基] 胺基]-3-硝基 -2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體2	C	435.2	435.4 437.3
11		6-[[5-溴-3-硝 基-6-(四氢吡 喃-4-基胺 基)-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲腈	中間體8	C	419.2	419.5 421.4
12		6-[[5-溴 -6-[(1,1-二側 氧基噻烷-4- 基)胺基]-3-硝 基-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲腈	中間體3	C	467.3	467.2 469.3

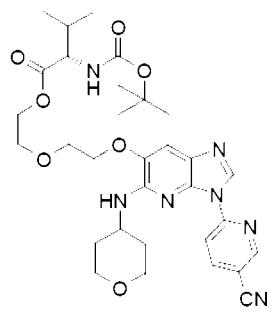
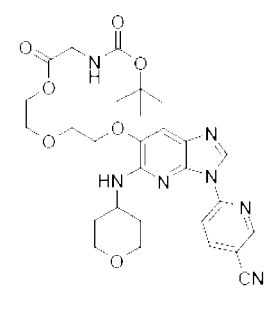
中間體編號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
13		6-[[5-溴-6-[(4- 羥基-4-甲基- 環己基)-氨基- 3-硝基-2-吡 啶基]胺基]吡 啶-3-甲基 腈	中間體4	C	461.3	-
14		6-[[5-溴- -6-[(順式 1,4)-4-羥基-4- 甲基-環己基) 胺基]-3-硝基- 2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體5	C	447.3	-
15		6-[[5-溴-6-[(3- 羥基環己基) 胺基]-3-硝基- 2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體6	C	433.3	433.4 435.4
16		6-[[5-溴- -6-[(4,4-二氟 環己基)胺 基]-3-硝基-2- 吡啶基]胺基] 吡啶-3-甲腈	中間體7	C	453.3	453.3 455.3

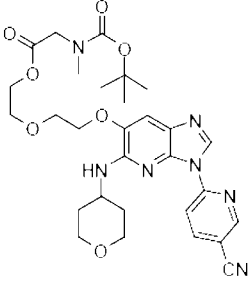
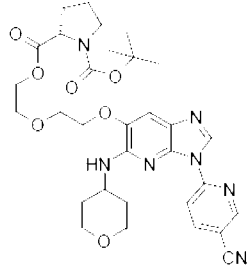
中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
17		6-[[5-溴-6-[甲 基(四氫吡喃 -4-基)胺基]-3- 硝基-2-吡啶 基]胺基]吡啶 -3-甲脞	中間體9	C	433.3	433.4 435.4
18		6-[[5-[2-(2-羥 基乙氧基)乙 氧基]-6-[(順 式-3,4)-4-羥 基四氫吡喃-3- 基]胺基]-3-硝 基-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲脞	中間體10	D	460.5	-
19		6-[[5-[2-(2-羥 基乙氧基)乙 氧基]-3-硝基 -6-(四氫吡喃 -4-基胺基)-2- 吡啶基]胺基] 吡啶-3-甲脞	中間體11	D	444.5	445.2

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
20		6-[[6-[(1,1-二 側氧基噻烷-4- 基)胺 基]-5-[2-(2-羥 基乙氧基)乙 氧基]-3-硝基 -2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體12	D	492.5	493.6
21		6-[[5-[2-(2-甲 氧基乙氧基) 乙氧基]-6-[甲 基(四氫吡喃 -4-基)胺基]-3- 硝基-2-吡啶 基]胺基]吡啶 -3-甲腈	中間體17	D	472.5	473.6
22		6-[[5-[2-(2-甲 氧基乙氧基) 乙氧基]-3-硝 基-6-(四氫吡 喃-4-基胺 基)-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲腈	中間體11	D	458.5	459.5

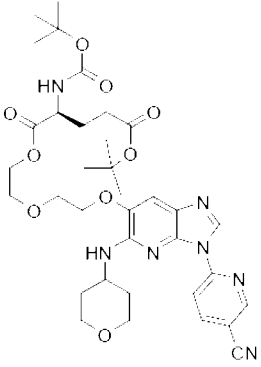
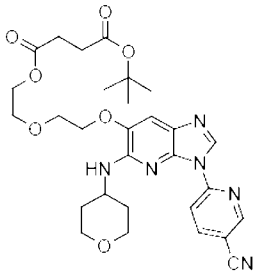
中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
23		6-[[6-[(3-羟基 环己基)胺 基]-5-[2-(2-羟 基乙氧基)乙 氧基]-3-硝基 -2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體15	D	458.5	459.5
24		6-[[6-[(4,4-二 氟环己基)胺 基]-5-[2-(2-羟 基乙氧基)乙 氧基]-3-硝基 -2-吡啶基]胺 基]吡啶-3-甲 腈	中間體16	D	478.5	479.5
25		6-[[6-[(顺式 1,4)-4-羟基-4- 甲基-环己基)- 甲基-胺 基]-5-[2-(2-甲 氧基乙氧基) 乙氧基]-3-硝 基-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲腈	中間體13	D	500.6	-

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
26		6-[[6-[(順式 1,4)-4-羥基-4- 甲基-環己基) 胺基]-5-[2-(2- 甲氧基乙氧 基)乙氧基]-3- 硝基-2-吡啶 基]胺基]吡啶 -3-甲腈	中間體14	D	486.5	-
27		6-[[5-[2-(2-羥 基乙氧基)乙 氧基]-6-[(順 式1,4)-4-羥基 -4-甲基-環己 基)胺基]-3-硝 基-2-吡啶基] 胺基]吡啶-3- 甲腈	中間體14	D	472.5	-
28		(3,4-順式)-3- 胺基-四氫-吡 喃-4-醇	3,6-二氫 -2H-吡喃	實例 1.2.8	117.2	-
29		(順式-1,4)-1- 甲基-4-甲基胺 基-環己醇	順式-4- 胺基-1- 甲基環己 醇	實例 1.2.9	143.2	-

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
30		(2S)-2-(第三丁 氧基羰基胺 基)-3-甲基-丁 酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基酯	化合物1	F	623.7	624.9
31		2-(第三丁氧基 羰基胺基)乙 酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基酯	化合物1	F	581.6	582.7

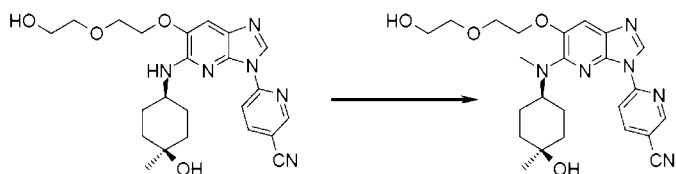
中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
32		2-[第三丁氧基 羰基(甲基)胺 基]乙酸 2-[2-[3-(5-氰 基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基酯	化合物1	F	595.7	596.7
33		(2S)-吡咯啉 -1,2-二甲酸 O1-第三丁基 酯 O2-[2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基]酯	化合物1	F	621.6	622.8

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
34		(2S)-2-[[2-(第 三丁氧基羰基 胺基)乙酯基] 胺基]-3-甲基- 丁酸 2-[2-[3-(5-氟 基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基酯	化合物9	實例 1.2.10	680.8	681.8
35		(2S)-2-(第三丁 氧基羰基胺 基)丁二酸O4- 第三丁基酯 O1-[2-[2-[3-(5- 氟基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基]酯	化合物1	F	695.8	696.9

中間 體編 號	結構	名稱	SM	Mtd	MW	MS Mes'd
36		O1-[2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基] (2S)-2-(第 三丁氧基羰基 胺基)戊二酸 O5-第三丁基 酯	化合物1	F	709.8	710.8
37		丁二酸O4-第 三丁基酯 O1-[2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基) 咪唑并[4,5-b] 吡啶-6-基]氧 基乙氧基]乙 基]酯	化合物1	F	580.6	581.7

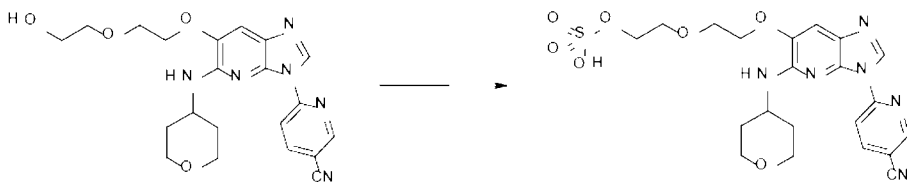
實例2. 本發明化合物之製備.

2.1. 化合物3：6-{6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-[(順式-1,4)-4-羥基-4-甲基-環己基)-甲基-胺基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈



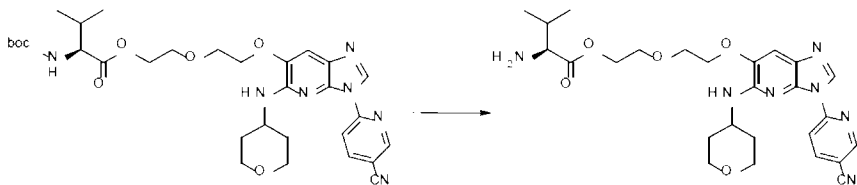
將甲醛(3.1 μ L, 0.11 mmol, 1當量)添加至化合物**12** (50 mg, 0.11 mmol, 1當量)於TFA/DCM之混合物(2 mL, 1/1)中之溶液中。在r.t.下攪拌30 min後，添加NaBH(OAc)₃ (47 mg, 0.22 mmol, 2當量)並將反應物在r.t.下攪拌1 h。然後將反應混合物蒸發至乾燥並藉由製備型HPLC-MS純化粗製產物，得到期望之化合物。

2.2. 化合物8：硫酸單-(2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基)酯



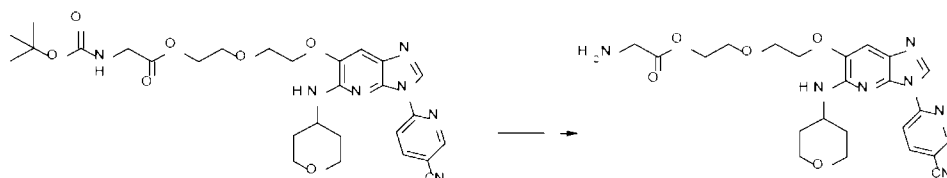
將化合物**1** (84 mg, 0.2 mmol, 1當量)添加至吡啶-SO₃複合物(127mg, 0.8 mmol, 4當量)於吡啶(5 mL)中之溶液中並將反應物加熱至回流並保持16h。然後將混合物蒸發至乾燥並藉由在矽膠上急速層析(自100% EtOAc至100% (DCM/MeOH/AcOH/H₂O: 90/10/1/1)然後至100% (DCM/MeOH/AcOH/H₂O: 85/15/2/2)溶析)純化，得到期望之化合物。

2.3. 化合物9：(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯



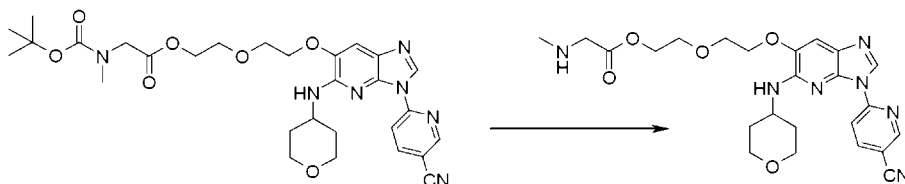
將TFA (0.5 mL)添加至中間體**30** (20 mg, 0.032 mmol, 1當量)於DCM (10 mL)中之溶液中，並將混合物在r.t.下攪拌1 h。用NaHCO₃之飽和水溶液淬滅反應物並用EtOAc萃取。將有機層經MgSO₄乾燥並蒸發至乾燥。使殘餘物自DCM/Et₂O於庚烷中之溶劑系統重結晶，得到期望之化合物。

2.4. 化合物16：2-胺基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯



將中間體**31** (195 mg, 0.34 mmol, 1當量)置於TFA/DCM混合物(1/5 mL)中並將反應物在r.t.下攪拌2h。然後用甲苯稀釋反應混合物並蒸發至乾燥。將殘餘物吸收於DCM中，用NaHCO₃飽和水溶液洗滌並將有機相蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於最少量DCM中，添加大量體積之Et₂O並使所形成之固體在燒瓶底部沉降。小心去除溶劑，使固體留於燒瓶中，添加戊烷並過濾固體，得到期望之化合物。

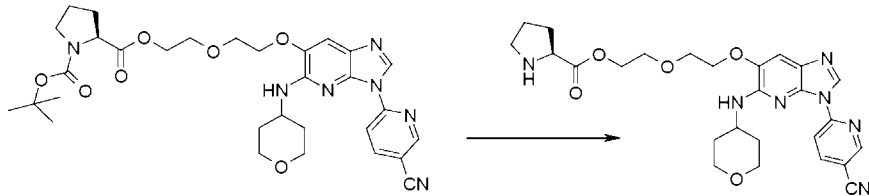
2.5. 化合物17：2-(甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯



將中間體**32** (205 mg, 0.34 mmol, 1當量)置於TFA/DCM混合物(1/5 mL)中，並將反應物在r.t.下攪拌2h。然後用甲苯稀釋反應混合物並蒸發至乾燥。將殘餘物吸收於DCM中，用飽和NaHCO₃水溶液洗滌並將有機相蒸

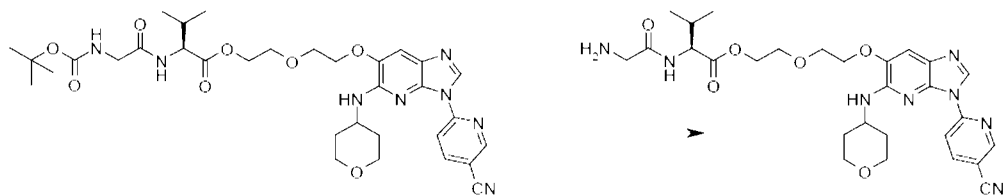
發至乾燥。將殘餘物溶解於最少量DCM中，添加大量體積之Et₂O並使所形成之固體在燒瓶底部沉降。小心去除溶劑，使固體留於燒瓶中，添加戊烷並過濾固體，得到期望之化合物。

2.6. 化合物18：(2*S*)-吡咯啉-2-甲酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-*b*]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯



將中間體**33** (211 mg, 0.34 mmol, 1當量)置於TFA/DCM混合物(1/5 mL)中並將反應物在r.t.下攪拌2h。然後用甲苯稀釋反應混合物並蒸發至乾燥。將殘餘物吸收於DCM中，用飽和NaHCO₃水溶液洗滌並將有機相蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於最少量DCM中，添加大量體積之Et₂O並使所形成之固體在燒瓶底部沉降。小心去除溶劑，使固體留於燒瓶中，添加戊烷並過濾固體，得到期望之化合物。

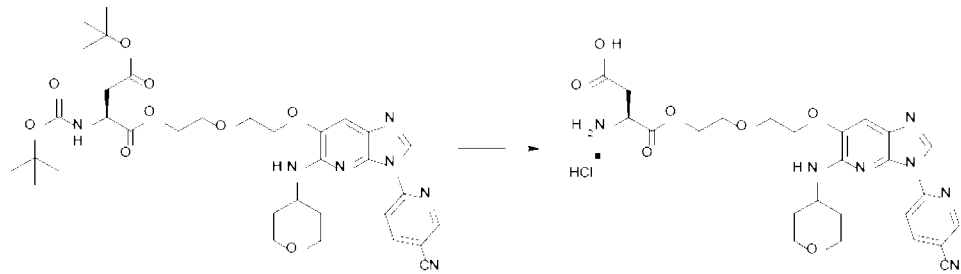
2.7. 化合物19：(2*S*)-2-[(2-胺基乙醯基)胺基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-*b*]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯



將中間體**34** (212 mg, 0.31 mmol, 1當量)置於TFA/DCM混合物(1/5 mL)中並將反應物在r.t.下攪拌2h。然後添加甲苯并將溶劑蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於DCM中且在添加飽和NaHCO₃水溶液後，固體沈澱。過濾該

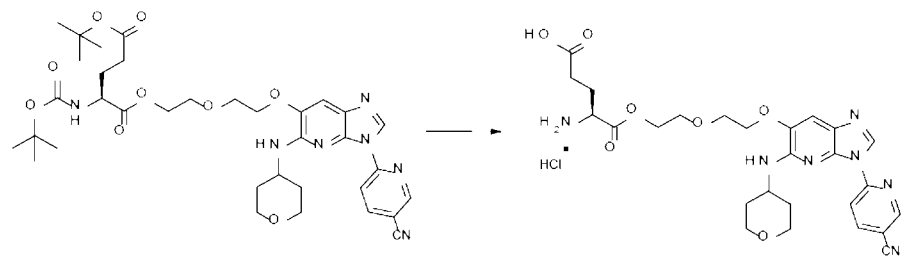
固體並乾燥，得到期望之化合物。

2.8. 化合物27：(3*S*)-3-胺基-4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-*b*]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-側氧基-丁酸鹽
酸鹽



將HCl於1,4-二噁烷中之溶液(4M, 0.4 mL, 1.6 mmol, 5當量)添加至於1,4-二噁烷(4 mL)中之中間體**35** (222 mg, 0.32 mmol, 1當量)中。將混合物在r.t.下攪拌3h且然後蒸發至乾燥。將殘餘物吸收於HCl於1,4-二噁烷中之溶液(4M, 6mL)中，將反應物在r.t.下攪拌2h並添加更多HCl於1,4-二噁烷中之溶液(4M, 2mL)。在r.t.下攪拌1h後，將溶劑蒸發至乾燥，得到期望之化合物。

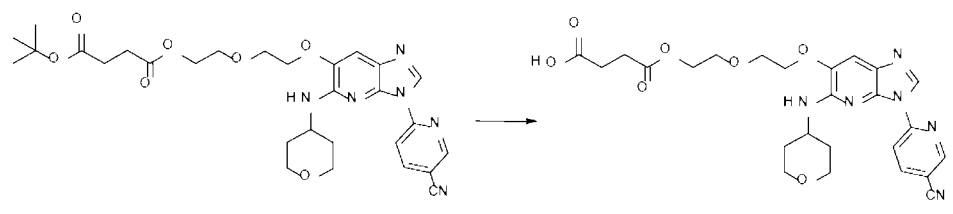
2.9. 化合物28：(4*S*)-4-胺基-5-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-*b*]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-5-側氧基-戊酸鹽
酸鹽



將HCl於1,4-二噁烷中之溶液(4M, 0.41 mL, 1.63 mmol, 5當量)添加至於1,4-二噁烷(4 mL)中之中間體**36** (232 mg, 0.33 mmol, 1當量)中。將混合物在r.t.下攪拌3h且然後蒸發至乾燥。將殘餘物吸收於HCl於1,4-二噁烷中

之溶液(4M, 6mL)中並將反應物在rt下攪拌2h。將溶劑蒸發至乾燥，得到期望之化合物。

2.10. 化合物33：4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-側氧基-丁酸

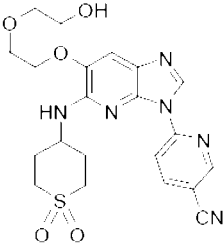
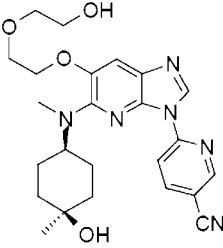
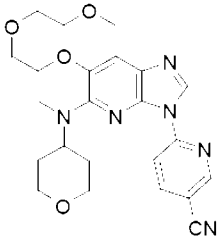


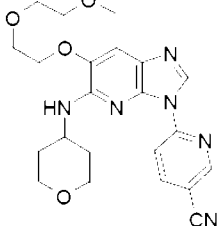
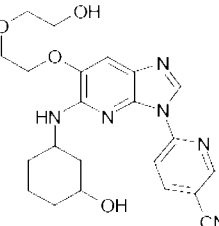
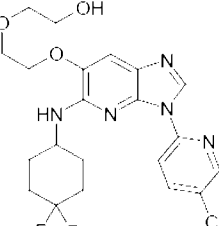
將中間體**37** (90 mg, 0.16 mmol, 1 當量)置於TFA/DCM混合物(1/5 mL)中並將反應物在r.t.下攪拌2h。然後添加甲苯并將溶劑蒸發至乾燥。藉由在矽膠上急速層析(於DCM中之0至6% MeOH溶析)純化殘餘物，並使所獲得產物自MeOH沈澱，在過濾後得到期望之化合物。

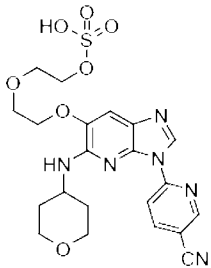
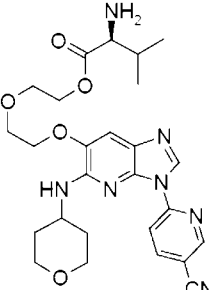
表III. 闡釋性本發明化合物。

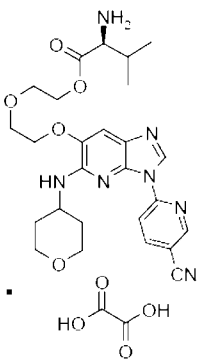
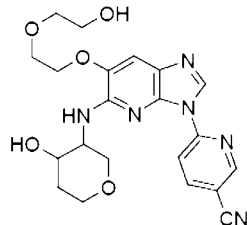
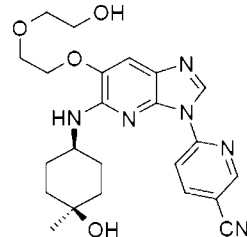
SM = 起始材料， Mtd = 方法， MS Mes'd = 經量測質量

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
1		6-[6-[2-(2-羟基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氢-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-苄基甲脒	中間體 19	E	424.5	ES+ 425.4

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
2		6-{5-(1,1-二側 氧基-四氫-2H- 硫吡喃-4-基胺 基)-6-[2-(2-羥 基-乙氧基)-乙 氧基]-咪唑并 [4,5-b]吡啶-3- 基}-菸鹼甲腈	中間體 20	E	472.5	ES+ 473.6 ES- 471.5
3		6-{6-[2-(2-羥基- 乙氧基)-乙氧 基]-5-[(順式 -1,4)-4-羥基-4- 甲基-環己基)- 甲基-胺基]-咪 唑并[4,5-b]吡啶 -3-基}-菸鹼甲 腈	化合物 12	實例 2.1	466.5	ES+ 467.6
4		6-{6-[2-(2-甲氧 基-乙氧基)-乙 氧基]-5-[甲基 -(四氫-吡喃-4- 基)-胺基]-咪唑 并[4,5-b]吡啶 -3-基}-菸鹼甲 腈	中間體 21	E	452.5	453.6

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
5		6-[6-[2-(2-甲氧基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈	中間體 22	E	438.5	ES+ 439.5 ES- 437.5
6		6-{5-(3-羥基-環己基胺基)-6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈	中間體 23	E	438.5	ES+ 439.49
7		6-{5-(4,4-二氟-環己基胺基)-6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基}-菸鹼甲腈	中間體 24	E	458.5	ES+ 459.5 ES- 457.4

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
8		硫酸單 -(2-{2-[3-(5-氰 基-吡啶-2- 基)-5-(四氫-吡 喃-4-基胺 基)-3H-咪唑并 [4,5-b]吡啶-6- 基氧基]-乙氧 基}-乙基)酯	化合物 1	實例 2.2	504.5	ES+ 505.4 ES- 503.4
9		(S)-2-胺基-3-甲 基-丁酸 2-{2-[3-(5-氰基- 吡啶-2- 基)-5-(四氫-吡 喃-4-基胺 基)-3H-咪唑并 [4,5-b]吡啶-6- 基氧基]-乙氧 基}-乙基酯	中間體 30	實例 2.3	523.6	ES+ 524.6 ES- 522.6

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
10		(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸 2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯 草酸鹽	化合物 9	G	613.6	524.4
11		6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[顺式-3,4)-4-羟基四氢吡喃-3-基]胺基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈	中間體 18	E	440.5	441.3
12		6-[6-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-5-[[顺式-1,4)-4-羟基-4-甲基环己基]胺基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈	中間體 27	E	452.5	453.0

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
13		6-[5-(((順式-1,4)-4-羥基-4-甲基-環己基)-甲基-胺基)-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈	中間體 25	E	480.6	481.4
14		6-[5-(((順式-1,4)-4-羥基-4-甲基環己基)胺基)-6-[2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基]咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]吡啶-3-甲腈	中間體 26	E	466.5	467.3
15		2-(二甲基胺基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	509.6	510.4

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
16		2-胺基乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯	中間體 31	實例 2.4	481.5	482.4
17		2-(甲基胺基)乙 酸2-[2-[3-(5-氰 基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯	中間體 32	實例 2.5	495.5	496.3
18		(2S)-吡咯啉-2- 甲酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯	中間體 33	實例 2.6	521.6	522.5

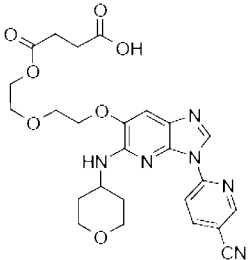
化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
19		(2S)-2-[(2-胺基乙醯基)胺基]-3-甲基-丁酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	中間體 34	實例 2.7	580.6	603.4 (M+ Na)
20		2-嗎啉基乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	551.6	552.4
21		2-(4-甲基六氫吡嗪-1-基)乙酸2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基胺基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙基酯	化合物 1	F	564.6	565.3

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
22		3-(二甲基胺基) 丙酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯	化合物 1	F	523.6	524.3
23		2-(二甲基胺基) 乙酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 15	G	599.6	ES+ 510.3
24		2-胺基乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯草酸 鹽	化合物 16	G	571.6	ES+ 482.3

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
25		2-(甲基胺基)乙 酸2-[2-[3-(5-氰 基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 17	G	585.6	ES+ 496.3
26		(2S)-吡咯啉-2- 甲酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 18	G	611.6	ES+ 522.3
27		(3S)-3-胺基 -4-[2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙氧基]-4- 側氧基-丁酸 鹽酸鹽	中間體 35	實例 2.8	576.0	ES+ 540.5

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
28		(4S)-4-胺基 -5-[2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙氧基]-5- 側氧基-戊酸 鹽酸鹽	中間體 36	實例 2.9	590.0	ES+ 554.6
29		(2S)-2-[(2-胺基 乙醯基)胺 基]-3-甲基-丁 酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 19	G	670.6	ES+ 581.4

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
30		2-嗎啉基乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 20	G	641.6	ES+ 510.3
31		2-(4-甲基六氫 吡嚟-1-基)乙酸 2-[2-[3-(5-氰基 -2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 21	G	654.6	ES+ 565.6
32		3-(二甲基胺基) 丙酸2-[2-[3-(5- 氰基-2-吡啶 基)-5-(四氫吡 喃-4-基胺基)咪 唑并[4,5-b]吡啶 -6-基]氧基乙氧 基]乙基酯 草酸鹽	化合物 22	G	613.6	ES+ 524.4

化合物 編號	結構	名稱	SM	方法	MW	MS Mes'd
33		4-[2-[2-[3-(5-氰基-2-吡啶基)-5-(四氫吡喃-4-基氨基)咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基]氧基乙氧基]乙氧基]-4-側氧基-丁酸	中間體 37	實例 2.10	524.5	ES+ 525.3

表IV. 本發明之代表性化合物之NMR數據.

化合物 編號	NMR數據
1	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.89-8.95 (1H, m), 8.75 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.59 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.61-4.69 (1H, m), 4.22 (2H, dd), 4.05-4.17 (1H, m), 3.90-3.98 (2H, m), 3.83 (2H, dd), 3.50-3.60 (6H, m), 1.98-2.01 (2H, m), 1.55-1.70 (2H, m)
2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.87-9.06 (2H, m), 8.63 (1H), 7.65 (1H, br s), 6.38 (1H, d), 4.64 (1H, br s), 4.17-4.30 (3H, m), 3.80-3.88 (2H, m), 3.50 -3.60 (4H, m), 3.40-3.48 (2H, m), 3.09-3.19 (3H, m), 2.15-2.35 (4H, m)
3	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.98-9.03 (1H, m), 8.94 (1H), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.66 (1H, s), 4.58-4.70 (1H, m), 4.13-4.22 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.85-3.96 (1H, m), 3.80 (2H, dd), 3.46-3.58 (4H, m), 2.93 (3H, s), 1.91-2.07 (2H, m), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.35-1.45 (2H, m), 1.13 (3H, s)
4	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 9.02-9.11 (1H, m), 8.93 (1H, s), 8.75 (1H, d), 8.13 (1H, dd), 7.51 (1H, s), 4.16-4.29 (3H, m), 4.09 (2H, dd), 3.85-3.97 (2H, m), 3.67-3.74 (2H, m), 3.55-3.63 (2H, m), 3.41-3.55 (2H, m), 3.40 (3H, s), 3.00 (3H, s), 2.01 (2H, qd), 1.76 (2H, dd)

化合物 編號	NMR數據
5	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.76 (1H, s), 8.62 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H), 4.21 (2H, dd), 4.06-4.17 (1H, m), 3.90-3.97 (2H, m), 3.80-3.84 (2H, m), 3.61-3.66 (2H, m), 3.54 (2H, td), 3.47-3.51 (2H, m), 3.27 (3H, s), 1.99 (2H, dd), 1.54-1.67 (2H, m)
6	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.99 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.74 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.55 (1H, s), 6.19 (1H, d), 4.72 (1H, d), 4.61-4.68 (1H, m), 4.15-4.23 (2H, m), 3.89-4.02 (1H, m), 3.77-3.87 (2H, m), 3.67 (1H, td), 3.50-3.57 (4H, m), 2.17 (1H, d), 1.87-1.96 (1H, m), 1.71-1.86 (2H, m), 1.14-1.45 (4H, m)
7	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.86-9.07 (2H, m), 8.76 (1H, br s), 8.63 (1H, d), 7.58 (1H, br s), 6.13 (1H, d), 4.51-4.76 (1H, m), 4.13-4.26 (2H, m), 3.72-3.94 (2H, m), 3.47-3.63 (5H, m), 2.09 (8H, m)
8	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD) δ 9.03 (1H, d), 8.88-8.95 (1H, br s), 8.84 (1H, d), 8.41 (1H, dd), 7.46 (1H, br s), 4.14-4.36 (5H, m), 3.95-4.12 (4H, m), 3.86 (2H, dd), 3.60-3.76 (2H, m), 2.12 (2H, d), 1.64-1.85 (2H, m)
9	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.02 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, br s), 8.13 (1H, d), 7.42 (1H, br s), 5.31 (1H, d), 4.36 (2H, br s), 4.24 (2H, br s), 4.18 (1H, br s), 4.08 (2H, d), 3.91 (2H, br s), 3.81 (2H, d), 3.62 (2H, t), 3.36 (1H, d), 2.16 (2H, d), 2.05 (1H, d), 1.26 (2H, br s), 0.98 (3H, d), 0.91 (3H, d)
10	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.00 (1H, d), 4.40-4.46 (1H, m), 4.21-4.31 (3H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.99 (2H, m), 3.85-3.90 (2H, m), 3.83 (1H, s), 3.75-3.80 (2H, m), 3.51-3.60 (2H, m), 2.04-2.15 (1H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.89-0.98 (6H, m)

化合物 編號	NMR數據
11	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, d), 8.84 (1H, d), 8.76 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 5.80 (1H, d), 5.25 (1H, br s), 4.65 (1H, br s), 4.20-4.27 (2H, m), 4.16 (1H、tt), 4.02-4.10 (1H, m), 3.79-3.84 (2H, m), 3.66-3.75 (2H, m), 3.56-3.62 (2H, m), 3.54 (4H, s), 1.82-1.94 (1H, m), 1.65-1.76 (1H, m)
12	¹ H NMR (600 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.86-8.99 (2H, m), 8.69 (1H, s), 8.49-8.58 (1H, m), 7.50 (1H, s), 5.82 (1H, d), 4.58-4.71 (1H, m), 4.17 (2H, d), 4.11 (1H, s), 3.81 (2H, d), 3.68-3.77 (1H, m), 3.53 (4H, s), 1.71-1.86 (4H, m), 1.62 (2H, d), 1.44-1.53 (2H, m), 1.17 (3H, s)
13	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.87 (1H, s), 8.58 (1H, dd), 7.65 (1H, s), 4.11-4.21 (2H, m), 4.08 (1H, s), 3.89 (1H、tt), 3.72-3.82 (2H, m), 3.55-3.62 (2H, m), 3.44-3.50 (2H, m), 3.25 (3H, s), 2.93 (3H, s), 1.99 (2H, qd), 1.62 (2H, d), 1.50 (2H, d), 1.40 (2H、td), 1.12 (3H, s)
14	¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8.92-8.99 (2H, m), 8.73 (1H, s), 8.59 (1H, dd), 7.54 (1H, s), 5.79 (1H, d), 4.18 (2H, t), 4.08 (1H, br s), 3.80 (2H, t), 3.72-3.82 (1H, m), 3.60-3.68 (2H, m), 3.45-3.52 (2H, m), 3.26 (3H, s), 1.72-1.83 (4H, m), 1.57-1.68 (2H, m), 1.43-1.56 (2H, m), 1.17 (3H, s)
15	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.03 (1H, dd), 8.83 (1H, s), 8.76 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.40 (1H, s), 5.42 (1H, d), 4.37- 4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.82-3.84 (2H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.24 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.14-2.24 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)
16	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.44 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.38- 4.40 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.52 (2H, s), 2.37 (6H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)

化合物 編號	NMR數據
17	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, dd), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, dd), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.36 (1H, d), 4.38- 4.41 (2H, m), 4.08-4.28 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.83-3.85 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.45 (2H, s), 2.48 (3H, s), 2.15-2.22 (2H, m), 1.68-1.76 (2H, m)
18	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.05 (1H, d), 8.85 (1H, s), 8.79 (1H, d), 8.16 (1H, dd), 7.43 (1H, s), 5.38 (1H, d), 4.37- 4.40 (2H, m), 4.08-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.82-3.86 (3H, m), 3.62-3.68 (2H, m), 3.08-3.14 (1H, m), 2.91-2.97 (1H, m), 2.12-2.21 (3H, m), 1.86-1.95 (1H, m), 1.60-1.82 (4H, m)
19	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, d), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, d), 8.64 (1H, dd), 8.30 (1H, br s), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 5.14 (2H, br s), 4.09- 4.35 (6H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.85-3.87 (2H, m), 3.74-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.35 (2H, br s), 1.96-2.10 (3H, m), 1.58-1.68 (2H, m), 0.85-0.88 (6H, m)
20	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.03 (1H, d), 8.83 (1H, s), 8.77 (1H, d), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.34 (1H, d), 4.36- 4.39 (2H, m), 4.07-4.26 (5H, m), 3.93-3.95 (2H, m), 3.81-3.84 (2H, m), 3.74-3.77 (4H, m), 3.61-3.67 (2H, m), 3.28 (2H, s), 2.59-2.61 (4H, m), 2.16-2.20 (2H, m), 1.65-1.75 (2H, m)
22	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.04 (1H, dd), 8.84 (1H, s), 8.77 (1H, dd), 8.14 (1H, dd), 7.42 (1H, s), 5.35 (1H, d), 4.33- 4.36 (2H, m), 4.07-4.27 (5H, m), 3.94-3.96 (2H, m), 3.81-3.83 (2H, m), 3.61-3.68 (4H, m), 2.54-2.68 (4H, m), 2.27 (6H, s), 2.16-2.20 (2H, m), 1.66-1.76 (2H, m)

化合物 編號	NMR數據
23	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.00 (1H, dd), 8.92 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.60 (1H, s), 6.02 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.06-4.18 (1H, m), 3.91-3.95 (2H, m), 3.84-3.86 (2H, m), 3.73-3.76 (2H, m), 3.62-3.68 (2H, br s), 3.51-3.57 (2H, m), 2.5 (6H, s), 1.96-2.01 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
24	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.32-4.35 (2H, m), 4.24-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.84 (2H, s), 3.77-3.79 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 1.98-2.02 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
25	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.33-4.35 (2H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.92-3.98 (4H, m), 3.86-3.89 (2H, m), 3.76-3.79 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 2.58 (3H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
26	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.29-4.42 (3H, m), 4.23-4.26 (2H, m), 4.10-4.18 (1H, m), 3.92-3.97 (2H, m), 3.87-3.89 (2H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.53-3.59 (2H, m), 3.12-3.25 (4H, m), 2.19-2.27 (1H, m), 1.92-2.03 (3H, m), 1.81-1.89 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
28	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.04 (1H, dd), 8.92-8.94 (H, m), 8.78 (1H, s), 8.66 (1H, dd), 8.54 (3H, br s), 7.59 (1H, s), 4.38-4.43 (1H, m), 4.24-4.34 (3H, m), 4.08-4.17 (2H, m), 3.87-3.97 (4H, m), 3.77-3.80 (2H, m), 3.51-3.56 (2H, m), 2.37-2.54 (2H, m), 1.97-2.06 (4H, m), 1.59-1.69 (2H, m)

化合物 編號	NMR數據
30	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.77 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.08-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.60 (6H, m), 3.32 (2H, s), 2.53-2.57 (4H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
31	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.02 (1H, dd), 8.93 (1H, d), 8.78 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.26 (5H, m), 3.92-3.98 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.72-3.76 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.36 (2H, s), 2.60-3.15 (11H, m), 1.96-2.04 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)
32	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 9.01 (1H, dd), 8.93 (1H, dd), 8.78 (1H, s), 8.63 (1H, dd), 7.62 (1H, s), 6.04 (1H, d), 4.21-4.27 (4H, m), 4.09-4.18 (1H, m), 3.91-3.98 (2H, m), 3.84-3.89 (2H, m), 3.73-3.78 (2H, m), 3.52-3.59 (2H, m), 3.24-3.28 (2H, t), 2.82-2.86 (2H, t), 2.73 (6H, s), 1.96-2.04 (2H, m), 1.57-1.67 (2H, m)
33	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 12.19 (1H, br s), 9.02 (1H, dd), 8.94 (1H, dd), 8.77 (1H, s), 8.64 (1H, dd), 7.61 (1H, s), 6.03 (1H, d), 4.08-4.25 (5H, m), 3.91-3.97 (2H, m), 3.84-3.88 (2H, m), 3.70-3.75 (2H, m), 3.51-3.59 (2H, m), 2.45-2.55 (4H, m), 1.96-2.03 (2H, m), 1.58-1.68 (2H, m)

生物實例

實例3. 活體外分析

3.1. 人類IRAK-4之IC₅₀測定

在放射性濾板分析中測定IRAK-4之IC₅₀值。該分析之原理在於在使用[γ-³³P]ATP及ATP由酶IRAK-4磷酸化後量測納入RIP140受質中之³³P。藉由將試樣加載於濾板上(使用收穫器, PerkinElmer)及6個後續洗滌步驟去

除未納入之³³P。在將MicroScint™-20 (PerkinElmer, 6013621)添加至濾板後藉由閃爍計數器(Topcount, PerkinElmer)量測RIP140中所納入之³³P。

將5 μL測試化合物之水稀釋系列(自20 μM或6.6 μM最高濃度開始)(來自100% DMSO儲備溶液, 1/5稀釋)添加至各孔中(在反應分析中最終DMSO濃度為1%)。IRAK-4 (Carna Biosciences, 09-145)及RIP140 (SEQ ID1, 參考表VII)分別以10 ng/mL及4 μM之最終濃度使用。在25 mM Tris pH 7.5, 0.025% Triton X-100, 5 mM MnCl₂及2 mM DTT中將酶及受質稀釋至11 μL之總體積。藉由添加在與酶及受質相同之緩衝液中稀釋之9μL 1 μM ATP (Sigma, A6419-5G) + 0.25 μCi [γ-³³P]ATP (PerkinElmer, NEG602K001MC)開始反應。將混合物在30℃下培育45 min。藉由添加25μL 150mM磷酸(VWR, 1.00573.1000)終止反應。將試樣轉移至濾板並使用閃爍計數器量測所納入放射性。

使用10μM星孢菌素(staurosporine) (1% DMSO)作為陽性對照(100%抑制)；媒劑(水 + 1% DMSO)作為陰性對照(0%抑制)。

表V.本發明化合物之活體外人類**IRAK-4 IC₅₀**

化合物 編號	hIRAK-4 IC₅₀ (nM)	化合物 編號	hIRAK-4 IC₅₀ (nM)
1	6.35	11	14.3
2	25.4	12	0.95
3	21.7	13	39.1
4	523	14	3.45
5	13.8		
6	4.85		
7	14.3		
8	51.4		
9	13.5		

3.2. 激酶選擇性描述(寬面板)

在 REACTION BIOLOGY (反應 Biology Corp., 1 Great Valley Parkway, Suite 2 Malvern, PA 19355, USA)處在放射測定激酶分析中測定人類激酶之抑制。

為量測化合物之 IC_{50} ，以10個劑量(自10 μ M (最高濃度)開始，利用3倍連續稀釋)測試該化合物。藉由擬合剩餘酶活性之% (相對於DMSO對照)之劑量-反應曲線推導出 IC_{50} 值。

3.3. 激酶選擇性描述(集中面板)

此分析之目的係測定本發明化合物對在抑制時可造成不合意副作用之所選擇範圍之人類激酶之活性及選擇性(Dy及Adjei 2013；Force及Kolaja 2011)。

3.3.1. 分析方案

在放射性濾板分析中測定脫靶激酶之 IC_{50} 值。該分析之原理在於量測在使用 $[\gamma-^{33}P]ATP$ 及ATP由激酶磷酸化時納入肽受質中之 ^{33}P 。藉由將試樣加載於濾板上(使用收穫器, PerkinElmer)及6個後續洗滌步驟去除未納入之 ^{33}P 。在將MicroScintTM-20 (PerkinElmer, 6013621)添加至濾板後藉由閃爍計數器(Topcount, PerkinElmer)量測肽受質中納入之 ^{33}P 。

將5 μ L測試化合物之水稀釋系列(自20 μ M或6.6 μ M最高濃度開始)(來自100% DMSO儲備溶液，1/5稀釋)添加至各孔中(在反應分析中最終DMSO濃度為1%)。酶及肽受質係以最佳濃度使用(參考表VI)。將酶及受質在分析緩衝液中稀釋至11 μ L之總體積。藉由添加在與酶及受質相同之緩衝液中稀釋之9 μ L ATP + $[\gamma-^{33}P]ATP$ 開始反應。在30 $^{\circ}C$ 下培育該混合物。藉由添加25 μ L 150mM磷酸終止反應。將試樣轉移至濾板並使用閃爍計數器

量測所納入放射性。

培育時間、分析緩衝液組成及ATP、酶及受質之濃度報告於表VI中，
例如激酶脫靶分析。

使用10μM星孢菌素(1% DMSO)作為陽性對照(100%抑制)；媒劑(水 +
1% DMSO)作為陰性對照(0%抑制)。

表VI. 人類激酶脫靶抑制分析之條件

激酶，[激酶]	受質，[受質]	ATP	分析緩衝液	培育時間
ABL (Life Technologies, P3049), 40ng/mL	PolyGT (Sigma-Aldrich, P0275), 5μg/mL	0.5μM ATP + 0.25 μCi/25 μL [γ- ³³ P]ATP	50mM Tris pH7.7 0.03% Triton X-100 1mM DTT 25mM MgCl ₂	60 min
Aurora B (Carna BioSciences, 05-102), 10ng/mL	組蛋白H3肽 (SEQ ID2), 0.5μM	1.3μM ATP + 0.25μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	25mM Tris pH 7.7 0.01% Triton X-100 5mM MgCl ₂ 5mM DTT	90 min
CDK2 (Carna Biosciences, 04-103), 30ng/mL	組蛋白H1衍生 之肽 (SEQ ID3), 0.36μM	0.1μM ATP + 0.25μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	8mM MOPS pH7.0 0.01% Brij-35 1mM DTT 5mM MnCl ₂	60 min
CDK9 (Millipore, 14-685), 230ng/mL	PDKtide (SEQ ID4), 0.5μM	0.25μM ATP + 0.125μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	20mM MOPS pH7.0 0.01% Triton X-100 5mM MnCl ₂	60 min

激酶，[激酶]	受質，[受質]	ATP	分析緩衝液	培育時間
c-KIT (Millipore, 14-559), 0.01mU/μL	PolyGT (Sigma- Aldrich, P0275), 0.1mg/mL	3μM ATP + 0.25μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	16mM Tris pH7.0 500μM EDTA 0.01% Triton X-100 10mM MnCl ₂ 1mM DTT 10mM MgOAc	90 min
GSK3b (Carna Biosciences, 04-141), 20ng/mL	磷酸化糖原合 成酶肽2 (Millipore, 12-241), 1.25μM	1.5μM ATP + 0.25μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	50mM Tris pH8.0 0.01% Brij-35 1mM DTT 5mM MgOAc	90 min
c-SRC (Carna Biosciences, 08-173), 8ng/mL	PolyGT (Sigma- Aldrich, P0275), 2μg/mL	0.25μM ATP + 0.125μCi/25μL [γ- ³³ P]ATP	25mM MOPS pH7.0 10mM MnCl ₂ 2.5mM DTT 0.01% Brij35	60 min

表VII. 人類激酶脫靶抑制分析中所使用之肽受質

受質	SEQ ID No.	序列	提供商
RIP140肽	1	CYGVASSHLKTLLKKSKVK DQ	Almac Group Ltd. 20 Seagoe Industrial Estate Craigavon BT63 5QD UK
組蛋白 H3肽	2	ARTKQTARKSTGGKAPRKQ LC	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA
組蛋白 H1衍生 之肽	3	GGGPATPKKAKKL	AnaSpec Inc. 34801 Campus Drive Fremont, CA 94555 USA

PDKtide	4	KTFCGTPEYLAPEVRREPRIL SEEEQEMFRDFDYIADWC	Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman St. Waltham, MA 02451 USA
---------	---	---	---

表VIII. 闡釋性本發明化合物之活體外人類激酶脫靶IC₅₀

化合物 編號	ABL IC ₅₀ (nM)	Aurora B IC ₅₀ (nM)	CDK2 IC ₅₀ (nM)	CDK9 IC ₅₀ (nM)	GSK3b IC ₅₀ (nM)	c-SRC IC ₅₀ (nM)
1	-	-	>6670	>1330	>6670	>1330
2	-	-	>1330	712	>1330	>1330
5	2690	-	>4000	2290	>4000	>2940
6	656	-	2670	1030	>4000	754
9	633	-	>4000	639	3250	286
11	-	-	>1330	834	>1330	>1330
12	138	>1880	944	1150	>1330	477
14	-	-	1380	1390	2240	319

3.3.2. 總結

表VIII之數據與表V之彼等相比，顯示本發明化合物在激酶脫靶中對在IRAK-4中之抑制效能更低。該等數據證實本發明化合物針對IRAK-4之選擇性，由此限制與激酶脫靶抑制相關之副作用之風險。

3.4. 細胞分析：在PBMC中CL097活化之TNF α 釋放抑制

在細胞分析中使用初級經分離人類外周血單核細胞(PBMC)測試本發明化合物以量測在使用特定TLR7/8激動劑CL097實施TLR活化之後發炎細胞介素TNF α 之分泌。藉由人類TNF α 酶聯免疫吸附分析(ELISA)方案對細胞培養上清液中TNF α 蛋白質之釋放進行定量。

3.4.1. 自人類膚色血球層分離人類初級PBMC

將人類膚色血球層(由Croatian Institute for Transfusion Medicine提

供)在4℃下保持過夜且在第二天進行處理以分離PBMC。使用Ficoll-Paque™ PLUS (GE HealthCare, 17-1440-02)藉由密度梯度離心分離PBMC。利用無菌PBS (1×) 1:4稀釋等體積膚色血球層且在適當50 mL Falcon®管中使35 mL在15 mL Ficoll-Paque PLUS頂部小心分層。在r.t.下將該等管以1500rpm離心35 min，且無加速或間斷。在離心後，去除上部血清層並小心分離單核細胞環並將其轉移至新鮮Falcon®管。在PBS中將經分離細胞懸浮液稀釋至至多50 mL，隨後實施在r.t.下以1300 rpm離心10 min之步驟。在PBS中實施2個額外洗滌步驟及細胞彙集後，藉由將細胞沈澱物再懸浮於50 mL AKL溶解緩衝液(150mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 1mM Na₂EDTA, pH 7.4)中，隨後輕輕混合來溶解剩餘紅血球。然後在r.t.下將50 mL懸浮液以1300 rpm離心10 min，隨後去除上清液，並將細胞沈澱物再懸浮於培養基(RPMI 1640 (Gibco, 21875) +在56℃下熱去活化30 min之10%胎牛血清(FBS, Biowest, S1810) + Pen/Strep (Gibco, 15240))中。

3.4.2. 在PBMC分析中之化合物處理及觸發

使用血液學分析儀(Sysmex XS-500i)對細胞進行計數，並將其以 4.0×10^5 個細胞/孔之密度平鋪於96孔培養板中之160 µL培養基中。隨後，在37℃及5% CO₂下藉由添加20 µL 10×濃縮之化合物溶液將PBMC與測試化合物一起預培育1小時。該等化合物係在不同濃度下測試，且係藉由自10 mM儲備溶液在DMSO中3倍連續稀釋、隨後在補充有1% FBS及1% Pen/Strep之2× M199培養基(Gibco, 21157-029)中實施1:50稀釋步驟來製備。該分析中之最終測試濃度始於20 µM，且隨後進行3倍連續稀釋，且最終DMSO濃度同樣為0.2%。在化合物預培育步驟後，藉由將20 µL 10µg/mL

CL097溶液(InvivoGen, tlrl-c97-5)添加至各孔中來觸發PBMC，其中最終分析體積為200 μL /孔且最終CL097觸發劑濃度為1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用相等DMSO濃度(無CL097觸發劑)調節陰性對照。然後在37°C及5% CO_2 下在增濕培育箱中將分析板培育4 h。然後藉由將細胞培養基轉移至384深孔板中收穫細胞上清液且立即將其轉移至ELISA板中用於對人類TNF α 進行定量。

3.4.3. 藉由ELISA對TNF α 進行定量

以抗體捕獲活性分析(ELISA)定量細胞上清液中之經分泌TNF α 之含量。將白色Greiner Lumitrac™ 384孔板每孔以40 μL 經於PBS中稀釋之1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗人類TNF α 抗體溶液(MAb1；BD Biosciences, 551220)在4°C下培育過夜而加以塗佈。在利用100 μL PBS洗滌各孔後，利用100 μL 阻斷緩衝液(PBS + 1%牛血清白蛋白 + 5%蔗糖)阻斷剩餘結合位點並在r.t.下培育4小時。在阻斷步驟後，用具有Tween 20之PBS (PBST)將孔洗滌一次，隨後添加試樣及標準品。在稀釋緩衝液中1/3稀釋含有TNF α 之試樣且添加40 μL 在4°C下培育過夜。在添加35 μL 以1/2000格式稀釋且最終濃度為250 ng/mL之二級生物素化抗TNF α 檢測抗體(MAb11；BD Biosciences, 554511)之後，然後將各孔洗滌3次(用PBST洗滌兩次且用PBS洗滌一次)。在r.t.下培育2小時及適當洗滌步驟(2× PBST, 1× PBS)後，利用35 μL 1/4000稀釋之辣根過氧化物酶結合之鏈黴親和素溶液(Life Technologies, SNN2004)培育各孔，隨後在r.t.下在黑暗中實施45分鐘之培育步驟。然後將各孔洗滌3次(2× PBST, 1× PBS)，隨後利用50 μL 化學發光ELISA受質溶液(Roche, 11582950001)培育5分鐘。在PerkinElmer EnVision 2104多標記讀板器中量測轉化之受質發光信號。

3.4.4. 數據分析

所有對照皆在ELISA之人類TNF α 標準曲線之線性範圍內量測。所有數據皆針對分析品質參數來檢查有效性(信號/背景> 2且Z' > 0.3)。

使用未受刺激之試樣(無觸發劑/媒劑(0.2% DMSO)作為陽性對照(100%抑制)。使用受刺激試樣(觸發劑/媒劑(0.2% DMSO))作為陰性對照(0%抑制)。使用陽性及陰性對照根據以下公式來計算Z'及抑制百分比(PIN)值：

$$PIN = \frac{RCLU_{\text{觸發劑/媒劑}} - RCLU_{\text{測試化合物}}}{RCLU_{\text{觸發劑/媒劑}} - RCLU_{\text{無觸發劑/媒劑}}} \times 100 ; \text{其中RCLU} = \text{相對化學發光光單位}。$$

對在濃度-反應模式中測試之化合物之PIN值進行繪圖並使用GraphPad Prism[®]軟體應用非線性回歸(S形)曲線擬合推導出IC₅₀值。

3.5. 細胞分析：癌症細胞分析

3.5.1. 細胞系

在37°C及5% CO₂下，在補充有10%胎牛血清(Invitrogen, S7524)或20%人類血清(Invitrogen, 34005100)之IMDM (Gibco[®], 21980-032)中培養來自OCI-Ly3、OCI-Ly10、OCI-Ly7及OCI-Ly19細胞系(來自DSMZ, Germany或ATTC, US)之人類淋巴瘤細胞。

3.5.2. 細胞生長分析

將淋巴瘤細胞(2至7×10³)平鋪於96孔板中，並利用不同劑量之測試化合物(來自30 μ M (1/3稀釋，8個點))進行處理。將經處理細胞在37°C及5% CO₂下培育7天。使用星孢菌素(10 μ M)作為陽性對照。

藉由利用alarBlue[®] (Invitrogen, DAL 1025)根據製造商之說明培育細胞來測定細胞生長。使用PerkinElmer EnVision[®]讀板器量測螢光。使用DMSO媒劑值作為0%抑制及星孢菌素值作為100%抑制計算生長抑制之

百分比。

3.6. 在SW1353細胞中之IL-1及TNF α 反應細胞分析

此分析之目的在於在活體外人類細胞分析設置中評估本發明化合物對經活化TLR / IRAK-4路徑之選擇性。SW1353細胞係來自軟骨細胞細胞系且對介白素1 (IL-1)及TNF α 細胞介素觸發劑均有反應。兩種細胞介素觸發劑均誘導該等細胞表現介白素6 (IL-6)及MMP13。在此分析中使用IL-6及MMP13釋放作為讀出且代表測試化合物對TLR / IRAK-4路徑之抑制程度之量度。IL-1觸發劑藉助IRAK-4依賴性路徑進行信號傳導，而TNF α 不需要IRAK-4進行信號傳導。因此，選擇性地抑制IRAK-4之化合物僅影響SW1353細胞之IL-1驅動之MMP13或IL-6表現且並不影響TNF α 驅動之該等蛋白質表現。

3.6.1. SW1353細胞之收穫及接種

在補充有10% FBS及1%青黴素/鏈黴素(Penicillin/Streptomycin)之DMEM中培養SW1353細胞。在37°C下在5% CO₂之增濕氣氛中培育細胞且一週將其次培養兩次。在次培養期間，使用胰蛋白酶-EDTA分離細胞，隨後實施利用細胞培養基中和之步驟。在離心後(1,000 rpm，在5 min期間)，將沈澱物再懸浮於細胞培養基中並使用自動細胞計數器(Invitrogen Countess™)對細胞進行計數。

使用第16代之細胞並將其以15,000個細胞/孔之密度平鋪於96孔培養板中之120 μ L細胞培養基中。使細胞在過夜培育期間附著。

3.6.2. SW1353分析中之化合物處理及觸發

在37°C及5% CO₂下藉由添加15 μ L 10 $\times$ 濃縮之化合物溶液將SW1353細胞與測試化合物一起預培育2 h。該等化合物係在不同濃度下測試，且係

藉由自 10 mM 儲備溶液在 DMSO 中 3 倍連續稀釋隨後在細胞培養基中實施 1/50 稀釋步驟來製備。該分析中之最終測試濃度始於 20 μ M，且隨後進行 3 倍連續稀釋，且最終 DMSO 濃度同樣為 0.2%。在化合物預培育步驟後，藉由將 15 μ L 10 $\times$ 濃縮之 IL-1 β (Peprotech, 200-01B) 或 TNF α 觸發劑 (Peprotech, 300-01A) 添加至各孔中來觸發 SW1353 細胞，其中最終分析體積為 150 μ L/孔且最終觸發劑濃度分別為 1 ng/mL 及 10 ng/mL。利用相同 DMSO 濃度 (無觸發劑) 調節陰性對照。然後在 37°C 及 5% CO₂ 下在增濕培育箱中培育分析板。24 h 及 48 h 後藉由將細胞培養基轉移至 V 型底聚丙稀 96 孔板中來收穫細胞上清液並在 -80°C 下儲存直至 ELISA 讀出為止。

3.6.3. 藉由 ELISA 對 IL-6 進行定量

在酶聯免疫吸附分析 (ELISA) 中對細胞上清液中經分泌 IL-6 之含量進行定量。利用每孔 40 μ L 在 4°C 下在 PBS 中稀釋之 1 μ g/mL 抗人類 IL-6 小鼠抗體 (R&D Systems, MAB206) 溶液將白色 Lumitrac™ 384 孔板塗佈過夜。在用 100 μ L PBST 將孔洗滌兩次及用 PBS 洗滌一次後，利用 100 μ L 阻斷緩衝液 (於 PBS 中之 1% BSA 及 5% 蔗糖) 阻斷剩餘結合位點並在 r.t. 下培育 4 h。在阻斷步驟後，用 PBST 將孔洗滌一次，隨後添加試樣或作為標準品之重組人類 IL-6 (R&D Systems, 206-IL-050)。在稀釋緩衝液中 1/20 稀釋試樣並添加 40 μ L 以在 4°C 下培育過夜。在以 50 ng/mL 之最終濃度添加 35 μ L 二級生物素化抗 IL-6 檢測抗體 (人類 IL-6 生物素化山羊多株抗體 (R&D Systems, BAF206)) 之後，然後將孔洗滌 3 次 (用 PBST 洗滌兩次且用 PBS 洗滌一次)。在 r.t. 下培育 2 h 及適當洗滌步驟 (用 PBST 兩次且用 PBS 一次) 後，利用 35 μ L 1/2,000 稀釋之鏈黴親和素-HRP 溶液 (Invitrogen, SNN2004) 培育各孔，隨後在 r.t. 下在黑暗中培育 45 min。然後將各孔洗滌 3 次 (用 PBST

兩次且用PBS一次)，隨後利用50 μ L化學發光ELISA受質溶液(Roche, 11 582 950 001)培育5 min。利用LuminoskanTM Ascent光度計量測轉化受質之發光。

3.6.4. 藉由ELISA對MMP13進行定量

在抗體捕獲活性分析中對細胞上清液中經分泌MMP13之含量進行定量。出於此目的，在4 $^{\circ}$ C下利用35 μ L 1.5 μ g/mL抗人類MMP13抗體溶液將黑色Nunc[®] MaxiSorpTM 384孔板塗佈過夜。在利用PBST將孔洗滌兩次後，在4 $^{\circ}$ C下利用100 μ L於PBS中之5%脫脂奶粉將剩餘結合位點阻斷24h。在阻斷步驟後，利用PBST將各孔洗滌兩次，隨後添加試樣及標準品。在稀釋緩衝液中1/5稀釋試樣且在r.t.下添加35 μ L保持4h。然後用PBST將各孔洗滌兩次。隨後，藉由添加35 μ L 1.5 mM APMA溶液(Sigma- Aldrich, A9563)完全活化MMP13蛋白質並在37 $^{\circ}$ C下培育1h。然後用PBST將各孔洗滌兩次並添加35 μ L MMP13受質(OMNIMMP[®]螢光受質(BIOMOL, P-126))。在37 $^{\circ}$ C下培育1 h後，利用PerkinElmer EnVision[®] (激發波長：320nm，發射波長：405nm)量測經轉化受質之螢光。

3.6.5. 數據分析及計算

所有對照皆在ELISA之人類IL-6及MMP13標準曲線之線性範圍內量測。所有生成之數據皆針對分析品質參數來驗證(信號/背景> 2且Z' > 0.3)。

使用未受刺激之試樣(無觸發劑/媒劑(0.2% DMSO)作為陽性對照(100%抑制)。使用受刺激試樣(觸發劑/媒劑(0.2% DMSO))作為陰性對照(0%抑制)。使用陽性及陰性對照來計算Z'及抑制百分比(PIN)值。

抑制百分比(PIN) = ((RU觸發劑/媒劑- RU測試化合物)/(RU觸發劑/媒劑- RU無觸發劑/媒劑)*100)；其中RU分別意指IL-6及MMP13 ELISA之

相對化學發光光單位或相對螢光單位。對在濃度-反應中測試之測試化合物之PIN值進行繪圖並使用GraphPad Prism[®]軟體應用非線性回歸(S形)曲線擬合推導出IC₅₀值。

表IX. 闡釋性本發明化合物之SW1353細胞選擇性分析結果

化合物 編號	IL-1β觸發劑		TNFα觸發劑	
	IL-6 IC ₅₀ (nM) [在20 μM下之 PIN]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [在20 μM下之PIN]	IL-6 IC ₅₀ (nM) [在20 μM下之 PIN]	MMP13 IC ₅₀ (nM) [在20 μM下之 PIN]
1	54 [89%]	36 [81%]	>20000 [54%]	>20000 [26%]
12	40 [80%]	29 [75%]	>20000 [22%]	>20000 [36%]

3.6.6. 總結

表IX之數據顯示本發明化合物可有效抑制SW1352細胞中由IL-1β觸發之IL-6及MMP13表現，而該等化合物對TNFα觸發之事件之效應在效能及最大振幅方面有所受限。該等數據證實本發明化合物對IRAK-4驅動路徑之選擇性，且對TNFα信號傳導之影響非常有限，此又可限制治療相關之副作用(例如嗜中性白血球減少症及感染)之出現。

實例4. ADME 分析

4.1. 動力學溶解性

自化合物之3.3 mM DMSO儲備溶液開始，於DMSO中藉由實施1/2稀釋製備化合物之連續稀釋：3.3 mM、1.6 mM、0.83 mM、0.41 mM及0.21 mM。將此稀釋系列轉移至透明V型底96孔板(Greiner, 651201)，且在0.1 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)或0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 3.0)中進一步1/33.5稀

釋。最終化合物濃度為99.5 μM 、49.7 μM 、24.9 μM 、12.4 μM 及6.22 μM 。最終DMSO濃度不超過3%。作為沈澱之陽性對照，將芘(30 mM)添加至每一96孔板之角落孔中。密封分析板並在37°C下在以230 rpm振盪之同時培育1 h。然後在白光顯微鏡下掃描各板，在每個濃度下產生沈澱物之個別圖像(50×放大率)。藉由影像分析軟體分析每一孔，且報告化合物顯現完全溶解之最高濃度。

4.2. 微粒體穩定性

於DMSO中三倍稀釋化合物於DMSO中之10 mM儲備溶液。然後在96深孔板(Nunc, 278752)中在105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中將此預稀釋之化合物溶液稀釋至2 μM 並在37°C下預加溫。

在105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中以1:700倍數稀釋700 U/mL之葡萄糖-6-磷酸鹽-脫氫酶(G6PDH, Roche, 10127671001)工作儲備溶液。在105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中以1:8倍數稀釋含有0.528 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, M2670)、0.528 M D-葡萄糖-6-磷酸鹽(Sigma, G7879)及0.208 M NADP⁺ (Sigma, N0505)之輔因子混合物。

製備含有目標物種(例如，人類、小鼠、大鼠、狗)之1 mg/ml肝微粒體(Tebu-bio)、1.2 U/ml G6PDH及輔因子混合物(6.6 mM MgCl_2 、6.6 mM葡萄糖-6-磷酸酯、2.6 mM NADP⁺)之工作溶液。在r.t下將此混合物預培育15 min，但決不超過20 min。

在預培育之後，以相等量一起添加化合物稀釋液及含有微粒體之混合物並以300 rpm培育30 min。對於第0 min之時間點而言，向化合物稀釋液中添加2體積MeCN，之後添加微粒體混合物。培育期間之最終濃度為：1 μM 測試化合物或對照化合物、0.2% DMSO、0.5mg/mL微粒體、0.6 U/mL

G6PDH、3.3 mM MgCl₂、3.3 mM葡萄糖-6-磷酸鹽及1.3 mM NaDP⁺。

在37°C下培育30 min之後，使用2體積MeCN終止反應。

混合試樣，離心並收穫上清液以在LC-MS/MS上進行分析。儀器反應(亦即峰高)可參考零時間點試樣(視為100%)以便確定剩餘化合物之百分比。在分析設計中包括普萘洛爾(Propranolol)及維拉帕米(verapamil)作為參考物。

關於微粒體穩定性之數據表示為30 min培育後剩餘化合物總量之百分比。

4.3. S9亞細胞部分中之代謝穩定性

此分析之目的在於藉由測定化合物在S9亞細胞部分中之活體外代謝穩定性來評價藉由醛氧化酶之化合物代謝。

首先在DMSO (40倍)中稀釋化合物於DMSO中之10 mM儲備溶液，得到250 μM濃度。用水(5倍)進一步稀釋此化合物溶液，得到50 μM化合物工作溶液(獲得1 μM之化合物最終濃度)。以5 mM在水中製備肼屈嗪(hydralazine)(醛氧化酶之選擇性抑制劑)(獲得100 μM之最終濃度)。藉由在37°C下將10 μL肝S9懸浮液(人類、大鼠、小鼠、猴子，BD GentestTM, 20 mg/mL)添加至86 μL 50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)中來製備培育混合物(2 mg蛋白質/mL之最終濃度)。添加2 μL 5 mM肼屈嗪用於在添加選擇性抑制劑之情況下培育，或添加2 μL水用於在無抑制劑下培育。在5 min預加溫後，藉由將2 μL 50 μM測試化合物添加至培育混合物中來起始反應。在培育0 min、3 min、6 min、12 min、18 min及30 min後，用300 μL具有1%乙酸混合物含有10 ng/mL華法林(warfarin)(作為分析內部標準)之MeCN:MeOH (2:1)終止反應(100 μL)。混合試樣，離心並藉由LC-MS/MS

分析上清液。包括酞嗪作為陽性對照。

儀器反應(化合物及內部標準品之峰面積比率)參考零時間點試樣(視為100%)以便確定剩餘化合物之百分比。使用剩餘化合物%之繪圖使用GraphPad Prism[®]軟體來確定S9培育物中之半衰期及內在清除率。使用以下式計算活體外內在清除率($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)：

$$\text{CL}_{\text{int}} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}) = 0.693/t_{1/2} (\text{min}) * (\text{mL培育物}/\text{mg蛋白質}) * 1000$$

若藉由S9之清除率受胍屈嗪抑制，則可將測試化合物分類為醛氧化酶之受質。測試化合物之物種特異性清除率亦可指示藉由醛氧化酶之代謝。

4.4. 肝細胞中之代謝穩定性

首先在DMSO中將測試化合物於DMSO中之10 mM儲備溶液稀釋至3mM，且然後在經修改Krebs-Henseleit緩衝液(Sigma, K3753)中稀釋至5 μM 。在37°C下在輕輕振盪下將此化合物稀釋液添加至經彙集冷凍保存肝細胞(BioreclamationIVT)之懸浮液中。最終反應條件為：1 μM 測試化合物、0.03% DMSO、500萬個活力肝細胞/mL及75 μL 培育體積。分別使用鞣固酮(1 μM)及7-羥基香豆素(1 μM)作為I期及II期代謝反應對照。

在培育0 min、10 min、20 min、45 min、90 min、120 min及180 min後，利用225 μL 含有10 ng/mL華法林鈉(作為分析內部標準品)之MeCN:MeOH (2:1)終止反應。混合試樣，離心並藉由LC-MS/MS分析上清液。

儀器反應(測試化合物及內部標準品峰面積之比率)參考零時間點試樣(視為100%)以便確定剩餘化合物之百分比。

使用剩餘化合物之百分比之繪圖使用GraphPad Prism[®]軟體來確定肝細胞培育物中之半衰期及內在清除率。

4.5. CYP抑制

使用cDNA表現之人類細胞色素P450異酶及代謝為螢光代謝物之非螢光受質評價測試化合物對人類細胞色素P450異酶(CYP1A2、2C9、2C19、2D6及3A4)之抑制潛能。

測試3.3μM及10 μM下之化合物，其中最終DMSO濃度為0.3%。將化合物與酶一起培育15 min，之後添加輔因子-受質混合物。對於CYP3A4 (BD Biosciences, 456202)、CYP2C9 (BD Biosciences, 456258)、CYP2C19 (BD Biosciences, 456259)及CYP1A2 (BD Biosciences, 456203)分析而言在輔因子混合物中之最終反應濃度為：0.4 U/mL 葡萄糖-6-磷酸鹽-脫氫酶 (G6PDH, Roche, 10165875001)、3.3 mM MgCl₂ (Sigma, M2670)、3.3 mM D-葡萄糖-6-磷酸鹽(Sigma, G7879)及1.3 mM NADP⁺ (Sigma, N0505)。對於CYP2D6 (BD Biosciences, 456217)而言，該分析中之最終反應濃度為0.4 U/mL G6PDH、0.41 mM MgCl₂、0.41 mM D-葡萄糖-6-磷酸鹽及8.2 μM NADP⁺。酶及受質之濃度報告於表X中。在一定培育時段後，藉由添加終止溶液終止反應。對於利用DBF作為受質之實驗，使用2 N NaOH終止溶液，而對於所有其他受質而言，終止溶液為80% MeCN/20% 0.5 M Tris鹼。

在PerkinElmer EnVision[®]讀取器上在適當激發及發射波長下立即(對於CEC、AMMC、BFC而言)或在20 min後(對於使用DBF作為受質之CYP2C9及CYP3A4而言)讀取螢光(參考表X)。

然後藉由將數據正規化為空白試樣來計算測試化合物對CYP抑制之百分比：100%抑制係在添加酶/受質混合物之前終止空白試樣，且0%抑制係在發生酶反應(50 min)後終止空白試樣。

表X. 用於所研究之每一CYP450異酶之抑制分析條件

	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9	CYP1A2	CYP2D6
--	--------	--------	---------	--------	--------	--------

	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9	CYP1A2	CYP2D6
受質 (μM)						
DBF	1	-	-	0.5	-	-
CEC	-	-	35	-	4	-
AMMC	-	-	-	-	-	0.5
BFC	-	120	-	-	-	-
磷酸鹽 緩衝液 (pH 7.4) (mM)	200	90	25	25	25	25
酶 (pmol/ 孔)	1	1.5	6	2	1.5	3
培育時 間 (min)	50	50	50	50	50	50
陽性對 照	酮康唑 (ketoconazole)	酮康唑	氟伏沙明 (fluvoxamine)	磺胺苯 吡唑	氟伏沙 明	奎尼丁 (quinidine)
激發波 長(nm)	485	400	400	485	400	380
發射波 長(nm)	530	530	460	530	460	460

AMMC：胺基乙基-7-甲氧基-4-甲基香豆素 CEC：3-氰基-7-乙氧基香豆素

BFC：7-苄基氧基-4-三氟甲基香豆素 DBF：二苄基螢光黃

4.6. MDCKII-MDR1滲透性

MDCKII-MDR1細胞係過表現人類多藥物抗性(MDR1)基因、編碼P-醣蛋白(P-gp)之Madin-Darby犬腎上皮細胞。細胞係自荷蘭癌症研究所

(Netherlands Cancer Institute) 獲得且在 24 孔 Millicell[®] 細胞培養插板 (Millipore, PSRP010R5) 中實施 3 至 4 天培養後使用。如下所述實施雙向 MDCKII-MDR1 滲透性分析。

將 3×10^5 個細胞/mL (1.2×10^5 個細胞/孔) 接種於由 DMEM (Sigma, D5796) + 1% Glutamax-100 (Sigma, G8541) + 1% 抗生素/抗黴菌劑 (Sigma, A5955) + 10% FBS (Sigma, F7524；在 56°C 下去活化 30 min) 組成之平板培養基中。將細胞在 CO₂ 培育箱中保持 3 至 4 天。在接種後 24 h 且在實驗當天更換培養基。

在達爾伯克氏磷酸鹽緩衝鹽水(D-PBS, pH 7.4; Sigma, D8662) 中製備測試化合物及參考化合物(胺普那韋(amprenavir) (Moravek Biochemicals, M-1613)、雙氯芬酸(Sigma, D6889))，並以 10 μ M (在胺普那韋之情形下為 0.5 μ M) 之最終濃度添加至 Millicell 細胞培養板總成之頂室(400 μ L) 或底側室(800 μ L) 中，且最終 DMSO 濃度為 1%。將接受溶液(D-PBS + 1% DMSO) 添加至 Millicell 細胞培養板之相對室中。

將 100 μ M 螢光黃(Lucifer yellow) (Sigma, L0259) 添加至所有供體緩衝溶液中，以便藉由監測螢光黃滲透性來評價細胞單層之完整性。螢光黃係用於細胞旁運輸路徑之螢光標記，且其用作內部對照以驗證分析期間每一細胞單層之緊密結合完整性。

在 37°C 下在定軌振盪器上以 150 rpm 振盪之同時培育 1 h 後，自頂室及基底室二者中取出 75 μ L 等份試樣並將其添加至 96 孔板中含有分析內部標準品(10 ng/mL 華法林) 之 225 μ L MeCN:水溶液(2:1) 中。亦在實驗開始時自供體溶液分成等份試樣，以獲得初始濃度。

藉由高效液相層析/質譜(LC-MS/MS) 量測試樣中化合物之濃度。

在含有來自所有接受孔(底側或頂側)之150 μ L液體之96孔板中利用 Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL (激發波長：485nm，量測波長：530nm)量測螢光黃。

實例5. 全血分析

5.1. 離體人類TNF α 釋放抑制(全血分析)

該分析之目的係在離體人類全血設置中評估本發明化合物對經活化 TLR / IRAK-4路徑之活性。類鐸受體(TLR)係識別眾多種微生物分子之型式識別受體(稱為病原體相關之分子型式(PAMP))。人類TLR7及TLR8識別咪唑并喹啉化合物(例如，CL097)及單鏈RNA作為其天然配體。TLR之活化使得TLR激動劑處理之細胞產生若干細胞介素(例如，TNF α 、IL-8、IL-6)。在此分析中使用細胞介素釋放作為讀出且其代表經測試化合物對 TLR / IRAK-4路徑之抑制程度之量度。應注意在完整生物體之情況下，存在該等細胞介素之不依賴於TLR / IRAK-4路徑之其他來源，例如，巨噬細胞(在活化Fc γ 受體時(Yan等人2012))或T細胞(在活化T細胞受體時(Brehm等人2005))。

5.1.1. 實驗設計

藉由靜脈穿刺將健康志願者之血液收集至肝素鋰管中，然後輕輕顛倒若干次以防止凝固並在37°C下在搖擺混合器式振盪器上培育至少15 min。然後，將200 μ L血液分配至2 mL微管中，並將其在37°C下與0.3% DMSO或不同濃度下之測試化合物(10 μ M至0.01 μ M，在無麩醯胺酸之RPMI 1640 (Life Technologies, 31870)中實施3倍稀釋)一起一式兩份預培育15 min。在此預培育後，在37°C下利用CL097 (2 μ g/mL(來自1mg/mL水溶液)；InvivoGen, tlr1-c97)或媒劑(蒸餾水)將血液觸發3 h 30 min。在4°C下

以5000 × *g*將微管離心10 min，並將約80 μL血漿收集至聚苯乙烯96孔板中。可新鮮地或在觸發後不久在-80℃下冷凍地分析血漿。最後，藉由使用人類TNF-α DuoSet ELISA套組(R&D Systems, DY210)根據製造商之說明將血漿稀釋40倍來實施TNFα之定量。在PerkinElmer EnVision 2102多標記讀板器上在450 nm下測定光學密度(OD)。

5.1.2. 數據分析

藉由對y軸上之平均吸光度對x軸上之濃度進行繪圖來創建標準曲線，並藉助該圖形上之點繪製最佳擬合曲線。實施線性回歸分析來確定等式($y=ax + b$)及R平方值。對於每一血液試樣重複，慮及稀釋倍數使用下式來計算TNFα濃度：

$$\text{TNF}\alpha\text{濃度}_{\text{試樣}1} = 40 * (\text{OD}_{\text{試樣}1} - b) / a$$

然後針對每一重複使用下式將數據表示為抑制百分比(PIN)：

$$\text{PIN}_{\text{試樣}1} = \frac{\text{利用CL097之平均TNF}\alpha - \text{TNF}\alpha_{\text{試樣}1}}{\text{利用CL097之平均TNF}\alpha - \text{利用媒劑之平均TNF}\alpha} \times 100 \quad ,$$

其中「利用CL097之平均TNFα」係利用CL097觸發之重複試樣之平均TNFα濃度；「TNFα試樣1」係試樣1之TNFα濃度；且「利用媒劑之平均TNFα」係經媒劑處理之重複試樣之平均TNFα濃度。

使用平均PIN ± SEM生成曲線擬合。使用GraphPad Prism®軟體推導出圖形及IC₅₀計算。

5.2. 離體大鼠TNF α釋放抑制(全血分析)

該分析之目的係在離體大鼠全血設置中評價本發明化合物對經活化TLR / IRAK-4路徑之活性。類鐸受體(TLR)係識別眾多種微生物分子之型式識別受體(稱為病原體相關之分子型式(PAMP))。儘管人類TLR7及TLR8均識別咪唑并喹啉化合物(例如，CL097)及單鏈RNA作為其天然配體，但

齧齒動物TLR8需要其他因素(例如寡脫氧核苷酸(例如，poly(dT)))進行活化。

5.2.1. 實驗設計

自Janvier Labs (France)獲得斯普拉道來(Sprague Dawley)大鼠(雄性，7至8週齡，200 g至250 g體重)。

藉由放血將自至少2隻大鼠獲得之血液收集至肝素鋰管中且然後在37℃下在搖擺混合器式振盪器上預培育至少15 min。將來自所有大鼠之血液混合至50 mL聚丙烯管中以得到獨特血液批料。然後，將200μL血液分配至2 mL微管中並將其於37℃下與0.3% DMSO或不同濃度下之測試化合物(10 μM至0.01 μM, 在無麩醯胺酸之RPMI 1640(Life Technologies, 31870)中實施3倍稀釋)一起一式兩份培育15 min。在此預培育後，在37℃下利用CL097 (10 μg/mL(來自1mg/mL水溶液)；InvivoGen, tlrl-c97)及poly(dT) (1 μM (來自100 μM水溶液)；InvivoGen, tlrl-pt17)或媒劑(蒸餾水)將血液觸發3 h 30 min。在4℃下將微管以5000×g離心10 min並將約80 μL血漿收集至聚苯乙烯96孔板中。可新鮮地或在觸發後不久在-80℃下冷凍地分析血漿。最後，使用大鼠TNF-α Quantikine ELISA套組(R&D Systems, SRTA00)根據製造商之說明對血漿(1:3稀釋)實施TNFα之定量。在PerkinElmer EnVision 2102多標記讀板器上在450 nm下測定光學密度(OD)。

5.2.2. 數據分析

藉由對y軸上之平均吸光度對x軸上之濃度進行繪圖來創建標準曲線且藉助該圖形上之點繪製最佳擬合曲線。實施線性回歸分析以確定等式($y=ax +b$)及R平方值。對於每一血液試樣重複，慮及稀釋倍數使用下式計算TNFα濃度：

$$\text{TNF}\alpha\text{濃度}_{\text{試樣1}} = 40 * (\text{OD}_{\text{試樣1}} - b) / a$$

然後針對每一重複使用下式將數據表示為抑制百分比(PIN)：

$$\text{PIN}_{\text{試樣1}} = \frac{\text{利用CL097之平均TNF}\alpha - \text{TNF}\alpha_{\text{試樣1}}}{\text{利用CL097之平均TNF}\alpha - \text{利用媒劑之平均TNF}\alpha} \times 100 ,$$

其中「利用CL097之平均TNF α 」係利用CL097 + poly(dT)觸發之重複試樣之平均TNF α 濃度；「TNF α 試樣1」係試樣1之TNF α 濃度；且「利用媒劑之平均TNF α 」係經媒劑處理之重複試樣之平均TNF α 濃度。

使用平均PIN $\pm$ SEM生成曲線擬合。使用GraphPad Prism[®]軟體推導出圖形及IC₅₀計算。

實例6. 活體內分析

6.1. 藉由局部施用咪喹莫特(imiquimod) (TLR7/8激動劑)誘導之鼠類牛皮癬樣表皮增生模型。

6.1.1. 材料

Aldara[®] 5%咪喹莫特乳霜係獲自MEDA。

抗小鼠IL-12/IL-23 p40 FG經純化抗體(C17.8)係獲自Affymetrix eBioscience (目錄號16-7123-85)。

6.1.2. 動物

Balb/cJ小鼠(雌性，18-20 g體重)係獲自Janvier Labs (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22 $\pm$ 2°C下，隨意提供食物及水。

6.1.3. 研究設計

研究之設計係根據Van der Fits L.等人(van der Fits等人2009)改編而成。

在第一天，在利用異氟烷淺麻醉下在小鼠之兩隻耳朵周圍剃毛。

將30 mg市售咪喹莫特乳霜(Aldara 5%乳霜)施用於每一耳朵之內部及外部表面上達連續4天，轉換成1.5 mg活性化合物之日劑量。對照動物接受相同量之凡士林(vaseline)。

對於第1天至第5天，在0.5%甲基纖維素中*p.o.*, *b.i.d.*利用測試化合物(10 mg/kg或30 mg/kg)對小鼠投藥，之後施用咪喹莫特(在第5天，在安樂死前2 h對小鼠僅投藥一次)。

在陽性參考組中，在第1天及第1天前之3天，動物接受兩次抗小鼠IL-12/IL-23 p40抗體(10 mg/kg)之腹膜腔內注射。

6.1.4. 疾病之評價

每日利用厚度規(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)量測兩隻耳朵之厚度。在實驗開始及處死時評價體重。在第5天，在最後一次投藥後2 h，將小鼠處死。切割耳廓，除去軟骨。對耳廓進行稱重且然後將其浸沒於含有1 mL RNAlater[®]溶液之小瓶中以評價基因表現或浸沒於福爾馬林(formalin)中用於組織學。

每組有14隻小鼠。結果表示為平均值± SEM，且使用單因子變異數分析(one-way ANOVA)隨後鄧奈特事後測試(Dunnett's post-hoc test)相對於咪喹莫特-媒劑組實施統計分析。

6.1.5. 組織學

在處死後，收集耳朵並於3.7%甲醛中進行固定，之後包埋於石蠟中。切割2 μm厚的切片，並用蘇木精及伊紅染色。藉由影像分析(SisNcom軟體)量測耳朵表皮厚度，且以20倍放大率捕獲6個影像/耳朵。數據表示為平均值± SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於咪喹莫特-媒劑組實施統計分析。

6.1.6. 基因表現分析

將耳朵自RNA^{later}[®]溶液取出並將其其在Precellys裝置中利用1.4 mm 陶瓷珠破裂之後置於Trizol[®]中。然後使用NucleoSpin[®] RNA套組純化總RNA。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於親環素A (cyclophilin A)管家基因表現程度計算每一基因(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8及S100A9)之表現程度。數據表示為相對量之平均值 $\pm$ SEM ($RQ = 2^{-\Delta C_T}$, 其中 $\Delta C_T = C_T$ 試樣- C_T 親環素A)。所用統計測試為相對於咪喹莫特-媒劑組之ANOVA變異數分析以及鄧奈特事後測試。

6.2. 皮內注射IL-23誘導之鼠類牛皮癬樣表皮增生模型

6.2.1. 材料

由e-Bioscience提供無載體小鼠重組IL-23 (14-8231, CF)。

6.2.2. 動物

自CERJ (France)獲得Balb/c小鼠(雌性, 18-20 g體重)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22°C, 隨意提供食物及水。

6.2.3. 研究設計

研究設計係根據Rizzo HL.等人(Rizzo等人2011)改編而成。

在第1天(D1), 在小鼠之兩隻耳朵周圍將剃毛。

對於連續4天(D1至D4), 在藉由吸入異氟烷誘導之麻醉下, 小鼠在右耳廓接受每日皮內劑量之小鼠重組IL-23 (1 μ g/20 μ L, 於PBS/0.1% BSA中)且在左耳廓接受20 μ L PBS/0.1% BSA。

自D1至D5, 在IL-23注射前的1 h, 利用測試化合物(10 mg/kg、30 mg/kg或100mg/kg, *p.o.*, *q.d.*, 於甲基纖維素0.5%中)或媒劑對小鼠投藥。

6.2.4. 疾病之評價

每日利用自動卡尺量測兩隻耳朵之厚度。在開始及處死時評價體重。在第5天，在最後一次投藥後2 h，將小鼠處死。切割耳廓，除去軟骨。對耳廓進行稱重，且然後，將其置於含有1 mL **RNAlater**[®] 溶液之小瓶或甲醛中。

在D4，在投藥前(T0)及投藥後1 h、3 h、6 h，亦自眼窩後鼻竇收集血液試樣用於PK描述。

每組有8隻小鼠。結果表示為平均值± SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於IL-23媒劑組實施統計分析。

6.2.5. 組織學

在處死後，收集耳朵並於3.7%甲醛中進行固定，之後包埋於石蠟中。製作2 μm厚的切片，且用蘇木精及伊紅染色。藉由影像分析(Sis'Ncom軟體)量測耳朵表皮厚度，且以20倍放大率捕獲6個影像/耳朵。數據表示為平均值± SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於IL-23媒劑組實施統計分析。

6.2.6. 基因表現分析

自**RNAlater**[®] 溶液去除一半耳朵並將其其在Precellys裝置中利用1.4 mm陶瓷珠破裂之後置於Trizol[®]中。然後使用NucleoSpin[®] RNA套組純化總RNA。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於親環素A管家基因表現程度計算每一基因(IL17A, IL1B, IL22, LCN2, S100A8及S100A9)之表現程度。數據表示為相對量之平均值值 ± SEM ($RQ = 2^{-\Delta C_T}$ ，其中 $\Delta C_T = C_{T\text{試樣}} - C_{T\text{親環素A}}$)。所用統計測試為相對

於IL-23媒劑組之ANOVA變異數分析以及鄧奈特事後測試。

6.3. PK/PD模型：由CL097(特定TLR7/8激動劑)誘導之TNF α 釋放

此分析之目的係確定在投與本發明化合物後對活體內IRAK-4依賴性事件之抑制與此化合物之循環濃度值之間的關係。

6.3.1. 材料

CL097 (目錄號 tlr1-c97) 及 poly(dT) (目錄號 tlr1-pt17) 係獲自 InvivoGen。

AlphaLISA[®]小鼠TNF α 套組係獲自Perkin-Elmer (目錄號AL505C)。

6.3.2. 動物

DBA/1J小鼠(雄性，18-20 g體重)係獲自Janvier Labs (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下，隨意提供食物及水。

6.3.3. 研究設計

小鼠接受口服劑量之測試化合物。使用未接受任一投藥之一組正常動物作為t=0時間點。

在投藥後30 min、1 h、3 h、8 h或24 h將藉由心臟內抽樣(在異氟烷麻醉下)獲得之兩個血液試樣收集至肝素鋰管中。一個試樣用於藥物動力學(PK)分析且另一個用於藥效動力學(PD)標記定量。

6.3.4. 血漿中化合物含量之定量

以5000 rpm將全血試樣離心10 min且在分析前將所得血漿試樣儲存於-20 $^{\circ}$ C下。藉由LC-MS/MS方法測定每一測試化合物之血漿濃度。

6.3.5. 藥物動力學參數之確定

使用WinNonlin[®] (Pharsight[®]，美國)計算藥物動力學參數。

6.3.6. PD 標記之定量

在37°C下用CL097及poly(dT)將每一血液試樣刺激2h。然後，收集血漿並藉由AlphaLISA根據製造商之說明來分析TNF α 。

每組有6隻小鼠。結果表示為TNF α 濃度(pg/mL)或表示為相對於t = 0時間點之抑制百分比(PIN)。數據表示為平均值 $\pm$ SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於相應時間點之媒劑組實施統計分析。

6.4. 藉由局部施用MC903誘導之鼠類異位性皮炎預防模型

6.4.1. 材料

甲基纖維素0.5%係獲自VWR (目錄號AX021233)。MC903 (卡泊三醇)係獲自Tocris Bioscience (目錄號2700/50)。ProSense[®] 680係獲自PerkinElmer (目錄號NEV10003)。RNAlater[®]係獲自Ambion (目錄號AM7021)。Imalgene[®] 1000 (Merial)及Rompun[®] 2% (Bayer)係獲自Centravet (目錄號IMA004-6827812及ROM001-6835444)。

6.4.2. 動物

BALB/cN小鼠(雌性, 18-20 g體重)或CD1/Swiss小鼠(雌性, 24-26 g體重)係獲自Janvier Labs (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22 $\pm$ 2°C下，隨意提供食物及水。

6.4.3. 研究設計

研究設計係根據Li M.等人(Li等人2006)改編而成。

在第一天(D1)，用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射(7.5% / 2.5% ; 0.1mL/10g)將小鼠麻醉並在兩隻耳朵周圍剃毛。

自D1起，將20 μ L EtOH或2 nmol MC903 (於20 μ L EtOH中)局部施加於小鼠之兩隻耳朵上達連續五天。

自D1至D8，利用測試化合物(15 mg/kg或30 mg/kg, *p.o.*, *b.i.d.*於甲基纖維素0.5%中)或地塞米松 (5 mg/kg, *p.o.*, *q.d.*於甲基纖維素0.5%中)或媒劑對小鼠進行投藥。

6.4.4. 血漿中化合物含量之定量

藉由LC-MS/MS方法測定血漿中每一測試化合物之濃度，其中以正性或負性電噴射模式操作質譜儀。

6.4.5. 藥物動力學參數之確定

使用Phoenix[®] WinNonlin[®] (Pharsight[®]，美國)計算藥物動力學參數。

6.4.6. 疾病之評價

在研究開始時、每隔一天及在處死時使用厚度規(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)量測兩隻耳朵之厚度(在藉由異氟烷吸入誘導之麻醉後)。

在研究開始時、每隔一天及在處死時評價體重。

在D4，所有組之小鼠皆接受ProSense[®] 680探針(0.8nmol/10g, IP)。
在D5，用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射(7.5% / 2.5%；0.1 mL/10g)將小鼠麻醉。使用活體內分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系統，激發波長：630nm, 發射波長：700nm，獲取時間：5秒)量測顆粒球浸潤。

在D8，在最後一次投藥後2 h，將小鼠處死且在塗佈EDTA之管上收集全血並冷凍血漿用於其他量測(包括循環化合物)。亦在塗佈肝素之管中收集血液之試樣。

收集耳朵之耳廓並稱重。將一隻耳朵縱向切成2半。一半在甲醛緩衝液4%中進行固定用於組織學；另一半浸沒於RNAlater[®]中以評價基因表現。

每組有8隻小鼠。結果表示為平均值 $\pm$ SEM且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於MC903媒劑組(對於耳朵厚度及重量)、相對於EtOH媒劑組(對於體重)實施統計分析。

6.4.7. 組織學

在處死後，收集一半耳朵並於3.7%甲醛中進行固定，之後包埋於石蠟中。藉由免疫組織化學利用特定細胞標記抗體(CD3用於T細胞且EPX用於嗜酸性球)對4 μ m厚的切片實施免疫染色。藉由影像分析(CaloPix軟體, TRIBVN Healthcare)量測每隻小鼠整個切片之免疫染色之細胞區域。數據表示為平均值 $\pm$ SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於MC903媒劑組實施統計分析。

6.4.8. 基因表現分析

將耳朵自RNAlater[®]溶液取出並將其於Bertin Instruments Precellys[®]均質器中利用1.4 mm陶瓷珠破裂後置於Trizol[®]中。然後使用苯酚/氯仿方案提取總RNA並利用QIAcube使用RNeasy[®] 96 QIAcube[®] HT套組(Qiagen, 目錄號74171)純化。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA 7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於HPRT、GAPDH及 β -肌動蛋白管家基因表現程度來計算每一基因(IL4、IL5、IL13、TSLP、IL33、ST2、IL25、IL31、IFN γ 、IL6、IL10、LCN2、S100A8及S100A9)之表現程度。數據表示為相對量之平均值 $\pm$ SEM ($RQ=2^{-\Delta C_T}$ ，其中 $\Delta C_T=C_T$ 試樣-平均(C_T HPRT, C_T GAPDH、 C_T β -肌動蛋白))。所用統計測試為相對於EtOH/MC903媒劑組之ANOVA變異數分析以及鄧奈特事後測試。

6.5. 藉由局部施用MC903誘導之鼠類異位性皮炎治療模型

6.5.1. 材料

甲基纖維素0.5%係獲自VWR (目錄號AX021233)。MC903 (卡泊三醇)係獲自Tocris Bioscience (目錄號2700/50)。ProSense[®] 680係獲自PerkinElmer (目錄號NEV10003)。RNA^{later}[®]係獲自Ambion (目錄號AM7021)。Imalgene[®] 1000 (Merial) 及 Rompun[®] 2% (Bayer) 係獲自Centravet (目錄號IMA004-6827812及ROM001-6835444)。

6.5.2. 動物

BALB/cN小鼠(雌性, 18-20g體重)或CD1/Swiss小鼠(雌性, 24-26g體重)係獲自Janvier Labs (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22± 2°C下, 隨意提供食物及水。

6.5.3. 研究設計

研究設計係根據Li M.等人(Li等人2006)改編而成。

在第一天(D1), 利用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射(7.5% / 2.5%; 0.1mL/10g)將小鼠麻醉且在兩隻耳朵周圍剃毛。

自D1起, 將20 µL EtOH或2 nmol MC903 (於20 µL EtOH中)局部施加於小鼠之兩隻耳朵上直至D9、D11或D15 (除了在週末期間)。

自D5, 利用測試化合物(15或30 mg/kg, *p.o.*, *b.i.d.*於甲基纖維素0.5%中)或地塞米松(5 mg/kg, *p.o.*, *q.d.*於甲基纖維素0.5%中)或媒劑對小鼠進行投藥, 直至D10、D12或D16。

6.5.4. 血漿中化合物含量之定量

藉由LC-MS/MS方法確定血漿中每一測試化合物之濃度, 其中以正性或負性電噴射模式操作質譜儀。

6.5.5. 藥物動力學參數之確定

使用Phoenix[®] WinNonlin[®] (Pharsight[®], 美國)計算藥物動力學參數。

6.5.6. 疾病之評價

在施用MC903前、在研究開始時、一週三次及在處死時使用厚度規(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)量測兩隻耳朵之厚度(在藉由異氟烷吸入誘導之麻醉後)。

在研究開始時、一週三次及在處死時評價體重。

在D8、D10或D11，所有群組之小鼠皆接受ProSense[®] 680探針(0.8 nmol/10g, IP)。第二天(D9、D11或D12)，用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射(7.5% / 2.5% ; 0.1 mL/10g)將小鼠麻醉。然後使用活體內分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系統，激發波長：630nm，發射波長：700 nm, 獲取時間：5秒)量測顆粒球浸潤。

在D10、D12或D16，在最後一次投藥後的2 h，將小鼠處死；在塗佈EDTA之管上收集全血並冷凍血漿用於其他量測(包括循環化合物)。

收集耳朵之耳廓。將一隻耳朵縱向切成2半。一半在甲醛緩衝液4%中進行固定用於組織學；另一半浸沒於RNAlater[®]中以評價基因表現。

每組有8隻小鼠。結果表示為平均值 $\pm$ SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於MC903媒劑組(對於耳朵厚度及重量)、相對於EtOH媒劑組(對於體重)實施統計分析。

6.5.7. 組織學

在處死後，收集一半耳朵並於3.7%甲醛中進行固定，之後包埋於石蠟中。藉由免疫組織化學利用抗CD3抗體對4 μ m厚的切片進行免疫染色。藉由影像分析(CalPix軟體, TRIBVN Healthcare)量測每隻小鼠整個切片之免疫染色之細胞區域。數據表示為平均值 $\pm$ SEM，且使用單因子變異數分

析隨後鄧奈特事後測試相對於MC903媒劑組實施統計分析。

6.5.8. 基因表現分析

將耳朵自RNAlater[®]溶液取出並將其其在Bertin Instruments Precellys[®]均質器中利用1.4 mm陶瓷珠破裂後置於Trizol[®]中。然後使用苯酚/氯仿方案提取總RNA並利用QIAcube使用RNeasy[®] 96 QIAcube[®] HT套組(Qiagen, 目錄號74171)進行純化。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於HPRT、GAPDH及β-肌動蛋白管家基因表現程度計算每一目標基因(GOI = IL4、IL5、IL13、TSLP、IL33、ST2、IL25、IL31、IFN γ 、IL6、IL10、LCN2、S100A8及S100A9)之表現程度。

所有qPCR數據皆表示為正規化相對量之平均值 $\pm$ SEM (NRQ = $2^{(\Delta Cq \text{ GOI})}/\text{Geomean} (2^{(\Delta Cq \text{ HPRT})}, 2^{(\Delta Cq \text{ GAPDH})}, 2^{(\Delta Cq \text{ } \beta\text{-肌動蛋白)})$), 其中 $\Delta Cq = Cq \text{ 平均值} - Cq \text{ 試樣}$ 。所用統計測試為相對於EtOH/MC903媒劑組之ANOVA變異數分析以及鄧奈特事後測試。

6.6. 藉由表皮施用咪喹莫特誘導之鼠類全身性紅斑狼瘡模型

6.6.1. 材料

Aldara[®] 5%咪喹莫特乳霜係獲自MEDA。

小鼠抗雙鏈DNA抗體ELISA套組係獲自Alpha Diagnostic International (目錄號5120)。小鼠尿白蛋白ELISA套組係獲自Abcam (目錄號ab108792)。尿肌酐分析套組係獲自Abnova (目錄號KA4344)。

6.6.2. 動物

BALB/cJ小鼠(雌性, 18-20 g體重)係獲自Janvier Labs (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 下, 隨

意提供食物及水。

6.6.3. 研究設計

研究設計係根據Yokogawa M.等人(Yokogawa等人2014)改編而成。

在第1天(D1)，在小鼠之右耳周圍剃毛。

小鼠一週3次在右耳廓接受1.25mg咪喹莫特之表皮施用達連續12週(D1至D86)。對照組接受相同量之凡士林。

自D1至D86，利用測試化合物(30 mg/kg, p.o., q.d.於甲基纖維素0.5%中)或媒劑(10 mL/kg)對小鼠進行投藥。

6.6.4. 疾病之評價

一週一次利用自動量規(Mitutoyo, Absolute Digimatic, 547-321)量測耳朵之厚度。

在開始時及一週一次評價體重直至處死。在驗屍時，亦量測脾臟重量。在最後一次投藥後的2 h將小鼠處死。

在不同時間點(例如，在D28天、D56天及D84天)，將小鼠個別地置於代謝籠中以實施尿分析並評價蛋白尿(白蛋白對肌酐比率)。

在不同時間點(例如，在D28、D56及D86)收集血清以評價抗雙鏈DNA IgG含量。

在D13，在即將投藥之前(T0)及投藥後1 h、3 h、6 h亦自眼窩後鼻竇收集血液試樣用於PK描述。

每組有8至19隻小鼠。結果表示為平均值±SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於咪喹莫特媒劑組實施統計分析。

6.6.5. 血漿中化合物含量之定量

藉由LC-MS/MS方法測定血漿中每一測試化合物之濃度，其中以正性

或負性電噴射模式操作質譜儀。

6.6.6. 藥物動力學參數之確定

使用Phoenix[®] WinNonlin[®] (Pharsight[®], 美國)計算藥物動力學參數。

6.6.7. 組織學

在處死後，收集左腎並將其縱向切成2個部分。一部分在3.7%甲醛中進行固定，之後包埋於石蠟中。製備4 μm 厚的切片且用過碘酸-希夫(Periodic acid -Schiff, PAS)進行染色或利用CD3 (T細胞)、CD20 (B細胞)及F4/80 (巨噬細胞)進行免疫染色。

6.6.7.1. 組織病理學

在每一腎絲球中，在0至2之等級上對4個不同的讀出(包括系膜增生、毛細管內增生、系膜基質擴展及節段性硬化症)進行分級且然後將其相加。對每一腎，對約50個腎小球進行評分且然後求平均，得到一個腎小球損傷分值(Yokogawa等人2014)。數據表示為平均值 $\pm$ SEM且使用克-瓦二氏測試(Kruskal-Wallis test)隨後鄧氏事後測試(Dunn's post-hoc test)相對於咪喹莫特媒劑組實施統計分析。

6.6.7.2. 細胞定量

對於每一細胞類型，使用影響分析(CaloPix軟體，TRIBVN Healthcare)對整個組織切片以20倍之放大率實施免疫組織化學分析。數據表示為平均值 $\pm$ SEM，且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於咪喹莫特媒劑組實施統計分析。

6.6.8. 基因表現分析

在處死時，將左腎之第二部分置於含有1.4 mm陶瓷珠之管中並利用Bertin Instruments Precellys[®]均質器在1% DTT RLT溶解緩衝液(Qiagen,

目錄號79216)中將其破裂。然後利用QIAcube使用RNeasy® 96 QIAcube® HT套組(Qiagen, 目錄號74171)純化總RNA。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於親環素、GAPDH及β-肌動蛋白管家基因表現程度計算每一目標基因(GOI = CD3、CD68、CD20、OAS1、Mx1、IFIT1、CXCL11及Usp18)之表現程度。

在處死時，將三分之一脾臟置於含有1.4 mm陶瓷珠之管中並利用Bertin Instruments Precellys®均質器在Trizol®中將其破裂。使用苯酚/氯仿製程提取總RNA且然後利用QIAcube使用RNeasy® 96 QIAcube® HT套組(Qiagen, 目錄號74171)純化。製備cDNA且使用SYBR Green技術在ViiA7實時PCR系統(Applied Biosystems)中利用來自Qiagen之基因特異性因子實施定量PCR。相對於親環素、GAPDH及β-肌動蛋白管家基因表現程度，計算每一目標基因(GOI = CD20、IRF7、OAS1、Mx1、IFIT1、CXCL11、Usp18、BCL6、CXCL13、CXCR5、MAF、ICOSL、PDCD1、SH2D1a)之表現程度。

所有qPCR數據皆表示為正規化相對量之平均值 $\pm$ SEM (NRQ = $2^{-(\Delta Cq \text{ GOI})/\text{Geomean}(2^{-(\Delta Cq \text{ 親環素})}, 2^{-(\Delta Cq \text{ GAPDH})}, 2^{-(\Delta Cq \text{ } \beta\text{-肌動蛋白)})}$), 其中 $\Delta Cq = Cq \text{ 平均值} - Cq \text{ 試樣}$ 。所用統計測試皆為相對於咪喹莫特媒劑組之ANOVA變異數分析以及鄧奈特事後測試。

6.7. 藉由IL-23之過表現誘導之鼠類牛皮癬性關節炎模型

6.7.1. 材料

小鼠IL-23增強之附加型表現載體(EEV)係獲自System Biosciences (目錄號EEV651A-1)。林格氏溶液(Ringers solution)錠劑係獲自

Sigma-Aldrich (目錄號96724-100TAB)。小鼠IL-23 Quantikine ELISA套組係獲自R&D Systems (目錄號M2300)。ProSense[®] 680及OsteoSense[®] 750EX 係獲自PerkinElmer (目錄號NEV10003及NEV10053EX)。RNA^{later}[®]係獲自Ambion (目錄號AM7021)。Imalgene[®] 1000 (Merial)及Rompun[®] 2% (Bayer) 係獲自Centravet (目錄號IMA004-6827812及ROM001-6835444)。

6.7.2. 動物

B10.RIII小鼠(雄性，8週齡)係獲自Charles River (France)。在12 h明/暗循環(07:00 - 19:00)下保持小鼠。將溫度維持在22± 2℃下，隨意提供食物及水。

6.7.3. 研究設計

研究設計係根據Sherlock JP.等人(Sherlock等人2012)改編而成。

在第一天(D1)，小鼠經歷Ringer或於Ringer中之IL-23 EEV流體注射至尾部靜脈中(3μg/2.1mL, IV注射達4-6 sec之時段)。

自D5起，一週兩次，對小鼠之臨床症狀進行評分直至實驗結束。

在D5，在頷下靜脈中藉由穿刺收集血液以評價血清中IL-23之濃度。

在D9，所有組之小鼠皆接受ProSense[®] 680探針(0.8nmol/10g, IP)。

在D10，利用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射將小鼠麻醉(7.5% / 2.5%；0.1 mL/10g)。然後使用活體內分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系統，激發波長：630 nm，發射波長：700 nm，獲取時間：5秒)量測顆粒球浸潤。

在D11，根據ProSense[®] 680分子成像及評分實施正規化。

自D12起，利用測試化合物(30 mg/kg, *p.o.*, *b.i.d.*於甲基纖維素0.5%

中)或煤劑對小鼠進行投藥。

在D19，在最後一次投藥後的T0、T1h、T3h及T6h對血液進行抽樣。分離血漿並保持在20℃下直至生物分析為止。

在D36，在最後一次投與化合物後的2 h將所有組之小鼠處死。收集以下各項：

- 立即將左後肢之足跟圍繞附著點(enthesis)(無皮膚)於Precellys管中速凍。將腳趾收集於含有RNAlater[®]之管中。立即在甲醛緩衝液4%中固定右後肢用於組織學評估。在固定後的48 h實施X射線量測。

- 將一隻耳朵收集於含有RNAlater[®]之管中用於轉錄分析。

- 在血清血管中收集全血並藉由輕輕顛倒8至10次進行混合。在凝固後，將血液試樣以1800 × g離心10 min。在離心後，在-80℃下儲存血清。

- 將結腸之一部分(1cm遠端結腸)在Precellys管中立即速凍用於轉錄分析。在甲醛緩衝液4%中立即固定另一部分(1 cm遠端結腸)以進行進一步組織學分析。

6.7.4. 疾病之評價

在研究開始時、然後一週兩次及在處死時評價體重。

每週兩次，對發炎之臨床體徵進行評分：正常爪為0；若一個趾腫脹，則為1；若兩個或更多個趾腫脹，則為2；若整個爪腫脹，則為3。將所有肢體之分值相加以產生總體分值。

在D23，所有組之小鼠皆接受ProSense[®] 680探針(0.8nmol/10g, IP)。在D24，利用Imalgene及Rompun之腹膜腔內注射將小鼠麻醉(7.5% / 2.5%；0.1 mL/10g)。然後使用活體內分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系統，激發波長：630nm，發射波長：700nm，獲取時間：5秒)量測顆

粒球浸潤。

在D32，所有組之小鼠皆接受ProSense[®] 680探針(0.8nmol/10g, IP)及OsteoSense[®] 750EX探針(0.8nmol/10g, IP)。在D33，利用Imalgene及Rompun之腹腔腔內注射(7.5% / 2.5%；0.1 mL/10g)將小鼠麻醉。使用活體內分子成像(Bruker In-Vivo Xtreme成像系統；激發波長：630 nm，發射波長：700 nm，獲取時間：對於ProSense[®] 680探針5秒；激發波長：720 nm，發射波長：790 nm，獲取時間：對於OsteoSense[®] 750EX探針5秒)量測顆粒球浸潤及骨重塑。

每組有10隻小鼠。結果表示為平均值 $\pm$ SEM且使用單因子變異數分析隨後鄧奈特事後測試相對於患病媒劑組針對評分及影像分析、相對於假媒劑組針對體重來實施統計分析。

最後註解

熟習此項技術者應瞭解，前述闡述實際上具有例示性及解釋性，且意欲闡釋本發明及其較佳實施例。藉助常規實驗，熟習此項技術者將意識到在不背離本發明之精神下可作出明顯修改及變化。在隨附申請專利範圍之範圍內之所有該等修改皆意欲包括在本文內。因此，本發明並非意欲藉由上文闡述來定義，而是藉由以下申請專利範圍及其等效形式來定義。

此說明書中引用之所有公開案(包括(但不限於)專利及專利申請案)皆以引用方式併入本文中，如同每一個別公開案特別且個別指示如完全闡述以引用方式併入本文中一般。

應瞭解，諸如多種化合物之差示細胞滲透能力等因素可促成活體外生物化學及細胞分析中之化合物活性間的差異。

如本申請案中所給出及闡述之本發明化合物的至少某些化學名稱可

藉由使用市售化學品命名軟體程式自動生成，但未經獨立驗證。實施此功能之代表性程式包括由OpenEye Scientific Software, Inc.出售之Lexichem命名工具及由MDL Information Systems, Inc出售之Autonom Software工具。在所指示化學名稱及所繪示結構不同之情況下，以所繪示結構為準。

參考文獻

Bain J等人2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.***371**, 199-204。

Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM. 2005. Rapid Production of TNF- α following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *J. Immunol.***175**, 5043-5049。

Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. 2011. Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World J. Clin. Oncol.***2**, 80-93。

Bundgaard H. 1985. *Design of prodrugs*, Elsevier。

Carmi Y等人2013. The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *J. Immunol.***190**, 3500-3509。

Chiang EY, Yu X, Grogan JL. 2011. Immune Complex-Mediated Cell Activation from Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Patients Elaborate Different Requirements for IRAK1/4 Kinase Activity across Human Cell Types. *J. Immunol.***186**, 1279-1288。

Cohen P. 2009. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 317-324。

Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases.

*Nat. Rev. Drug Discov.***11**, 633-652 。

Dy GK, Adjei AA. 2013. Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA. Cancer J. Clin.***63**, 249-279 。

Fabian MA等人2005. A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.***23**, 329-336 。

van der Fits L等人2009. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.***182**, 5836-5845 。

Force T, Kolaja KL. 2011. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 111-126 。

Koziczak-Holbro M等人2009. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor–associated kinase 4 in animal models of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* **60**, 1661-1671 。

Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM. 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 α -dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.***86**, 769-778 。

Li D等人2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.***134**, 1422–1432.e11 。

Li M等人2006. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.***103**, 11736-11741 。

Li S等人2002. IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***99**, 5567-5572。

Li Z 等人 2015. Inhibition of IRAK1/4 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia to chemotherapies. *J. Clin. Invest.***125**, 1081-1097。

McHedlidze T等人2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity***39**, 357-371。

Nabe T. 2014. Interleukin(IL)-33: New Therapeutic Target for Atopic Diseases. *J. Pharmacol. Sci.***126**, 85-91。

Ngo VN等人2011. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature***470**, 115-119。

Rankin AL 等人 2010. IL-33 Induces IL-13–Dependent Cutaneous Fibrosis. *J. Immunol.***184**, 1526-1535。

Rhyasen GW, Starczynowski DT. 2015. IRAK signalling in cancer. *Br. J. Cancer***112**, 232-237。

Ringwood L, Li L. 2008. The involvement of the interleukin-1 Receptor-Associated Kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine***42**, 1-7。

Rizzo HL 等人 2011. IL-23-Mediated Psoriasis-Like Epidermal Hyperplasia Is Dependent on IL-17A. *J. Immunol.***186**, 1495-1502。

Salimi M等人2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.***210**, 2939-2950。

Sherlock JP等人2012. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.***18**, 1069-1076。

Staschke KA等人2009. IRAK4 Kinase Activity Is Required for Th17 Differentiation and Th17-Mediated Disease. *J. Immunol.***183**, 568-577。

Sundberg TB等人2014. Small-molecule control of cytokine function: new opportunities for treating immune disorders. *Curr. Opin. Chem. Biol.***23**, 23-30。

Treon SP 等 人 2012. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.***367**, 826-833。

Vidal-Vanaclocha F 等 人 2000. IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.***97**, 734-739。

Wang Z等人2009. IRAK-4 Inhibitors for Inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.***9**, 724-737。

Wuts PGM, Greene TW. 2006. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*第4版, Wiley-Interscience。

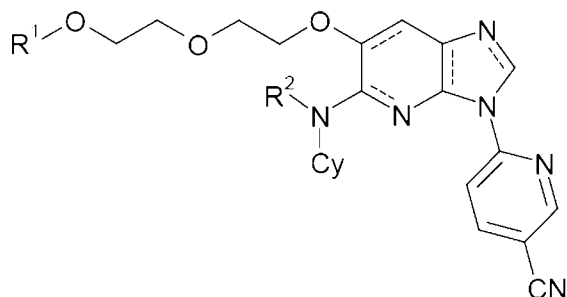
Yan C等人2012. C5a-regulated CCAAT/Enhancer-binding Proteins β and δ Are Essential in Fc γ Receptor-mediated Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *J. Biol. Chem.***287**, 3217-3230。

Yokogawa M 等 人 2014. Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. **66**, 694-706。

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種式I化合物，



I

其中

Cy係

單環C₃₋₇環烷基，其視情況經一或多個獨立地選擇之R³取代，或

4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子，且視情況經一或多個獨立地選擇之R³取代；

R¹係

H，

-SO₃H，

-P(=O)(OH)₂，

C₁₋₄烷基，

-C(=O)- (包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子之4至7員單環雜環烷基)，或

-C(=O)C₁₋₆烷基，該C₁₋₆烷基視情況經一或多個獨立地選擇之R⁴基團取代；

R²係H或C₁₋₄烷基；

每一R³獨立地選自：

OH，

=O，

鹵基，及

C₁₋₄烷基；

每一R⁴獨立地選自：

-NR^{5a}R^{5b}，

-C(=O)OH，

4至7員單環雜環烷基，其包含一或兩個獨立地選自N、S及O之雜原子且視情況經一或多個獨立地選擇之C₁₋₄烷基取代，及

-NHC(=O)-C₁₋₄烷基-NH₂；且

R^{5a}及R^{5b}獨立地為H或C₁₋₄烷基；

或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物或溶劑合物之鹽。

【第2項】

如請求項1之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中Cy係經一或兩個獨立地選擇之R³取代之單環C₃₋₇環烷基。

【第3項】

如請求項1或2之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中Cy係四氫吡喃基或四氫硫吡喃基，其每一者視情況經一或兩個獨立地選擇之R³取代。

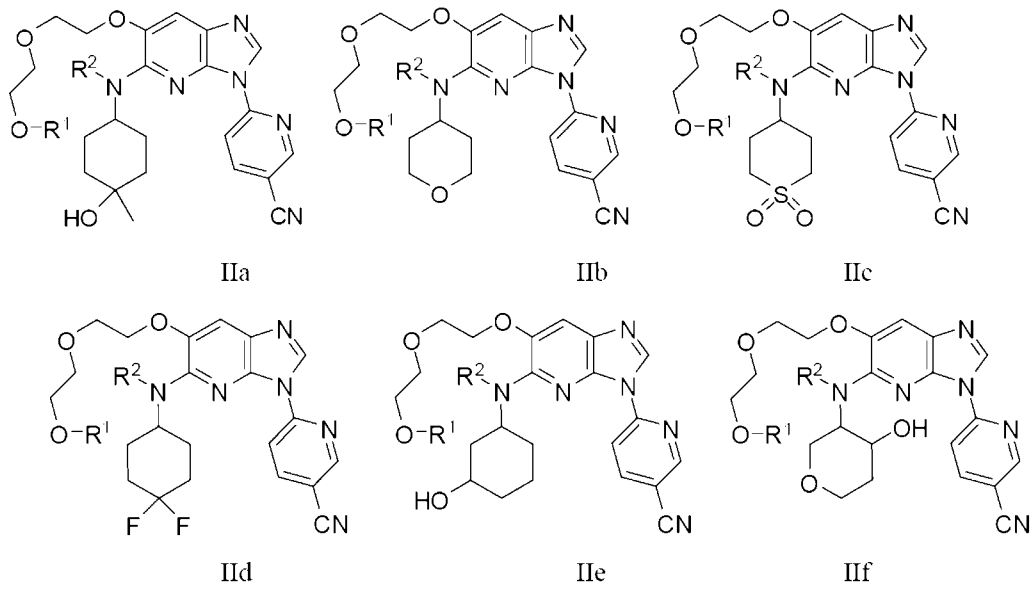
【第4項】

如請求項1至3中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中R³係選自OH、=O、F及-CH₃。

【第5項】

如請求項1之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中該化合物符合式

IIa、IIb、IIc、IIe或IIf：



【第6項】

如請求項1至5中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中R¹係H、-CH₃、-SO₃H或-P(=O)(OH)₂。

【第7項】

如請求項1至5中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中R¹係-C(=O)C₁₋₆烷基，該C₁₋₆烷基經一或兩個獨立地選擇之R⁴取代。

【第8項】

如請求項1至5中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中R¹係-C(=O)C₁₋₆烷基，該C₁₋₆烷基經一或兩個獨立地選擇之-C(=O)OH、-NH₂、-NHCH₃或-N(CH₃)₂取代。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中R²係H或-CH₃。

【第10項】

如請求項1之化合物或其醫藥上可接受之鹽，其中該化合物係選自：

6-[6-[2-(2-羥基-乙氧基)-乙氧基]-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-咪唑并[4,5-b]吡啶-3-基]-菸鹼甲腈，及

(S)-2-胺基-3-甲基-丁酸2-{2-[3-(5-氰基-吡啶-2-基)-5-(四氫-吡喃-4-基胺基)-3H-咪唑并[4,5-b]吡啶-6-基氧基]-乙氧基}-乙基酯。

【第11項】

一種醫藥組合物，其包含醫藥上可接受之載劑及醫藥有效量之如請求項1至10中任一項之化合物或其醫藥上可接受之鹽。

【第12項】

如請求項11之醫藥組合物，其包含另一治療劑。

【第13項】

如請求項12之醫藥組合物，其中該另一治療劑係用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病之藥劑。

【第14項】

如請求項1至10中任一項之化合物或醫藥上可接受之鹽或如請求項11至13中任一項之醫藥組合物，其用於醫藥中。

【第15項】

如請求項1至10中任一項之化合物或醫藥上可接受之鹽或如請求項11至13中任一項之醫藥組合物，其用於預防及/或治療發炎疾病、自體免疫疾病及/或增生性疾病。