

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96114175

C07D 31/46 (2006.01)

※申請日期：96.4.23

※IPC 分類：C07D; A61K

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

具有 $\beta 2$ 腎上腺素受體激動劑及毒蕈鹼受體拮抗劑活性之二烷基苯基化合物

DIALKYLPHENYL COMPOUNDS HAVING $\beta 2$ ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND MUSCARINIC RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商施萬製藥

THERAVANCE, INC.

代表人：(中文/英文)

傑佛瑞 A 荷根漢

HAGENAH, JEFFREY A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州南舊金山市林蔭大道 901 號

901 GATEWAY BOULEVARD SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080

U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 彼瑞 珍 寇森
COLSON, PIERRE-JEAN
2. 麥洛史夫 瑞帕達
RAPTA, MIROSLAV
3. 亞當 D 休斯
HUGHES, ADAM D.
4. 柯瑞格 豪斯菲
HUSFELD, CRAIG
5. 瑪莎 瑪緬
MAMMEN, MATHAI

國 籍：(中文/英文)

1. 法國 FRANCE
2. 斯洛伐克 SLOVAK REPUBLIC
3. 英國 U.K.
4. 美國 U.S.A.
5. 加拿大 CANADA

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006 年 04 月 25 日；60/794,702

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎二烷基苯基化合物，其具有 β_2 腎上腺素能激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性。本發明亦關於包含此種化合物之醫藥組合物，製備此種化合物之方法與中間物，及使用此種化合物以治療例如肺病之方法。

【先前技術】

肺病，譬如氣喘與慢性阻塞肺病(COPD)，一般係以枝氣管擴張藥治療。用以治療肺病之枝氣管擴張藥之一種類型，係包括 β_2 腎上腺素能受體(腎上腺素受體)激動劑，譬如舒喘寧(albuterol)、弗莫特醇(formoterol)及沙美特醇(salmeterol)。此等化合物一般係藉吸入投藥。枝氣管擴張藥之另一種類係包括毒蕈鹼受體拮抗劑(抗膽鹼能化合物)，譬如依普拉嗒品(ipratropium)與提歐多平(tiotropium)。此等化合物典型上亦藉吸入投藥。

含有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑之組合之醫藥組合物，係為此項技藝中已知，用於治療肺病。例如，2002年8月13日頒予之美國專利6,433,027，揭示藥劑組合物，其含有毒蕈鹼受體拮抗劑，譬如溴化提歐多平(tiotropium bromide)，與 β_2 腎上腺素能受體激動劑，譬如弗莫特醇(formoterol)反丁烯二酸鹽。

此外，具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性兩者之化合物係為此項技藝中已知。例如，2006年11月28日頒予之美國專利7,141,671，揭示具有 β_2 腎上腺素能

受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性兩者之聯苯基化合物。同時具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性之化合物係為高度期望的，因為此種化合物係經過兩種獨立作用模式提供枝氣管擴大，而同時具有單一分子藥物動力學。

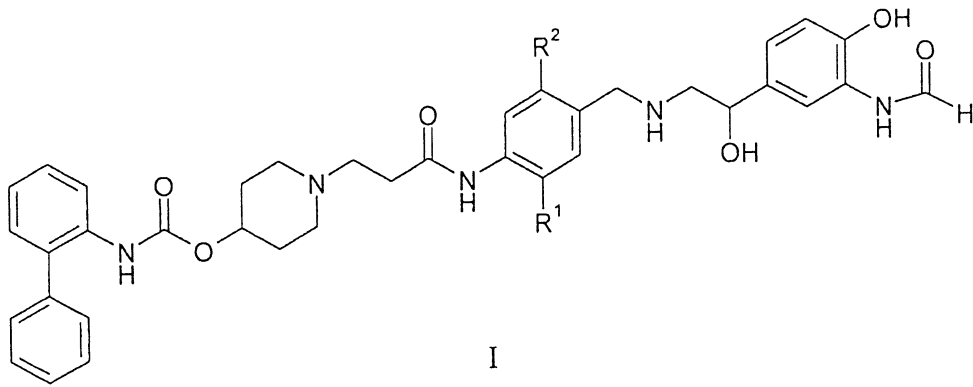
當治療肺病時，其係特別可用以提供治療劑，當藉吸入投藥時，其具有長作用期，意即至少約24小時之延續時間，因此病患僅需要投予治療劑一天一次或較少。並非所有先前於此項技藝中所揭示之雙作用化合物均具有此期望性質。

因此，仍需要具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性兩者之新穎化合物，當藉吸入投予病患時，其具有長作用期。

【發明內容】

本發明係提供具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性兩者之新穎二烷基苯基化合物。在其他性質中，當藉吸入投予哺乳動物時，已發現本發明之化合物具有長作用期，意即至少約24小時之延續時間。因此，預期本發明化合物係有用且有利地作為治療肺病之治療劑。

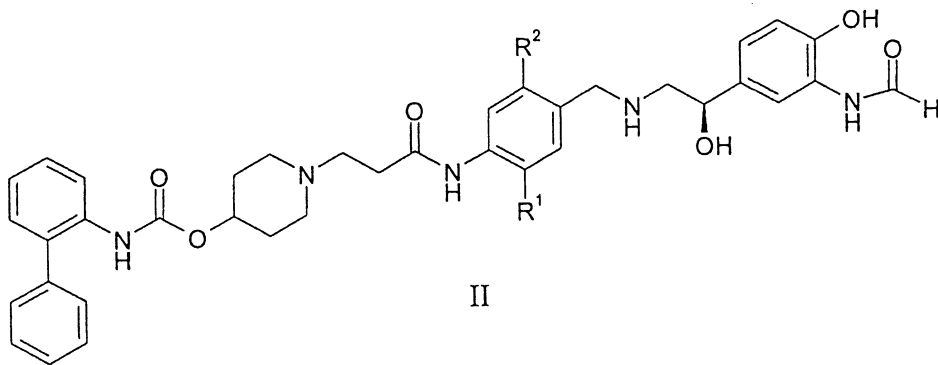
因此，在本發明組合物之一方面，係關於式I化合物：



其中

R^1 為甲基或乙基； R^2 為甲基或乙基；或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物或立體異構物。

於本發明之特定方面，式 I 化合物係為具有式 II 之化合物：



其中 R^1 與 R^2 均如本文定義(包括任何特定或較佳具體實施例)；或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

在本發明組合物之另一方面，係關於一種醫藥組合物，其包含藥學上可接受之載劑與式 I 化合物。

若需要，則本發明化合物可與其他治療劑合併投藥，譬如類固醇消炎劑。因此，在本發明組合物之另一方面，係關於一種醫藥組合物，其包含(a)式 I 化合物；與(b)第二種治療劑。於本發明組合物之又另一方面，係關於一種醫藥

組合物，其包含(a)式I化合物；(b)第二種治療劑；及(c)藥學上可接受之載劑。

於本發明組合物之又再另一方面，係關於治療劑之組合，此組合包含(a)式I化合物；與(b)第二種治療劑。在本發明組合物之另一方面，係關於醫藥組合物之組合，此組合包含(a)第一種醫藥組合物，其包含式I化合物與第一種藥學上可接受之載劑；與(b)第二種醫藥組合物，其包含第二種治療劑與第二種藥學上可接受之載劑。本發明亦關於含有此種醫藥組合物之套件。

本發明化合物同時具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑活性與毒蕈鹼受體拮抗劑活性。因此，預期式I化合物可作為治療劑使用，以治療肺病，譬如氣喘與慢性阻塞肺病。

因此，在本發明方法之一方面，係關於一種治療肺病之方法，此方法包括對需要治療之病患投予治療上有效量之式I化合物。本發明亦關於治療慢性阻塞肺病或氣喘之方法，此方法包括對病患投予治療上有效量之式I化合物。此外，在本發明方法之另一方面，係關於一種在哺乳動物中產生支氣管擴大作用之方法，此方法包括對哺乳動物投予支氣管擴大作用產生量之式I化合物。本發明亦關於一種在哺乳動物中拮抗毒蕈鹼受體且催動 β_2 腎上腺素能受體之方法，此方法包括對該哺乳動物投予式I化合物。

由於本發明化合物同時具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑活性與毒蕈鹼受體拮抗劑活性，故此種化合物亦可作為研究工具使用。因此，在本發明方法之又另一方面，係關於一

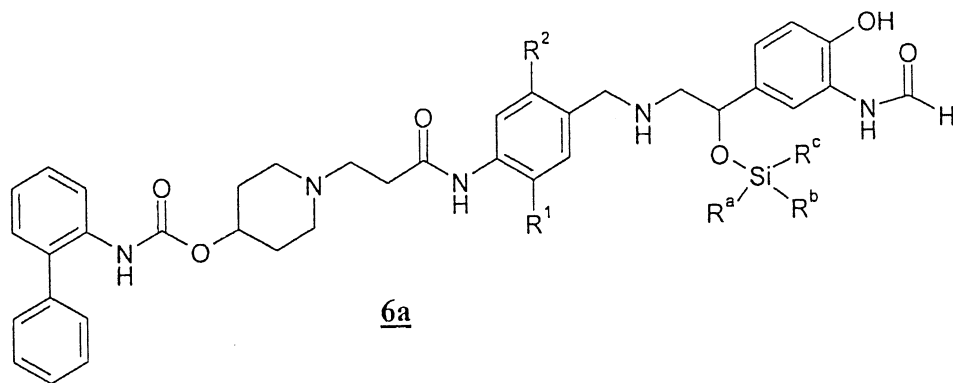
種使用式I化合物作為研究工具之方法，此方法包括使用式I化合物進行生物學檢測。

本發明化合物亦可用以評估新穎化學化合物。因此，於本發明方法之另一方面，係關於一種在生物學檢測中評估待測化合物之方法，此方法包括：(a)以待測化合物進行生物學檢測，以提供第一個檢測值；(b)以式I化合物進行生物學檢測，以提供第二個檢測值；其中步驟(a)係無論是在步驟(b)之前、之後或同時進行；及(c)將得自步驟(a)之第一個檢測值與得自步驟(b)之第二個檢測值作比較。

本發明亦關於可用於製備式I化合物之方法與新穎中間物。因此，於本發明方法之另一方面，係關於一種製備式I化合物之方法，此方法包括使式6化合物(如本文定義)去除保護，以提供式I化合物。

於本發明方法之另一方面，係關於一種製備式I化合物之方法，此方法包括：(a)使式4化合物與式5化合物，於還原劑存在下反應，以提供式6化合物；與(b)使式6化合物去除保護，以提供式I化合物；其中4、5及6化合物均如本文定義。

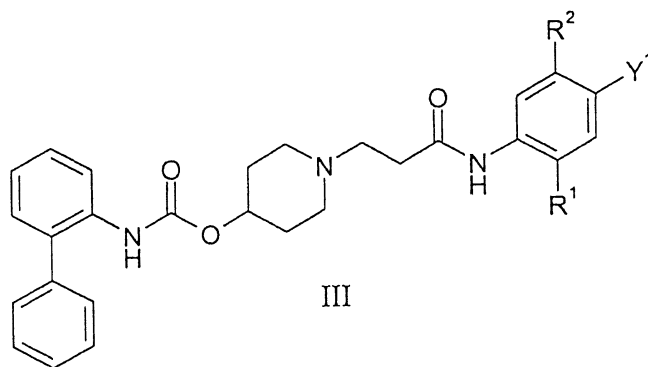
在本發明之一項特定具體實施例中，式I化合物係經由使式6化合物去除保護而製成，其中羥基保護基為矽烷基。因此，在本發明方法之又另一方面，係關於一種製備式I化合物之方法，此方法包括使式6a化合物去除保護：



其中 R^a 、 R^b 及 R^c 係獨立選自 C_{1-4} 烷基、苯基、 $-C_{1-4}$ 烷基-(苯基)，或 R^{1a} 、 R^{1b} 及 R^{1c} 之一為 $-O-(C_{1-4}$ 烷基)；以提供式 I 化合物。

在其他具體實施例中，本文中所述之方法進一步包括形成式 I 化合物之藥學上可接受鹽之步驟。在其他具體實施例中，本發明係關於本文中所述之其他方法；及藉任何本文中所述方法所製成之產物。

在一項特定具體實施例中，本發明係關於式 III 化合物：



或其鹽或立體異構物，其中 Y^1 係選自 $-CHO$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^{3c}$ 、溴基及碘基，其中 R^{3a} 與 R^{3b} 係獨立選自 C_{1-6} 烷基，或 R^{3a} 與 R^{3b} 係接合而形成 C_{2-6} 次烷基， R^{3c} 係選自 C_{1-6} 烷基；且 R^1 與 R^2 均如本文定義(包括任何特定或較佳具體實施例)，該化合物可在製備式 I 化合物上作為中間物使用。在式 III 之一項特定具體實施例中，

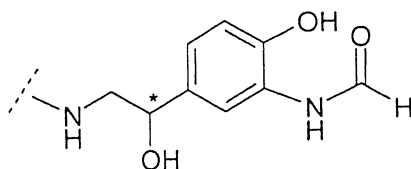
R^1 與 R^2 為甲基。在式 III 之另一項特定具體實施例中， Y^1 為 -CHO。在式 III 之又另一項特定具體實施例中， R^1 與 R^2 為甲基，且 Y^1 為 -CHO。

本發明亦關於式 I 化合物於療法上之用途。此外，本發明係關於式 I 化合物於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療肺病；及式 I 化合物作為研究工具之用途。本發明之其他方面與具體實施例係揭示於本文中。

發明詳述

在本發明組合物之一方面，係關於新穎式 I 化合物。式 I 化合物含有一或多個對掌中心，因此本發明係針對外消旋混合物；純立體異構物（意即對掌異構物或非對映異構物）；富含立體異構物之混合物等，除非另有指出。當於本文中顯示或指稱一種特定立體異構物時，熟諳此藝者應明瞭的是，除非另有指出，否則較少量之其他立體異構物可存在於本發明之組合物中，其條件是此組合物整體之利用性不會因為此種其他異構物之存在而被消除。

特定言之，式 I 化合物含有一個對掌中心在下列部份化學式中藉由符號 * 所指示之碳原子處：



在本發明之一項特定具體實施例中，藉由符號 * 所確認之碳原子具有 (R) 組態。在此具體實施例中，式 I 化合物係具有 (R) 組態在藉由符號 * 所確認之碳原子處，或富含在此

碳原子處具有(R)組態之立體異構物形式。

式I化合物亦含有數個鹼性基團(例如胺基)，因此式I化合物可以自由態鹼或各種鹽形式存在。所有此種形式均被包含在本發明之範圍內。再者，式I化合物或其鹽之溶劑合物，均被包含在本發明之範圍內。

因此，熟諳此藝者將明瞭的是，指稱本文之化合物，例如指稱式I化合物或化合物6，係包括指稱該化合物之鹽與立體異構物及溶劑合物，除非另有指出。

此外，於本文中使用的單數形式"一種"、"一個"及"該"係包括其相應之複數形式，除非使用之內文明明白地另有指述。

於本文中用以指稱本發明化合物及其中間物之命名法，已一般性地使用市購可得之AutoNom軟體(MDL, San Leandro, California)衍生。典型上，式I化合物已被指稱為聯苯-2-基胺甲基酸之六氫吡啶-4-基酯衍生物。

代表性具體實施例

下列取代基與意義係意欲提供本發明之各方面與具體實施例之代表性實例。此等代表性意義係意欲進一步定義與說明此等方面與具體實施例，並不意欲排除其他具體實施例，或限制本發明之範圍。關於此點，一種特定意義或取代基係為較佳之描述，並不意欲以任何方式將其他意義或取代基自本發明排除在外，除非明確指示。

於一項具體實施例中， R^1 為甲基，且 R^2 為甲基。

於另一項具體實施例中， R^1 為乙基，且 R^2 為乙基。

於另一項具體實施例中， R^1 為甲基，且 R^2 為乙基。

於另一項具體實施例中， R^1 為乙基，且 R^2 為甲基。

因此，在本發明組合物之一方面，係關於式I化合物，選自：

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

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二乙基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(化合物 IIb)；

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

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

或其藥學上可接受之鹽。

定義

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

"烷基"一詞係指單價飽和烴基，其可為線性或分枝狀。除非另有定義，否則此種烷基典型上含有1至10個碳原子。代表性烷基，舉例言之，係包括甲基、乙基、正-丙基、異丙基、正-丁基、第二-丁基、異丁基、第三-丁基、正-戊基、

正-己基、正-庚基、正-辛基、正-壬基、正-癸基等。

當對於本文中使用的特定術語意欲一特定碳原子數時，碳原子數係緊接在此術語前顯示。例如，"C₁₋₃烷基"一詞係意謂具有1至3個碳原子之烷基，其中碳原子係呈任何化學上可接受之組態。

"次烷基"一詞係指二價飽和烴基，其可為線性或分枝狀。除非另有定義，否則此種次烷基典型上含有1至10個碳原子。代表性次烷基，舉例言之，係包括亞甲基、乙烷-1,2-二基("次乙基")、丙烷-1,2-二基、丙烷-1,3-二基、丁烷-1,4-二基、戊烷-1,5-二基等。

"胺基保護基"一詞係意謂適合在胺基處預防不想要反應之保護基。代表性胺基保護基，包括但不限於第三-丁氧羰基(BOC)、三苯甲基(Tr)、苄氧羰基(Cbz)、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)、苄基、甲醯基、三甲基矽烷基(TMS)、第三-丁基二甲基矽烷基(TBS)等。

"羧基保護基"一詞係意謂適合在羧基處預防不想要反應之保護基。代表性羧基保護基，包括但不限於酯類，譬如甲基、乙基、第三-丁基、苄基(Bn)、對-甲氧基苄基(PMB)、9-芴基甲基(Fm)、三甲基矽烷基(TMS)、第三-丁基二甲基矽烷基(TBS)、二苯甲基(二苯甲基，DPM)等。

於本文中使用的"本發明化合物"或"式I化合物"或"式II化合物"術語，係意謂所指定之化合物，或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物或立體異構物，除非另有指出。

"鹵基"一詞係意謂氟基、氯基、溴基及碘基。

"羥基保護基"一詞係意謂適合在羥基處預防不想要反應之保護基。代表性羥基保護基，包括但不限於矽烷基，包括三((C₁₋₆烷基)矽烷基，譬如三甲基矽烷基(TMS)、三乙基矽烷基(TES)、第三-丁基二甲基矽烷基(TBS)等；酯類(鹽基)，包括C₁₋₆烷鹽基，譬如甲鹽基、乙鹽基等；芳甲基，譬如苄基(Bn)、對-甲氧基苄基(PMB)、9-芴基甲基(Fm)、二苯甲基(二苯甲基，DPM)等。此外，兩個羥基亦可被保護成亞烷基，譬如亞丙-2-基，例如經由與酮譬如丙酮之反應而形成。

"脫離基"一詞係意謂可在取代反應譬如親核性取代反應中，被另一種官能基或原子置換之官能基或原子。舉例言之，代表性脫離基包括氯基、溴基及碘基；磺酸酯基，譬如甲烷磺酸酯、甲苯磺酸酯、溴磺酸酯、壬烷磺酸酯等；及鹽氧基，譬如乙鹽氧基、三氟乙鹽氧基等。

"質量中間值直徑"或"MMD"術語，當用以指粒子時，係意謂直徑，以致使一半粒子之質量係被包含在具有較大直徑之粒子中，而一半係被包含在具有較小直徑之粒子中。

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

於本文中使用的"或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物或立體異構物"一詞，係意欲包括鹽、溶劑合物及立體異構物之所有替換物，譬如式I化合物之立體異構物之藥學上可接受鹽之溶劑合物。

"藥學上可接受之鹽"一詞係意謂可接受用於投予病患譬

如哺乳動物之鹽(例如對特定劑量服用法具有可接受之哺乳動物安全性之鹽)。代表性藥學上可接受之鹽包括醋酸、抗壞血酸、苯磺酸、苯甲酸、樟腦磺酸、檸檬酸、乙烷磺酸、乙烷二磺酸、反丁烯二酸、龍膽酸、葡萄糖酸、醛糖酸、麩胺酸、馬尿酸、氫溴酸、鹽酸、羥乙磺酸、乳酸、乳基生物酸、順丁烯二酸、蘋果酸、苯乙醇酸、甲烷磺酸、黏酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸、菸鹼酸、硝酸、乳清酸、雙羥萘酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、對-甲苯磺酸及愛克辛那弗酸等之鹽。

"其經保護之衍生物"一詞係意謂特定化合物之衍生物，其中該化合物之一或多個官能基係被保護或阻斷基團保護或阻斷，而免於遭受不想要之反應。可被保護之官能基，舉例言之，係包括羧酸基、胺基、羥基、硫醇基、羰基等。對此種官能基之適當保護基係為一般熟諳此項技藝者所習知，如以 T. W. Greene 與 G. M. Wuts, 有機合成上之保護基，第三版，Wiley, New York, 1999 及其中所引述參考資料中之陳述內容為例。

"其鹽"一詞係意謂當酸之氫被陽離子置換時所形成之化合物，該陽離子譬如金屬陽離子或有機陽離子等。於本發明中，陽離子典型上係包含式 I 化合物之質子化形式，意即其中一或多個胺基已被酸質子化。此鹽較佳為藥學上可接受之鹽，惟這對並非欲供投予病患之中間化合物之鹽並不需要。

"溶劑合物"一詞係指藉由一或多個分子之溶質，意即式 I

化合物或其藥學上可接受之鹽，與一或多個分子之溶劑，所形成之複合物或聚集體。此種溶劑合物典型上為結晶性固體，具有實質上固定莫耳比之溶質與溶劑。代表性溶劑，舉例言之，係包括水、甲醇、乙醇、異丙醇、醋酸等。當溶劑為水時，所形成之溶劑合物為水合物。

"治療上有效量"一詞，係指當被投予需要治療之病患時，足以達成治療之量。

於本文中使用之"進行治療"或"治療作業"一詞，係指在病患譬如哺乳動物(特別是人類)中之疾病或醫療症狀之進行治療或治療作業(譬如 COPD)，其包括：

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

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

一般合成程序

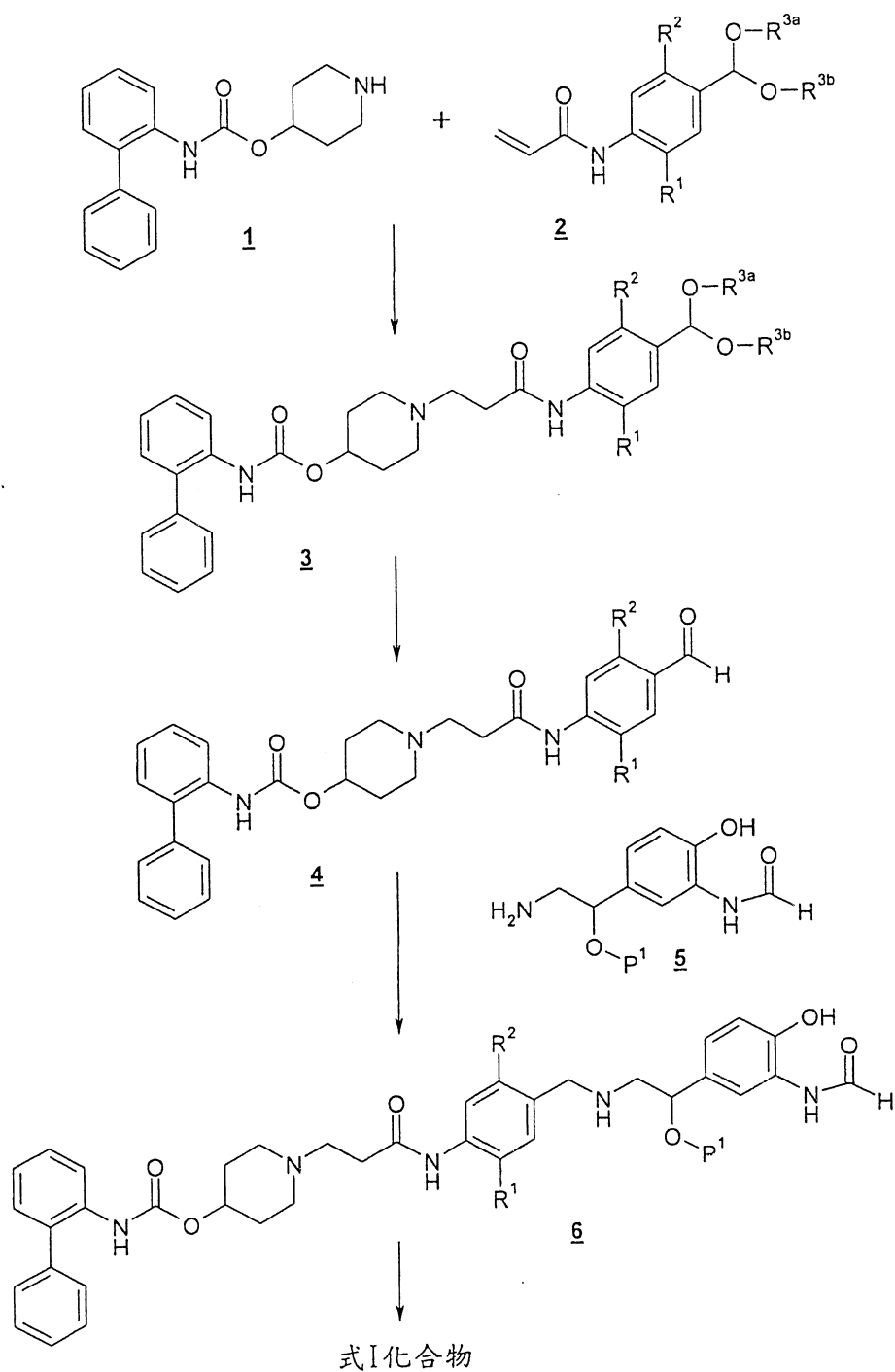
本發明之化合物可使用下述一般方法與程序，或利用一般熟諳此藝者易於取得或所已知之其他資訊，製自易於取得之起始物質。雖然下述程序可說明本發明之特定具體實施例或方面，但熟諳此藝者將明瞭本發明之其他具體實施例或各方面可使用相同或類似方法，或利用熟諳此藝者所

已知之其他方法、試劑及起始物質製備。亦應明瞭的是，在給予典型或較佳處理條件(意即反應溫度、時間、反應物之莫耳比、溶劑、壓力等)之情況下，其他處理條件亦可使用，除非另有述及。雖然最適宜反應條件典型上將依各種參數而改變，譬如所使用之反應物、溶劑及量，但一般熟諳此藝者可容易地使用例行最佳化程序測定適當反應條件。

此外，正如熟諳此藝者所明瞭，習用保護基可能是必須或想要的，以防止某些官能基遭受不想要之反應。對特定官能基之適當保護基之選擇，以及關於此種官能基之保護與去除保護之適當條件與試劑，係為此項技藝中所習知。若需要，可使用本文所述程序中所示者以外之保護基。

於一項具體實施例中，式I化合物係如圖式I中所示合成而得：

圖式 I



其中 P^1 為羥基保護基；且 R^{3a} 與 R^{3b} 係獨立選自 C_{1-6} 烷基，或 R^{3a} 與 R^{3b} 係接合而形成 C_{2-6} 次烷基。

如圖式 I 中所示，化合物 **1** 可與約 0.95 至約 1.05 莫耳當量之化合物 **2** 反應，以提供化合物 **3**。此 Michael 反應典型上係在

約 0°C 至約 75°C，典型上為約 40°C 至約 45°C 範圍之溫度下進行約 8 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如二氯甲烷，或二氯甲烷與甲醇或乙醇之混合物等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離產物，譬如萃取、再結晶作用、層析等。或者，含有化合物 3 之反應混合物可直接使用於合成之下一步驟中。

化合物 3 係接著與含水酸反應，以使縮醛基水解，並提供醛化合物 4。任何適當酸可被採用於此反應中，舉例言之，係包括鹽酸、硫酸、甲烷磺酸、對-甲苯磺酸等。此水解反應典型上係在約 0°C 至約 30°C，典型上為約 20°C 至約 25°C 範圍之溫度下，進行約 1 至約 6 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲醇、乙醇、異丙醇、二氯甲烷/乙醇、乙腈等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離產物，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

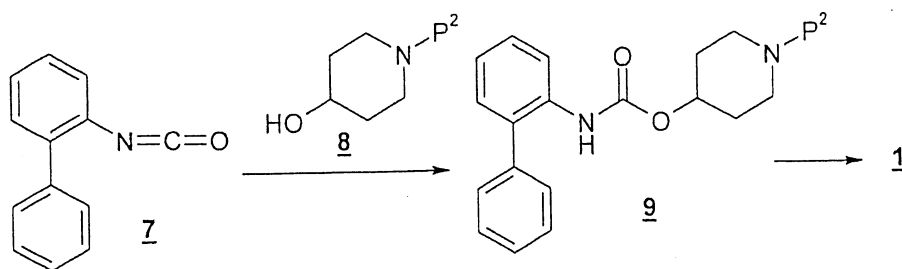
化合物 4 係接著與約 0.95 至約 1.5 莫耳當量之化合物 5，於還原劑存在下反應，而得化合物 6。任何適當還原劑均可使用於此反應中，以下述作為說明，係包括金屬氫化物試劑，譬如硼氫化鈉、三乙醯氧基硼氫化鈉、氰基硼氫化鈉等，或氫，及金屬觸媒，譬如鈀/碳等。此還原性烷基化反應典型上係在約 -20°C 至約 30°C，典型上為約 0°C 至約 5°C 範圍之溫度下，進行約 1 至約 6 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑與質子性溶劑中進行，

譬如二氯乙烷與甲醇等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離產物，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

然後，使化合物 6 去除保護，以提供式 I 化合物。用以使化合物 6 去除保護之特定條件係依所採用之保護基而定。例如，當 P^1 為矽烷基保護基（意即如本文定義之式 6a 化合物）時，譬如第三-丁基二甲基矽烷基、第三-丁基二苯基矽烷基、二苯甲基矽烷基、二-第三-丁基甲基矽烷基、第三-丁氧基二苯基矽烷基等，此去除保護反應典型上係經由使化合物 6a 與氟離子之來源接觸而進行。在一項特定具體實施例中，氟離子之來源為三乙胺三氟化氫。氟離子之其他適當來源包括氟化四丁基銨，氟化鉀與 18-冠-6 醚，氟化氫，吡啶氟化氫等。此反應典型上係在約 0°C 至約 50°C，典型上為約 10°C 至約 25°C 範圍之溫度下，進行約 24 至約 72 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如二氯乙烷等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離產物，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

化合物 1 係為此項技藝中已知，或可使用已知程序，製自市購可得之起始物質與試劑。參閱，例如美國專利申請案公報 U.S. 2004/0167167 A1 與 R. Naito 等人，*Chem. Pharm. Bull.*, 46(8) 1286-1294 (1998)。舉例言之，化合物 1 可按圖式 II 中所示製成：

圖式 II

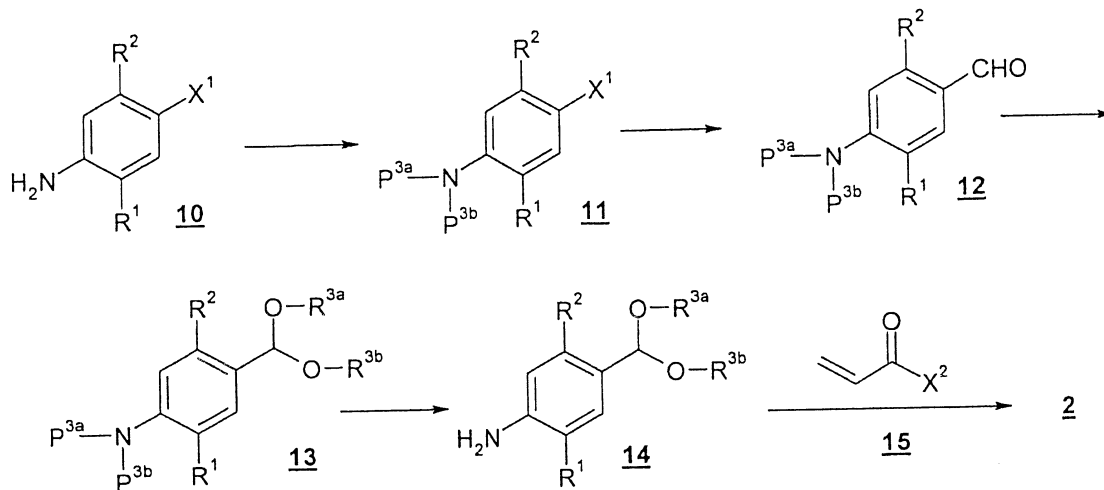


如圖式 II 中所示，2-異氰酸聯苯酯 (**7**) 係與 N-保護之 4-羥基六氫吡啶 **8** 反應，其中 P² 為胺基保護基，譬如苄基，以提供胺基甲酸酯中間物 **9**。此反應典型上係在約 20°C 至約 100°C，典型上為約 60°C 至約 80°C 範圍之溫度下，進行約 6 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。若需要則此反應可在適當稀釋劑中進行，譬如二氯甲烷、甲苯等。或者，此反應可於稀釋劑不存在下進行。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離產物 **9**，譬如萃取、再結晶作用、層析等。或者，含有化合物 **9** 之反應混合物係直接使用於合成之下一步驟中。

胺基保護基，P²，係接著使用習用程序自化合物 **9** 移除，而得化合物 **1**。例如，當 P² 為苄基時，化合物 **9** 可使用氫或甲酸銨，於觸媒譬如鈀觸媒存在下被去除保護。代表性觸媒，以下述作為說明，係包括鈀/碳、氫氧化鈀/碳等。此反應典型上係在約 20°C 至約 50°C 範圍之溫度下，典型上為約 40°C，進行約 6 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲醇、乙醇、異丙醇等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 **1**，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

式2化合物係為此項技藝中已知，或可使用已知程序製自市購可得之起始物質與試劑。以下述作為說明，式2化合物可按圖式 III 中所示製成：

圖式 III



如圖式 III 中所示，式10苯胺化合物，其中 X^1 為溴基或碘基，係首先在胺基上被保護，以提供式11化合物，其中 P^{3a} 為胺基保護基，且 P^{3b} 為氫或胺基保護基。可使用任何適當胺基保護基，譬如苄基、4-甲氧基苄基、三氟乙醯基等。例如，式10化合物可與約 2 或更多莫耳當量，較佳為約 2.5 至約 3.0 莫耳當量之苄基鹵化物反應，譬如苄基氯化物、溴化物或碘化物，而得化合物11，其中 P^{3a} 與 P^{3b} 均為苄基。此反應典型上係在約 0°C 至約 50°C 範圍之溫度下，典型上為約 30°C ，進行約 18 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲醇、乙醇、異丙醇等。典型上，此反應亦在適當鹼存在下進行，譬如碳酸鉀、碳酸鈉等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物11，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

可被採用於此反應中之式 10 代表性化合物，係包括 2,5-二甲基-4-碘基苯胺、2,5-二乙基-4-碘基苯胺、2-乙基-4-碘基-5-甲基苯胺、5-乙基-4-碘基-2-甲基苯胺、4-溴基-2,5-二甲苯胺、4-溴基-2,5-二乙基苯胺、4-溴基-2-乙基-5-甲基苯胺、4-溴基-5-乙基-2-甲基苯胺等。此種化合物係為市購可得（例如得自 Spectra 集團有限公司，Millbury, OH），或可使用習用程序製自市購可得之起始物質與試劑。

然後，使化合物 11 與約 1 至約 2 莫耳當量之烷基鋰試劑接觸，譬如正-丁基鋰或第三-丁基鋰，以形成其相應之陰離子，其中 X^1 基團已被交換成鋰。此反應典型上係在約 -70°C 至約 0°C 範圍之溫度下，典型上為約 -20°C ，進行約 0.25 至約 1 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲苯、二甲苯、四氫呋喃等。

所形成之鋰陰離子並未被單離，但係當場與莫耳過量之 N,N-二甲基甲醯胺反應，以提供化合物 12。一般而言，係使用約 2 至約 4 莫耳當量之 N,N-二甲基甲醯胺。此反應典型上係在約 -70°C 至約 0°C ，典型上為約 -20°C 至約 0°C 範圍之溫度下，進行約 0.5 至約 2 小時，或直到反應實質上完成為止。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 12，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

化合物 12 之醛基係接著被保護成縮醛，其方式是使化合物 12 與醇或二醇，於酸性觸媒存在下反應。任何適當醇或二醇均可使用於此反應中。例如，代表性醇類與二醇類包括甲醇、乙醇、正-丙醇、乙二醇、丙二醇等。一般而言，

莫耳過量之醇或二醇係被採用於此反應中，較佳為約2至約4莫耳當量。

可使用任何適當酸觸媒於此反應中，以促進縮醛之形成。代表性酸催化作用，舉例言之，係包括對-甲苯磺酸、苯磺酸、鹽酸等。

此反應典型上係在約50°C至約100°C，典型上為約60°C至約80°C範圍之溫度下，進行約12至約24小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲苯、二甲苯等。典型上，此反應係以會使所產生之水被移除之方式進行，譬如藉由共沸蒸餾或利用分子篩。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物13，譬如萃取、再結晶作用、層析等。或者，含有化合物13之反應混合物可直接使用於合成之下一步驟中。

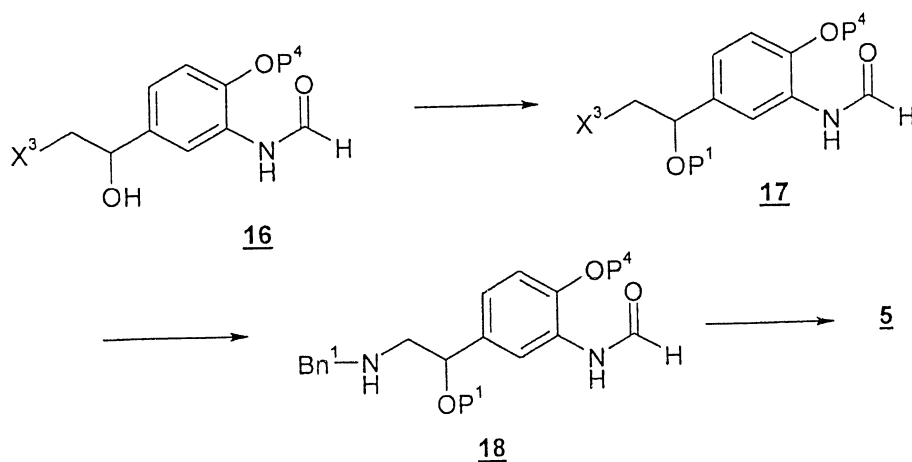
在形成縮醛之後，係使用標準試劑與條件使化合物13之胺基去除保護，以形成化合物14。例如，若 P^{3a} 與 P^{3b} 為苄基，則化合物13可使用氫與觸媒譬如鈀觸媒而被去除保護。代表性觸媒，舉例言之，係包括鈀/碳、氫氧化鈀/碳等。此反應典型上係在約20°C至約50°C，典型上為約25°C至約30°C範圍之溫度下，進行約4至約12小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲醇、乙醇、乙醇/醋酸乙酯混合物等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物14，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

然後，使化合物14與丙烯醯基鹵化物15反應，其中 X^2 為

氯基、溴基或碘基，以形成化合物 2。此反應典型上係在約 -20°C 至約 25°C，典型上為約 0°C 至約 5°C 範圍之溫度下，進行約 0.5 至約 6 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中，譬如二氯甲烷等，於適當鹼存在下進行，譬如二異丙基乙胺、三乙胺等。一般而言，約 1 至 1.2 莫耳當量之丙烯醯基鹵化物與約 1 至約 2 莫耳當量之鹼係使用於此反應中。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 2，譬如萃取、再結晶作用、層析等。

式 5 化合物係為此項技藝中已知，或可使用已知程序製自市購可得之起始物質與試劑。以下述作為說明，式 5 化合物可按圖式 IV 中所示製成：

圖式 IV



如圖式 IV 中所示，式 5 化合物可製自式 16 化合物，其中 P^4 為羥基保護基，譬如苄基，且 X^3 為脫離基，譬如氯基、溴基或碘基。式 16 化合物係為此項技藝中已知。例如，2001 年 7 月 31 日頒予之美國專利 6,268,533 B1；與 R. Hett 等人，有機製程研究與發展 1998, 2, 96-99；係描述 N-[2-苄氧基-5-((R)-2-溴

基-1-羥乙基)苯基]甲醯胺(意即化合物 **16** 之(R)對掌異構物，其中 P^4 為苄基，且 X^3 為溴基)自 2-溴基-4'-苄氧基-3'-硝基苯乙酮開始之製備，其合成係描述於 K. Murase 等人, *Chem. Pharm. Bull.*, 25(6) 1368-1377 (1977) 中。若需要，則化合物 **16** 之外消旋形式可利用非對掌性還原劑譬如硼烷硫化二甲烷複合物製備，以還原 2-溴基-4'-苄氧基-3'-硝基苯乙酮。

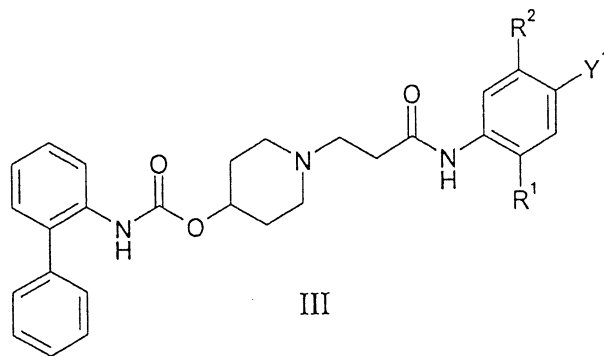
化合物 **16** 之羥基係使用習用程序與試劑被保護，以提供化合物 **17**，其中 P^1 為羥基保護基。在一項特定具體實施例中，羥基保護基為矽烷基保護基，譬如二甲基異丙基矽烷基、二乙基異丙基矽烷基、二甲基己基矽烷基、第三-丁基二甲基矽烷基、第三-丁基二苯基矽烷基、二苯甲基矽烷基等。例如，化合物 **16** 可與約 0.95 至約 1.2 莫耳當量之氯化第三-丁基二甲基矽烷，於約 1.1 至約 1.3 莫耳當量之咪唑存在下反應，以提供化合物 **17**，其中 P^1 為第三-丁基二甲基矽烷基。此反應典型上係在約 0°C 至約 50°C 範圍之溫度下，典型上在室溫下，進行約 24 至約 48 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如 N,N-二甲基甲醯胺等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 **17**，譬如萃取、層析等。藉由進一步說明，N-{2-苄氧基-5-[(R)-2-溴基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]苯基}甲醯胺之合成係描述於 2004 年 12 月 9 日公告之美國專利公報 US 2004/0248985 A1 之實例 2 中。

化合物 **17** 係接著與苄胺(意即 Bn^1-NH_2)反應，而得化合物 **18**，其中 Bn^1 為未經取代之苄基或經取代之苄基，具有 1 至 3

個取代基在苄基之苯環上，獨立選自 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基。代表性苄基胺類包括苄胺、3,4-二甲氧基苄胺、4-甲氧基苄胺、4-甲苄基胺等。此反應典型上係經由使化合物 17 與約 2 至約 4 莫耳當量之苄胺接觸，在從約 40°C 至約 100°C ，典型上為約 80°C 至約 90°C 範圍之溫度下，進行約 5 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如 N-甲基-2-四氫吡咯酮 (NMP) 等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 18，譬如萃取、層析、再結晶作用等。

於是，苄基、 Bn^1 及 P^4 使用習用程序與試劑之移除，係獲得化合物 5。於一項具體實施例中， Bn^1 與 P^4 兩者均為苄基，其係在相同反應混合物中被移除。典型上，此反應係經由使化合物 5 與氫，於觸媒譬如鈀觸媒存在下接觸而進行。代表性觸媒包括氫氧化鈀/碳、鈀/碳等。一般而言，此脫苄基化反應係於酸存在下進行，譬如醋酸、甲酸等。此反應典型上係在約 10°C 至約 50°C 範圍之溫度下，典型上在室溫下，進行約 6 至約 24 小時，或直到反應實質上完成為止。一般而言，此反應係在適當稀釋劑中進行，譬如甲醇、乙醇等。在反應完成時，典型上係使用習用程序單離化合物 5，譬如萃取、層析等。在一項特定具體實施例中，化合物 5 係被單離成醋酸鹽。

一般熟諳此藝者將明瞭的是，式 I 化合物亦可藉由其他合成程序製備。例如，其中進行合成步驟之特定順序可以改變，或可採用不同中間物。以下述作為說明，式 III 化合物：



其中 Y^1 為 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{3c}$ ，可使用習用程序與試劑被還原，以提供醛 4 (意即，其中 Y^1 為 $-\text{CHO}$)。此外，此種化合物可被還原成醇，意即，其中 Y^1 為 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ，且該醇可接著使用標準程序與試劑被氧化，以提供醛 4 (意即，其中 Y^1 為 $-\text{CHO}$)。

若需要，則式 I 化合物之藥學上可接受鹽可經由使式 I 化合物之自由態鹼形式與藥學上可接受之酸接觸而製成。

關於製備本發明代表性化合物或其中間物之特定反應條件及其他程序之進一步細節，係描述於下文所述之實例中。

醫藥組合物、組合及配方

本發明之化合物典型上係以醫藥組合物或配方之形式投予病患。此種醫藥組合物可藉任何可接受之投藥途徑投予病患，包括但不限於吸入、口腔、鼻、局部(包括經皮)及非經腸投藥模式。應明瞭的是，適合特定投藥模式之本發明化合物之任何形式(意即自由態鹼、藥學上可接受之鹽、溶劑合物等)，均可使用於本文中所討論之醫藥組合物中。

因此，在本發明組合物之一方面中，係關於一種醫藥組合物，其包含藥學上可接受之載劑或賦形劑，及式 I 化合物。典型上，此種醫藥組合物若需要可視情況含有其他治

療及/或調配劑。

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

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

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

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

可充作藥學上可接受載劑之物質之代表性實例，包括但不限於下列：(1)糖類，譬如乳糖、葡萄糖及蔗糖；(2)澱粉，譬如玉米澱粉與馬鈴薯澱粉；(3)纖維素及其衍生物，譬如

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

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

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

在本發明之一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥組合物係使用霧化罐吸入器，藉吸入投藥。此種霧化罐裝置典型上係產生高速度空氣流，其會造成包含治療劑之醫

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

一種供使用於霧化罐吸入器之代表性醫藥組合物，包括等滲水溶液，其包含約 0.05 微克/毫升至約 10 毫克/毫升之式 I 化合物。於一項具體實施例中，此種溶液具有約 4 至約 6 之 pH 值。

在本發明之另一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥組合物係使用乾粉吸入器，藉吸入投藥。此種乾粉吸入器典型上係以自由流動性粉末投予治療劑，其係在吸氣期間被分散於病患之氣流中。為達成自由流動性粉末，典型上係將治療劑與適當賦形劑一起調配，該賦形劑譬如乳糖、澱粉、甘露醇、右旋糖、聚乳酸 (PLA)、聚內交酯-共-乙交酯 (PLGA) 或其組合。典型上，治療劑係被微粉化，且與適當載劑合併，以形成適用於吸入之摻合物。因此，於本發明之一項具體實施例中，式 I 化合物係呈微粉化形式。

供使用於乾粉吸入器之代表性醫藥組合物，係包含乾燥乳糖與微粉化粒子之式 I 化合物。

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

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

在本發明之又另一項特殊具體實施例中，包含治療劑之醫藥組合物係使用經計量之劑量吸入器，藉吸入投藥。此種經計量之劑量吸入器典型上係使用壓縮推進劑氣體，排放經度量數量之治療劑。因此，使用經計量之劑量吸入器投予之醫藥組合物，典型上包含治療劑在液化推進劑中之溶液或懸浮液。任何適當液化推進劑均可採用，包括氯氟碳類，譬如 CCl_3 ，與氫氟基烷類(HFA)，譬如 1,1,1,2-四氟基乙烷(HFA 134a)與 1,1,1,2,3,3,3-七氟-正-丙烷(HFA 227)。由於顧慮氯氟碳類會影響臭氧層，故含有 HFA 之配方一般較佳。HFA 配方之其他選用成份係包括共溶劑，譬如乙醇或戊

烷，與界面活性劑，譬如三油酸花楸聚糖酯、油酸、卵磷脂及甘油。

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

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

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

於另一項具體實施例中，本發明之醫藥組合物係適用於口服投藥。供口服投藥之適當醫藥組合物可呈膠囊、片劑、丸劑、錠劑、扁囊劑、糖衣錠、粉末、顆粒形式；或作成溶液或懸浮液，在水性或非水性液體中；或作成油在水中或水在油中型液體乳化液；或作成酏劑或糖漿；及其類似物；各含有預定量之本發明化合物作為活性成份。

當欲以固體劑型(意即為膠囊、片劑、丸劑及其類似物)

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

離型劑、潤濕劑、塗覆劑，增甜、矯味及芳香劑，防腐劑及抗氧化劑，亦可存在於本發明之醫藥組合物中。藥學上可接受抗氧化劑之實例，包括：(1)水溶性抗氧化劑，譬如抗壞血酸、半胱胺酸鹽、酸性硫酸鈉、偏酸性硫酸鈉、亞硫酸鈉等；(2)油溶性抗氧化劑，譬如棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基甲苯醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等；及(3)金屬螯合劑，譬如檸檬酸、乙二胺四醋酸(EDTA)、花楸醇、酒石酸、磷酸等。供片劑、膠囊、丸劑及類似物用之塗覆劑，包括用於腸溶性塗層者，譬如纖維素醋酸酐酸酯(CAP)、聚酞酸醋酸乙烯酯(PVAP)、羥丙甲基纖維素酞酸酯、甲基丙烯酸、

甲基丙烯酸酯共聚物、纖維素醋酸苯三甲酸酯(CAT)、羧甲基乙基纖維素(CMEC)、羥丙甲基纖維素醋酸琥珀酸酯(HPMCAS)等。

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

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

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

當欲供口服投藥時，本發明之醫藥組合物可以單位劑型包裝。"單位劑型"一詞係意謂適合病患服藥之物理上不連

續單位，意即各單位含有經計算以產生所要治療效果之預定量活性劑，無論單獨或併用一或多個其他單位。例如，此種單位劑型可為膠囊、片劑、丸劑等。

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

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

若需要，則本發明化合物可併用一或多種其他治療劑一起投藥。在此項具體實施例中，本發明之化合物係無論是以物理方式與另一種治療劑混合，以形成含有兩種藥劑之組合物；或各藥劑係存在於個別且不同組合物中，其係同時或相繼地投予病患。

例如，式I化合物可使用習用程序與設備，與第二種治療劑合併，以形成包含式I化合物與第二種治療劑之組合物。此外，治療劑可與藥學上可接受之載劑合併，以形成一種包含式I化合物、第二種治療劑及藥學上可接受載劑之醫藥組合物。在此項具體實施例中，典型上係將組合物之成份

混合或摻合，以產生物理混合物。然後，使用本文中所述之任何途徑，以治療上有效量投予該物理混合物。

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

可與本發明化合物相容之任何治療劑可與此種化合物合併使用。在一項特定具體實施例中，第二種治療劑係為有效地藉吸入所投予者。以下述作為說明，可與本發明化合物一起使用之治療劑之代表性類型，包括但不限於消炎劑，譬如類固醇消炎劑(包括皮質類固醇與類皮質糖)、非類固醇消炎劑(NSAID)及PDE₄抑制劑；支氣管擴張藥，譬如PDE₃抑制劑、腺苷2b調制劑及 β_2 腎上腺素能受體激動劑；防止傳染劑，譬如革蘭陽性抗生素、革蘭陰性抗生素及抗病毒劑；抗組織胺類；蛋白酶抑制劑；傳入阻斷劑，譬如D₂激動劑與神經激肽調制劑；及毒蕈鹼受體拮抗劑(抗膽鹼能劑)。此種治療劑之許多實例係為此項技藝中所習知。與本發明化合物合併投予之其他治療劑之適當劑量，典型上係在約0.05微克/天至約500毫克/天之範圍內。

在本發明之一項特定具體實施例中，式I化合物係與類固醇消炎劑合併投藥。可與本發明化合物併用之類固醇消炎劑之代表性實例，包括但不限於二丙酸氯地米松；布蝶松化物；丁氧可體丙酸鹽(butixocort propionate)；20R-16 α ,17 α -[亞丁基雙(氧基)]-6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-17 β -(甲硫基)雄甾-4-烯-3-酮(RPR-106541)；西列松奈得(ciclesonide)；地塞米松；6 α ,9 α -二氟-17 α -[(2-呋喃基羰基)氧基]-11 β -羥基-16 α -甲基-3-酮基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸S-氟基甲酯；6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-16 α -甲基-17 α -[(4-甲基-1,3-噻唑-5-羰基)氧基]-3-酮基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸S-氟基甲酯；6 α ,9 α -二氟-11 β -羥基-16 α -甲基-3-酮基-17 α -丙醯氧基雄甾-1,4-二烯-17 β -碳硫代酸(S)-(2-酮基四氫呋喃-3S-基)酯；氟尼梭來；丙酸福路替卡松(fluticasone propionate)；甲基氫化潑尼松；糠酸莫美塔松；氫化潑尼松；潑尼松；若弗澎奈得(rofleponide)；ST-126；丙酮化氟羥脫氫皮甾醇等，或其藥學上可接受之鹽。此種類固醇消炎劑係為市購可得，或可使用習用程序與試劑製成。例如，類固醇消炎劑之製備與用途係描述於2004年6月15日頒予之美國專利 6,750,210 B2；2004年7月6日頒予之美國專利 6,759,398 B2；2003年3月25日頒予之美國專利 6,537,983；2002年2月14日公告之美國專利申請案公報 US 2002/0019378 A1；及其中引述之參考資料中。

當被採用時，類固醇消炎劑當與本發明之化合物共同投藥時，典型上係以會產生治療上有利作用之量投予。典型上，類固醇消炎劑係以足以提供每劑量約0.05微克至約500

微克之量投藥。

【實施方式】

下述實例係說明本發明之代表性醫藥組合物：

實例 A

乾粉組合物

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

實例 B

乾粉組合物

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

實例 C

乾粉組合物

使經微粉化之本發明化合物(100毫克)及經微粉化之類固醇消炎劑(500毫克)，與經研磨之乳糖(30克)摻合。然後，將此已摻合之混合物裝填至可剝離氣泡包裝之個別氣泡

中，其量足以提供每劑量約10微克至約500微克之本發明化合物。氣泡之內含物係使用乾粉吸入器投藥。

實例 D

經計量之劑量吸入器組合物

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

實例 E

霧化罐組合物

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

實例 F

硬明膠膠囊

將本發明之化合物(50克)、經噴霧乾燥乳糖(440克)及硬脂酸鎂(10克)充分地摻合。將所形成之組合物裝填至硬明膠膠囊(每膠囊500毫克組合物)中，其係以口服方式投藥。

實例 G

口服懸浮液

將下列成份充分地混合，以形成口服投藥用之懸浮液：

成份	量
本發明化合物	1.0 克
反丁烯二酸	0.5 克
氯化鈉	2.0 克
對羥基苯甲酸甲酯	0.15 克
對羥基苯甲酸丙酯	0.05 克
粒狀糖	25.5 克
花楸醇(70%溶液)	12.85 克
VEEGUM® K (矽酸鎂鋁)	1.0 克
矯味劑	0.035 毫升
著色劑	0.5 毫克
蒸餾水	足量至 100 毫升

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

實例 H

可注射組合物

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

利用性

本發明化合物同時具有 β_2 腎上腺素能受體激動劑與毒蕈鹼受體拮抗劑活性，因此，預期此種化合物可作為治療劑使用，以治療藉由 β_2 腎上腺素能受體或毒蕈鹼受體所媒介之醫療症狀，意即經由以 β_2 腎上腺素能受體激動劑或毒蕈鹼受體拮抗劑治療而被改善之醫療症狀。此種醫療症狀係為一般熟諳此項技藝者所習知，如以 Eglen 等人，毒蕈鹼受體亞型：藥理學與治療潛力，*DN&P* 10(8), 462-469 (1997); Emilien 等人， β 腎上腺素受體激動劑與拮抗劑之當前治療用途與潛力，*European J. Clinical Pharm.*, 53(6), 389-404 (1998); 及其中所引述參考資料之陳述內容為例。此種醫療症狀，舉例言之，係包括肺病，或與可逆氣道阻塞有關聯之疾病，譬如慢性阻塞肺病(例如慢性與哮喘枝氣管炎及氣腫)、氣喘、肺纖維變性等。其他症狀包括早產、抑鬱、鬱血性心衰竭、皮膚病(例如炎性、過敏性、牛皮癬及增生性皮膚病)，其中降低胃液素酸度係為所期望之症狀(例如消化與胃潰瘍)，及肌肉消耗疾病。

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

在本發明方法之一方面，係關於一種治療慢性阻塞肺病或氣喘之方法，此方法包括對病患投予治療上有效量之式 I

化合物。一般而言，治療 COPD 或氣喘之劑量係涵蓋從約 10 微克/天至約 500 微克/天之範圍。"COPD" 一詞係為一般熟諳此藝者所明瞭，包括多種呼吸症狀，包括慢性阻塞枝氣管炎與氣腫，如以 Barnes, 慢性阻塞肺病, *N. Engl. J. Med.*, 2000: 343: 269-78，及其中所引述參考資料之陳述內容為例。

當藉吸入投藥時，本發明化合物典型上具有產生枝氣管擴大之作用。因此，在本發明方法之另一方面，係關於一種在哺乳動物中產生枝氣管擴大之方法，此方法包括對哺乳動物投予枝氣管擴大作用產生量之式 I 化合物。一般而言，產生枝氣管擴大作用之劑量係涵蓋從約 10 微克/天至約 500 微克/天之範圍。

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

由於本發明化合物同時具有 β_2 腎上腺素能激動劑活性與毒蕈鹼受體拮抗劑活性，故此種化合物亦可作為研究工具使用，以探查或研究具有 β_2 腎上腺素能受體或毒蕈鹼受體

之生物系統或試樣。此外，此種化合物可用於篩選檢測，以發現例如同時具有 β_2 腎上腺素能激動劑活性與毒蕈鹼受體拮抗劑活性之新穎化合物。此種生物系統或試樣可包含 β_2 腎上腺素能受體及/或毒蕈鹼受體。具有 β_2 腎上腺素能及/或毒蕈鹼受體之任何適當生物系統或試樣，均可被採用於此種研究中，其可無論是在活體外或活體內進行。適合此種研究之代表性生物系統或試樣，包括但不限於細胞、細胞萃取物、漿膜、組織試樣、哺乳動物(譬如老鼠、大白鼠、天竺鼠、兔子、狗、豬等)等。

當作為研究工具使用時，典型上係使包含 β_2 腎上腺素能受體及/或毒蕈鹼受體之生物系統或試樣，與 β_2 腎上腺素能受體催動或毒蕈鹼受體拮抗量之本發明化合物接觸。藉此化合物所造成對生物系統或試樣之作用，係接著使用習用程序與設備在哺乳動物中測定或度量，譬如藉由度量放射配位體結合檢測中之結合，或功能性檢測中之配位體所媒介之改變，或藉由在枝氣管保護檢測中測定由化合物所提供之枝氣管保護量。在功能性檢測中之代表性配位體所媒介之改變，係包括在胞內環腺苷單磷酸(cAMP)中之配位體所媒介之改變；在酵素腺苷基環化酶(其會合成cAMP)之活性上之配位體所媒介之改變；在鳥嘌呤核糖苷 5'-O-(硫基)三磷酸鹽($[^3\text{S}]\text{GTP S}$)經由 $[^3\text{S}]\text{GTP S}$ 對GDP之受體催化交換，摻入經單離細胞膜中，配位體所媒介之改變；在自由態胞內鈣離子上配位體所媒介之改變(例如，以得自Molecular Devices公司之螢光連結成像板讀取器或FLIPR[®]度量)等。預

期本發明化合物在本文列示之功能性檢測中或在類似性質之檢測中，會催動或造成 β_2 腎上腺素能受體之活化作用，且拮抗或降低毒蕈鹼受體之活化作用。本發明化合物典型上將在約 0.1 毫微莫耳濃度至約 100 毫微莫耳濃度範圍之濃度下，使用於此等研究中。

此外，本發明化合物可作為研究工具使用，以評估其他化學化合物。在本發明之此方面，式 I 化合物係在一項檢測中作為標準物使用，以允許以待測化合物與式 I 化合物所獲得結果之比較。例如，係將關於一種待測化合物或一組待測化合物之 β_2 腎上腺素能受體及 / 或毒蕈鹼受體結合數據（例如當藉活體外放射配位體置換檢測測定時），與關於式 I 化合物之 β_2 腎上腺素能受體及 / 或毒蕈鹼受體結合數據作比較，以確認此等待測化合物具有所要之結合，意即待測化合物具有約等於或優於式 I 化合物之結合，若具有時。或者，例如枝氣管保護作用可在枝氣管保護檢測中，於哺乳動物中，對待測化合物與式 I 化合物測定，並比較此數據，以確認待測化合物提供約等於或優越枝氣管保護作用。本發明之此方面，作為個別具體實施例，係包括 (i) 比較數據之產生（使用適當檢測）與 (ii) 試驗數據之分析兩者，以確認吾人感興趣之待測化合物。

本發明化合物之性質與利用性可使用一般熟諳此藝者所習知之各種活體外與活體內檢測証實。例如，代表性檢測係進一步詳述於下述實例中。

實例

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

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

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

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

小規模純化典型上係使用得自應用生物系統(Applied Biosystems)之API 150EX Perp工作站系統進行。流動相"A"為含有0.05%三氟醋酸(v/v)之水；而流動相"B"為含有0.05%三氟

醋酸(v/v)之乙腈。對於小試樣(約3至50毫克經回收之試樣大小)，典型上係使用下列條件：20毫升/分鐘流率；15分鐘梯度液，及20毫米x 50毫米Prism RP管柱，具有5微米粒子(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA)。對於較大試樣(意即大於約100毫克粗製試樣)，典型上係使用下列條件：60毫升/分鐘流率；30分鐘梯度液，及41.4毫米x 250毫米Microsorb BDS管柱，具有10微米粒子(Varian, Palo Alto, CA)。

實例 1

聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯

將2-異氰酸聯苯酯(97.5克，521毫莫耳)與4-羥基-1-苄基六氫吡啶(105克，549毫莫耳)(兩者均可市購得自Aldrich，Milwaukee, WI)於70°C下一起加熱12小時，於此段時間內，聯苯-2-基胺甲基酸1-苄基六氫吡啶-4-基酯之形成係藉LCMS監測。然後，使反應混合物冷卻至50°C，並添加乙醇(1升)，接著慢慢添加6M鹽酸(191毫升)。然後，使反應混合物冷卻至環境溫度，並添加甲酸銨(98.5克，1.56莫耳)，且使氮氣激烈起泡經過此溶液20分鐘。接著添加鈹(10重量%(乾重為基準)，於活性碳上)(20克)。將反應混合物在40°C下加熱12小時，然後經過矽藻土墊過濾。接著在減壓下移除溶劑，並將1M鹽酸(40毫升)添加至粗製殘留物中。然後添加氫氧化鈉(10N)，以調整pH至12。將水層以醋酸乙酯(2 x 150毫升)萃取，並脫水乾燥(硫酸鎂)，接著於減壓下移除溶劑，獲得聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(155克，100%)。HPLC (10-70) $R_t = 2.52$ ；MS m/z ：[$M+H^+$] 對 $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 之計算值

297.15；實測值 297.3.

實例 2

3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸

於聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(50 克，67.6 毫莫耳)在二氯甲烷(500 毫升)中之溶液內，添加丙烯酸(15.05 毫升，100 毫莫耳)。將所形成之混合物在 50°C 及回流下加熱 18 小時，然後移除溶劑。添加甲醇(600 毫升)，並將此混合物於 75°C 下加熱 2 小時，接著冷卻至室溫，以形成濃稠漿液。藉過濾收集固體，以甲醇(50 毫升)洗滌，及風乾，而得 3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸(61 克，96% 純度)，為白色粉末。

實例 3

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

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

於 500 毫升三頸圓底燒瓶中，添加 N-{2-苄氧基-5-[(R)-2-溴基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]苯基}甲醯胺(100 克，215 毫莫耳)與 N-甲基-2-四氫吡咯酮(300 毫升)。添加苄胺(69.4 毫升，648 毫莫耳)，並將反應混合物以氮沖洗。接著，將反應混合物加熱至 90°C，並攪拌約 8 小時。然後，使反應混合物冷卻至室溫，且添加水(1.5 升)與醋酸乙酯(1.5 升)。分離液層，並將有機層以水(500 毫升)，水與飽和鹽水之 1:1 混合物(總計 500 毫升)，接著再一次以水(500 毫升)洗滌。然

後，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮，以提供粗製 N-{5-[(R)-2-苄胺基-1-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)乙基]-2-苄氧基苯基}甲醯胺 (100 克，90% 產率，75-80% 純度)，為橘褐色濃稠油。

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

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

實例 4

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

步驟 A - 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯

於 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸 (480 毫克，2.4 毫莫耳) 在無水甲醇 (8.2 毫升) 中之經攪拌溶液內，在 0°C 及乾燥氮下，添加二

氯化亞硫鹽(0.538 毫升, 7.38 毫莫耳)。使所形成之混合物溫熱至室溫, 並攪拌約 7 小時。添加另外之二氯化亞硫鹽(0.300 毫升), 並在室溫下持續攪拌過夜。於減壓下移除溶劑, 並使殘留物溶於醋酸乙酯中。將此溶液以飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌, 以無水硫酸鈉脫水乾燥, 及在減壓下濃縮, 以提供 2,5-二甲基-4-硝基苯甲酸甲酯(578 毫克), 為淡黃色固體。HPLC (10-70) $R_t = 4.61$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.57 (3H, s), 2.61 (3H, s), 3.94 (3H, s), 7.82 (1H, s), 7.87 (1H, s).

步驟 B - 4-胺基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

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

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

於 3-[4-(聯苯-2-基胺甲鹽基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酸(670 毫克, 1.82 毫莫耳)與 4-胺基-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(390 毫克,

2.18 毫莫耳) 在二氯甲烷(3.6 毫升) 與二異丙基乙胺(0.413 毫升) 中之經攪拌溶液內，添加六氟磷酸 O-(7-氮苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基錄(HATU) (829 毫克，2.18 毫莫耳)。將所形成之混合物於室溫下攪拌過夜。然後以飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌混合物，以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮。使殘留物藉矽膠層析純化，以含有 3% 至 5% 甲醇之二氯甲烷溶離，以提供 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯(568 毫克，59% 產率)。LCMS (10-70) $R_t = 4.55$; $[M+H^+]$ 實測值 530.4.

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

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

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

於聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯

基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(151毫克, 0.3毫莫耳)在二氯甲烷(3毫升)中之溶液內, 在0°C下, 添加二甲亞砷(128微升, 1.8毫莫耳)與二異丙基乙胺(157微升, 0.9毫莫耳)。15分鐘後, 添加三氧化硫吡啶複合物(143毫克, 0.9毫莫耳), 並在0°C下持續攪拌1小時。添加水, 以使反應淬滅, 並分離液層。使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥, 過濾, 及在減壓下移除溶劑, 獲得聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(150毫克, 100%產率), 使用之而無需進一步純化。 $[M+H^+]$ 實測值500.4.

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

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

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

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

實例 5

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

步驟 A - 二苄基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之 2 升圓底燒瓶中, 添加 4-碘基-2,5-二甲苯胺 (100.0 克, 0.405 莫耳) (得自 Spectra 集團有限公司, Millbury, OH)。添加乙醇 (1 升) 與固體碳酸鉀 (160 克, 1.159 莫耳), 然後以一份添加不含溶劑之溴化

苳(140 毫升, 1.179 莫耳)。將所形成之混合物於 30°C 下攪拌約 18 小時, 此時 HPLC 顯示大於 98% 之轉化率。接著, 使混合物冷卻至室溫, 並添加己烷(1 升)。將此混合物攪拌 15 分鐘, 然後經過濾紙過濾, 以移除固體, 且以己烷(200 毫升)洗滌濾餅。使用迴轉式蒸發器, 使濾液之體積降至約 500 毫升, 及添加濃鹽酸(30 毫升)。然後, 將殘留溶劑使用迴轉式蒸發器移除。於所形成之殘留物中, 添加己烷(500 毫升), 並將此混合物攪拌約 30 分鐘, 此時, 自由流動性漿液已形成。過濾漿液, 並以己烷(200 毫升)洗滌濾餅, 及乾燥, 以提供二苳基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺鹽酸鹽(115 克, 62% 產率, 97.5% 純度), 為帶有綠色之固體。

將二苳基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺鹽酸鹽轉移至 3 升燒瓶中, 並添加甲苯(1 升)與 1M 氫氧化鈉水溶液(1 升)。將所形成之混合物攪拌 1 小時, 然後分離液層。將有機層以稀鹽水(500 毫升)洗滌, 並藉迴轉式蒸發移除溶劑, 以提供二苳基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺(80 克), 為半固體濃稠油(或者, 於此步驟中可使用二氯甲烷取代甲苯)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.90 (4H, s), 6.91 (1H, s), 7.05-7.20 (10H, m), 7.42 (1H, s); MS [M+H⁺] 實測值 428.

步驟 B - 4-二苳基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之 1 升 3 頸圓底燒瓶中, 添加二苳基-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)胺(15 克, 35 毫莫耳)。添加甲苯(300 毫升), 並將所形成之混合物攪拌約 15 分鐘。將反應燒瓶以乾燥氮滌氣, 並冷卻至約 -20°C, 且經

由添液漏斗逐滴添加己烷中之1.6M正-丁基鋰(33毫升, 53毫莫耳)。在添加期間, 反應混合物之內部溫度係被保持低於-10°C。當添加完成時, 將所形成之混合物在約-15°C下攪拌15分鐘。然後逐滴添加N,N-二甲基甲醯胺(10毫升, 129毫莫耳), 同時保持內部反應溫度低於0°C。接著, 將所形成之混合物在-20°C至0°C下攪拌約1小時。然後添加1M鹽酸水溶液(200毫升), 歷經5分鐘期間, 且將所形成之混合物攪拌15分鐘。接著分離液層, 及以稀鹽水(100毫升)洗滌有機層。然後, 使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥, 過濾, 及在減壓下移除溶劑, 以提供4-二苄基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽(11.5克, 90%產率, 95%純度), 為濃稠油, 其係於靜置時固化。產物含有約3至5%脫碘基副產物。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.42 (3H, s), 2.50 (3H, s), 4.25 (4H, s), 6.82 (1H, s), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS [M+H⁺] 實測值 330.3.

步驟C - 4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯胺

於500毫升圓底燒瓶中, 添加4-二苄基胺基-2,5-二甲基苯甲醛鹽酸鹽(11.5克, 31.4毫莫耳)與甲苯(150毫升), 並將所形成之混合物攪拌, 直到鹽完全溶解為止。然後, 將反應燒瓶以乾燥氮滌氣5分鐘。添加乙二醇(5.25毫升, 94.2毫莫耳)與對-甲苯磺酸(760毫克, 6.2毫莫耳), 並將所形成之混合物在60°C至80°C下加熱約20小時。接著在40°C下, 於迴轉式蒸發器上慢慢移除溶劑(歷經約40分鐘)。將甲苯(100毫升)添加至殘留物中, 並在40°C下, 於迴轉式蒸發器上再一

次慢慢地移除溶劑。使用另一液份之甲苯(100毫升)重複此程序，並使混合物蒸發至乾涸。將醋酸乙酯(150毫升)與飽和碳酸氫鈉水溶液(100毫升)添加至殘留物中，且分離液層。將有機層以鹽水(50毫升)洗滌，然後以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及在減壓下濃縮，以提供粗製二苄基-(4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基-苯基)胺(11.4克)。

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

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

於500毫升圓底燒瓶中，添加粗製4-[1,3]二氧伍圓-2-基-2,5-二甲基苯胺(5.6克，29毫莫耳)、二氯甲烷(100毫升)及二異丙基乙胺(7.6毫升，43.5毫莫耳)。將所形成之混合物於室溫下攪拌，直到成份溶解為止，然後，使混合物冷卻至0°C。接著逐滴添加氯化丙烯醯(2.35毫升，29毫莫耳)，歷經5分鐘期間。將反應混合物在0°C至5°C下攪拌1小時，接著添加水(50毫升)，並持續攪拌約30分鐘，此時微細固體已形成。

過濾混合物，以收集固體。然後分離濾液層，並使有機層在減壓下濃縮至乾涸。將二氯甲烷(50 毫升)添加至殘留物中，且將此混合物攪拌，直到自由流動性漿液已發展為止。過濾漿液(使用收集上文微細固體之相同漏斗)，並以二氯甲烷(10 毫升)洗滌濾餅，及乾燥，以提供 N-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(3.1 克，97% 純度)，為白色至灰白色固體。

然後，使得自上文之濾液蒸發至乾涸，並將甲醇(10 毫升)添加至殘留物中。將此混合物攪拌 15 分鐘，接著藉過濾收集沉澱物，以甲醇(5 毫升)洗滌，並乾燥，獲得第二份收取產物之 N-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(0.8 克，95% 純度)。¹H NMR (300 MHz, CD₃ OD) δ 2.10 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.85-4.10 (4H, m), 5.60-6.40 (3H, m), 5.59 (1H, s), 7.18 (1H, s), 7.23 (1H, s).

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

於 50 毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(1.2 克，4.04 毫莫耳)與 N-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(1.0 克，4.04 毫莫耳)。添加乙醇(10 毫升)與二氯甲烷(10 毫升)，以形成漿液。將反應混合物在 45°C 至 50°C 下加熱約 18 小時，然後冷卻至室溫。添加 1M 鹽酸水溶液(10 毫升)，並將所形成之混合物激烈攪拌約 3 小時。添加二氯甲烷(10 毫升)，且將所形成之混合物攪拌約 5 分鐘。接著分離液層，並使有機層以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，

及於迴轉式蒸發器上濃縮，以提供粗製聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯鹽酸鹽 (1.9 克)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.2-1.4 (2H, m), 1.58-1.75 (2H, m), 2.0-2.17 (2H, m), 2.19 (3H, s), 2.38 (3H, s), 2.41-2.50 (4H, m), 2.5-2.75 (2H, m), 4.31-4.42 (1H, m), 7.10-7.35 (9H, m), 7.55 (1H, s), 7.75 (1H, s), 8.59 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.98 (1H, s); MS [M+H⁺] 實測值 500.2.

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

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

二甲基苯胺甲鹽基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(55克, 86%純度), 為黃色固體。

使粗產物(30克)溶於含有2%甲醇之二氯甲烷(總計150毫升)中, 並裝載至矽膠管柱(300克)上, 該管柱已經以含有2%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷裝填及達成平衡。使產物自管柱溶離, 使用含有2%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(1升); 含有4%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(1升), 及含有5%甲醇與0.5%氫氧化銨之二氯甲烷(約3升)。收集溶離份(200毫升), 並合併此等具有純度大於90%之溶離份, 及在減壓下濃縮, 以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲鹽胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯(21.6克, 96.5%純度), 為帶黃色固體。MS $[M+H^+]$ 實測值 794.6.

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

於1升圓底燒瓶中, 添加聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲鹽胺基-4-羥苯基)乙胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(21.5克, 27.1毫莫耳)與二氯甲烷(200毫升)。將所形成之混合物於室溫下攪拌, 直到成份溶解為止, 然後添加三乙胺三氟化氫(8.85毫升, 54.2毫莫耳), 並將所形成之混合物於25°C下攪拌約48小時。於迴轉式蒸發器上移除溶劑, 以提供濃稠糊劑。將二氯甲烷(100毫升)與醋酸乙酯(200毫升)添加至

糊劑中，並將所形成之混合物攪拌30分鐘。於乾燥氮下慢慢過濾所形成之漿液，且以二氯甲烷與醋酸乙酯之1:2混合物(總計100毫升)洗滌濾餅，在氮氣下乾燥2小時，接著於真空下乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯，為氟化氫鹽(25克，96.9%純度)，其為硬質黏土狀固體。MS [M+H⁺] 實測值680.8。

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

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

實例 6

聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯
 步驟 A - 聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

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

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

於 500 毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[1,3]二氧伍園-2-基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (15 克，27.6 毫莫耳) 與乙腈 (150 毫升)，以形成漿液。添加 2M 鹽酸水溶液 (75 毫升)，並將所形成之混合物於 30°C 下攪拌 1 小時。然後，使混合物冷卻至室溫，並添加醋酸乙酯 (150

毫升)。添加 2M 氫氧化鈉水溶液(75 毫升)，確認 pH 值，接著添加另外之 2M 氫氧化鈉，直到溶液之 pH 值係在 9 至 10 之範圍內為止。分離液層，且以稀鹽水(75 毫升；1：1 鹽水/水)洗滌有機層，以無水硫酸鈉脫水乾燥，及在迴轉式蒸發器上移除溶劑，獲得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(12.5 克，約 98% 純度)。若需要，則此中間物之純度可藉由以乙醇(3 份體積之乙醇)形成漿液，將漿液加熱至 80°C，接著慢慢冷卻至室溫，及藉過濾單離而增加。

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

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

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

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

步驟 E - 聯苯-2-基胺甲酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六

氫吡啶-4-基酯 L-酒石酸鹽

於 200 毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(第三-丁基二甲基矽烷基氧基)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)乙胺基]-甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (3.8 克，4.8 毫莫耳) 與 2-甲基四氫呋喃 (40 毫升)。將所形成之混合物於室溫下攪拌，直到成份溶解 (約 15 分鐘) 為止，然後添加三乙胺三氟化氫 (0.94 毫升，5.76 毫莫耳)，並將所形成之混合物於 25°C 下攪拌約 24 小時。於此混合物中，添加飽和碳酸氫鈉水溶液與水之 1:1 混合物 (40 毫升) 及 2-甲基四氫呋喃，且將所形成之混合物攪拌，直到固體溶解為止 (溶液 pH 約 8)。分離液層，並將有機層以鹽水 (30 毫升) 洗滌，以無水硫酸鈉脫水乾燥，過濾，及於迴轉式蒸發器上濃縮。使殘留物溶於 2-甲基四氫呋喃 (50 毫升) 中，並添加固體 L-酒石酸 (650 毫克)。將所形成之混合物於 25°C 至 30°C 下攪拌 18 小時，然後經過濾紙過濾。以 2-甲基四氫呋喃 (10 毫升)、異丙醇 (10 毫升) 洗滌濾餅，且立即放置在真空下，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 L-酒石酸鹽 (3.7 克，>97% 純度)。

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

於 250 毫升圓底燒瓶中，添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-

二甲基苯胺甲鹽基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 L-酒石酸鹽 (3.5 克) 與甲醇 (35 毫升)，並將所形成之混合物攪拌 15 分鐘。添加飽和碳酸氫鈉水溶液與水之 1:1 混合物 (70 毫升)，歷經 5 分鐘期間，並持續攪拌 2 小時。過濾所形成之灰白色漿液，且以水 (20 毫升) 洗滌濾餅，風乾 2 小時，接著在真空中乾燥過夜，以提供聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲鹽胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲鹽基)-乙基]六氫吡啶-4-基酯 (2.3 克)，為半結晶性自由態鹼。

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

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

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), 較少異構物 δ 9.64 (br, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.26 (br d, $J = \sim 7.0$, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.50 (br d, $J = \sim 7.0$, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~ 7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), ~ 7.07 (nd, 1H), 6.95 (dd, $J = 8.3, 1.8$, 1H), 6.83 (d, $J = 8.3$, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.47 (m, 1H), ~ 3.65 與

~3.60 (AB 對, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~2.59 (nd, 2H), 2.44 (br t, $J = 6.5$, 2H), 2.20 (s, 3H), ~2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, $J = \sim 9.0$, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), 主要異構物 δ 170.0, 159.9, 153.9, 145.5, 139.3, 137.6, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 125.6, 121.7, 118.6, 114.5, 71.4, 70.0, 57.4, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

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

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

實例 7

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

使半結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (500 毫克) 溶於甲醇 (50 毫升) 中, 並添加水, 直到達成濁點為止。將所形成之混合物在 25°C 下攪拌 3

小時，並藉過濾單離所形成之結晶性物質，以提供結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(420 毫克)。此結晶性自由態鹼係被測定為具有示差掃描卡計法(DSC)軌跡顯示吸熱流中之吸收峰在約 142°C 至約 150°C 下；且粉末 x-射線繞射(PXRD)圖樣在其他吸收峰中具有顯著繞射吸收峰，在 2θ 值為約 20.7 ± 0.3 , 21.6 ± 0.3 , 22.5 ± 0.3 及 23.2 ± 0.3 下。此結晶性自由態鹼形式係稱為形式 II。關於此化合物之形式 II 及其他結晶性自由態鹼形式之其他資訊係揭示於與本案同一日期提出申請之共同歸屬美國專利申請案編號 _____ (律師案件目錄編號 P-222-US1)，及 2006 年 4 月 25 日提出申請之美國臨時申請案號 60/794,709 中；其揭示內容係以其全文併於本文供參考。

實例 8

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

於裝有架空攪拌器、溫度控制及添液漏斗之 3 升三頸圓底燒瓶中，添加半結晶性聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(14 克)與甲醇(1.4 升)。以一份添加水(500 毫升)，然後慢慢添加另外之水(200 毫升)，直到達成濁點為止。添加聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)

乙基]六氫吡啶-4-基酯之形式II之種晶(50毫克)，並將所形成之混合物在25°C下攪拌3小時，此時已發展成自由流動性漿液。添加水(300毫升)，歷經15分鐘期間，並將所形成之混合物於25°C下攪拌過夜。然後過濾混合物，且以水(100毫升)洗滌濾餅，風乾約2小時，接著在真空及室溫下乾燥48小時，以提供結晶性聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(12.5克，99.6%純度)。此結晶性鹽係被測定為形式II。

實例9

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

步驟A - 4-碘基-2,5-二甲基苯胺

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

步驟B - N-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺

於4-碘基-2,5-二甲基苯胺(37.2克，151毫莫耳)在二氯甲烷(500毫升)中之溶液內，添加碳酸氫鈉(25.4克，302毫莫耳)。

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

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

於 N-(4-碘基-2,5-二甲基苯基)丙烯醯胺(32.2 克，107 毫莫耳)在 N,N-二甲基甲醯胺與異丙醇之 6:1 v/v 混合物(700 毫升)中之溶液內，添加聯苯-2-基胺甲基酸六氫吡啶-4-基酯(36.3 克，123 毫莫耳)。將所形成之混合物於 50°C 下加熱 24 小時，接著在 80°C 下 24 小時。然後，使反應混合物冷卻至室溫，及在真空下濃縮。使殘留物溶於二氯甲烷(1 升)中，並將此溶液以 1N 鹽酸水溶液(500 毫升)、水(500 毫升)、鹽水(500 毫升)及飽和碳酸氫鈉水溶液(500 毫升)洗滌。接著，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，及過濾。添加乙醇(400 毫升)，並使所形成之混合物在真空下濃縮成體積為約 400 毫升，此時沉澱物已形成。過濾沉澱物，及乾燥，而得聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-碘基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(59.6 克，84% 純度，79% 產率)。m/z: $[M+H^+]$ 對 $C_{29}H_{32}IN_3O_3$ 之計算值 598.49；實測值 598.5。

步驟 D - 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲醯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙醯

基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯

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

步驟 E - 聯苯-2-基胺甲基酸

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

使 4-{3-[4-(聯苯-2-基胺甲酯基氧基)六氫吡啶-1-基]丙酯基胺基}-2,5-二甲基苯甲酸甲酯 (49.8 克, 93.9 毫莫耳) 在四氫呋喃 (200 毫升) 中之溶液冷卻至 0°C, 並分次添加氫化鋰鋁 (10.7 克, 281.7 毫莫耳) (10 x 1.07 克)。將所形成之混合物攪拌 3 小時, 然後添加水 (10.7 毫升), 接著為 1N 氫氧化鈉水溶液 (10.7

毫升)與另外之水(32.1毫升)。將此混合物攪拌過夜，接著過濾。於真空下濃縮有機層，並將殘留物與醋酸乙酯混合(約5:1 v/w 醋酸乙酯對殘留物)。將此混合物加熱，直到所有固體物質溶解為止，然後，使溶液冷卻至室溫。過濾所形成之沉澱物，及乾燥，而得聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(24.6克，95%純度，47.5%產率)。使用此物質而無需進一步純化。 m/z : $[M+H^+]$ 對 $C_{30}H_{35}N_3O_4$ 之計算值 502.62；實測值 502.5.

步驟F - 聯苯-2-基胺甲基酸

1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯

於聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-羥甲基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(5.0克，10毫莫耳)在二氯甲烷(200毫升)中之溶液內，添加二異丙基乙胺(8.7毫升，50毫莫耳)與二甲亞砜(5.6毫升，100毫莫耳)。使所形成之混合物冷卻至0°C，並添加三氧化硫吡啶複合物(8.0克，50毫莫耳)。將反應混合物在0°C下攪拌1小時，然後添加水(300毫升)。移除有機層，並以1N鹽酸水溶液(300毫升)及鹽水(300毫升)洗滌。接著，使有機層以無水硫酸鎂脫水乾燥，及過濾。使用所形成之含有聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-甲醯基-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯之溶液，無需進一步純化。 m/z : $[M+H^+]$ 對 $C_{30}H_{33}N_3O_4$ 之計算值 500.60；實測值 500.4.

實例 10

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

使安定地表現無性繁殖人類 hM₁, hM₂, hM₃ 及 hM₄ 毒蕈鹼受體亞型之 CHO 細胞系，個別地在經補充 10% FBS 與 250 微克 / 毫升基因素之 Hams F-12 培養基中生長至幾乎匯合。使細胞在 5% CO₂，37°C 培養器中生長，並以在 dPBS 中之 2 mM EDTA 除去。將細胞藉由 5 分鐘離心分離，在 650 x 克下收集，並將細胞丸粒無論是於 -80°C 下冷凍儲存，或立即製備細胞膜供使用。關於細胞膜製劑，係使細胞丸粒再懸浮於溶胞緩衝劑中，並以 Polytron PT-2100 組織瓦解器 (Kinematica AG; 20 秒 x 2 次爆裂) 均化。於 4°C 下，使粗製細胞膜在 40,000 x 克下離心 15 分鐘。然後，使細胞膜丸粒以再懸浮緩衝劑再懸浮，並以 Polytron 組織瓦解器再一次均化。細胞膜懸浮液之蛋白質濃度係藉由 Lowry 等人, 1951, 生物化學期刊, 193, 265 中所述之方法測得。將全部細胞膜以數液份冷凍儲存於 -80°C 下，或立即使用。所製成 hM₅ 受體細胞膜之液份係直接購自 PerkinElmer 公司 (Wellesley, MA)，並儲存於 -80°C 下直到使用為止。

實例 11

對毒蕈鹼受體之放射配位體結合檢測

對無性繁殖毒蕈鹼受體之放射配位體結合檢測係在 96-井微滴定板中，於總檢測體積為 100 微升中進行。將安定地表現無論是 hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ 或 hM₅ 毒蕈鹼亞型之 CHO 細胞膜，在檢測緩衝液中稀釋至下列專一標的蛋白質濃度 (微克 / 井)：對 hM₁ 為 10 微克，對 hM₂ 為 10-15 微克，對 hM₃ 為 10-20 微克，對 hM₄ 為 10-20 微克，及對 hM₅ 為 10-12 微克，以獲得類

似訊息(cpm)。在檢測板添加之前，將細胞膜短暫地使用 Polytron 組織瓦解器均化(10秒)。用於測定放射配位體之 K_D 值之飽和結合研究，係使用 L-[N-甲基- ^3H]莨菪胺氯化甲烷 (^3H)-NMS) (TRK666, 84.0 Ci/毫莫耳，Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)，在 0.001 nM 至 20 nM 範圍之濃度下進行。用於測定待測化合物 K_i 值之置換檢測，係使用 ^3H -NMS，在 1 nM 及十一種不同待測化合物濃度下進行。首先使待測化合物在稀釋緩衝液中溶解至 400 μM 濃度，然後以稀釋緩衝液連續性地稀釋 5x 至最後濃度範圍從 10 pM 至 100 μM 。對檢測板之添加順序與體積如下：25 微升放射配位體、25 微升經稀釋之待測化合物及 50 微升細胞膜。將檢測板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 60 分鐘。藉由在已於 1% BSA 中預處理過之 GF/B 玻璃纖維濾板(PerkinElmer 公司)上快速過濾，使結合反應終止。將濾板以洗滌緩衝劑(10 mM HEPES)沖洗三次，以移除未結合之放射活性。接著，使板風乾，並將 50 微升 Microscint-20 液態閃爍流體(PerkinElmer 公司)添加至各井中。然後，將板在 PerkinElmer TopCount 液體閃爍計數器(PerkinElmer 公司)上計數。結合數據係藉由非線性回歸分析，使用 GraphPad Prism 包裝軟體(GraphPad 軟體公司，San Diego, CA)，利用單一位置競爭模式進行分析。待測化合物之 K_i 值係使用 Cheng-Prusoff 方程式(Cheng Y; Prusoff WH. (1973) 生化藥理學, 22 (23): 3099-108)，計算自放射配位體所發現之 IC_{50} 值與 K_D 值。使 K_i 值轉化成 pK_i 值，以測定幾何平均與 95% 可信度間隔。然後，將此等摘要統計學轉化回復至 K_i 值，以供數據報告。

在此項檢測中，較低 K_i 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高結合親和力。發現聯苯-2-基胺甲基酸1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(化合物IIa)，對 M_1 ， M_2 ， M_3 ， M_4 及 M_5 毒蕈鹼受體亞型具有 K_i 值低於10 nM。

實例 12

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

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

次。然後，使最後九粒再懸浮於冰冷結合檢測緩衝劑(75 mM Tris/HCl, pH 7.4, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中。細胞膜懸浮液之蛋白質濃度係藉由 Lowry 等人, 1951, 生物化學期刊, 193, 265; 及 Bradford, 分析生物化學, 1976, 72, 248-54 中所述之方法測得。將全部細胞膜以數液份冷凍儲存於 -80°C 下，或立即使用。

實例 13

對人類 β_1 , β_2 及 β_3 腎上腺素能受體之放射配位體結合檢測

結合檢測係在 96-井微滴定板中，於總檢測體積為 100 微升中，使用含有人類 β_1 , β_2 或 β_3 腎上腺素能受體之 10-15 微克膜蛋白質，在檢測緩衝液 (75 mM Tris/HCl, pH 7.4，於 25°C 下，12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中進行。用於測定放射配位體之 K_d 值之飽和結合研究，係使用 [³H]-二氫烯丙心安 (dihydroalprenolol)(NET-720, 100 Ci/毫莫耳, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA) 對 β_1 與 β_2 受體，及 [¹²⁵I]-(-)-碘基氰基品多羅 (cyanopindolol)(NEX-189, 220 Ci/毫莫耳, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA)，在 10 或 11 種範圍從 0.01 nM 至 20 nM 之不同濃度下進行。用於測定待測化合物 K_i 值之置換檢測，係使用 [³H]-二氫烯丙心安 (dihydroalprenolol) 在 1 nM 下，及 [¹²⁵I]-(-)-碘基氰基品多羅 (cyanopindolol) 在 0.5 nM 下，對待測化合物之 10 或 11 種不同濃度範圍從 10 pM 至 10 μ M 下進行。非專一性結合係於 10 μ M 丙嗪羅 (propranolol) 存在下測得。檢測係在 37°C 下培養 1 小時，然後藉由在已於 0.3% 聚乙烯亞胺中預浸泡過之對 β_1 與 β_2 受體為 GF/B 或對 β_3 受體為 GF/C 玻璃纖維濾板

(Packard 生物科技公司, Meriden, CT) 上快速過濾，使結合反應終止。將濾板以過濾緩衝劑 (75 mM Tris/HCl, pH 7.4, 於 4°C 下, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 洗滌三次，以移除未結合放射活性。接著，使板乾燥，並添加 50 微升 Microscint-20 液態閃爍流體 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT)，且將板在 Packard TopCount 液體閃爍計數器 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT) 上計數。結合數據係藉由非線性回歸分析，使用 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，利用單一位置競爭之 3-參數模式進行分析。曲線最低值係被固定為非專一性結合之數值，當於 10 μ M 丙嗪羅 (propranolol) 存在下測定時。待測化合物之 K_i 值係使用 Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng Y 與 Prusoff WH., 生化藥理學, 1973, 22, 23, 3099-108)，計算自放射配位體所發現之 IC₅₀ 值與 K_d 值。

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

實例 14

對毒蕈鹼受體亞型之拮抗作用之功能性檢測

檢測 A - cAMP 蓄積之激動劑所媒介抑制之阻抑

在此項檢測中，待測化合物作為 hM₂ 受體拮抗劑之功能性功效係藉由度量待測化合物在表現 hM₂ 受體之 CHO-K1 細胞

中阻斷弗斯科林(forskolin)所媒介cAMP蓄積之氧震顫素抑制之能力而測得。cAMP檢測係在使用具有 ^{125}I -cAMP (NEN SMP004B, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, MA)之閃光板腺苷基環化酶活化作用檢測系統之放射免疫檢測格式中，根據製造者之說明書進行。將細胞以dPBS沖洗一次，並以胰蛋白酶-EDTA溶液(0.05%胰蛋白酶/0.53 mM EDTA)去除，按上文細胞培養物與細胞膜製劑段落中所述。將已脫離之細胞藉由在650 x克下離心五分鐘，於50毫升dPBS中洗滌兩次。然後，使細胞丸粒再懸浮於10毫升dPBS中，並將細胞以Coulter Z1雙粒子計數器(Beckman Coulter, Fullerton, CA)計數。使細胞再一次於650 x克下離心五分鐘，並再懸浮於刺激緩衝劑中，至檢測濃度為 1.6×10^6 至 2.8×10^6 個細胞/毫升。

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

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

將反應物在37°C下培養10分鐘，並藉由添加100微升冰冷

偵測緩衝劑使其停止。將板密封，在室溫下培養過夜，並於隔天早上，在 PerkinElmer TopCount 液體閃爍計數器 (PerkinElmer 公司, Wellesley, MA) 上計數。所產生之 cAMP 量 (微微莫耳/井) 係以關於試樣所發現之計數及如製造者之使用者手冊中所述之 cAMP 標準為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用非線性回歸單一位置競爭方程式進行分析。Cheng-Prusoff 方程式係用以計算 K_{obs} ，使用氧震顫素濃度-回應曲線之 EC_{50} ，與氧震顫素檢測濃度，個別作為 K_D 與 $[L]$ 。

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

檢測 B - 激動劑所媒介 [3S]GTP γ S 結合之阻抑

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

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

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

為測定待測化合物抑制氧震顫素刺激之 [^3S]GTP γS 結合作用之能力，將下列添加至 96 井板之各井中：具有 [^3S]GTP γS (0.4 nM) 之 25 微升檢測緩衝液，25 微升氧震顫素 (EC_{90}) 與 GDP (3 μM)，25 微升經稀釋之待測化合物，及表現 hM_2 受體之 25 微升 CHO 細胞膜。然後，將檢測板在 37°C 下培養 60 分鐘。將檢測板於 1% BSA-預處理過之 GF/B 濾器上過濾，使用 PerkinElmer 96-井採集器。將板以冰冷洗滌緩衝劑沖洗 3 x 3 秒，然後經空氣或真空乾燥。將 Microscint-20 閃爍液體 (50 微升) 添加至各井，並將各板密封，及在 TopCount (PerkinElmer) 上計數放射活性。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用非線性回歸單一位置競爭方程式進行分析。Cheng-Prusoff 方程式係用以計算 K_{0bs} ，使用待測化合物之濃度-回應曲線之 IC_{50} 值，與氧震顫素在檢測中之濃度，個別作為 K_D 與 $[\text{L}]$ 配位體濃度。

在此項檢測中，較低 K_{0bs} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (化合物 IIa) 在表現 hM_2 受體之 CHO-K1 細胞中對阻抑氧震顫素刺激之 [^3S]GTP γS 結合具有 K_{0bs} 值低於約 10 nM。

檢測 C - 經由 FLIPR 檢測之激動劑所媒介鈣釋出之阻抑

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

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

測定關於氧震顫素之胞內 Ca²⁺ 釋出之劑量依賴性刺激，以致待測化合物可針對氧震顫素刺激，在 EC₉₀ 濃度下度量。首先，將細胞以化合物稀緩衝液培養 20 分鐘，然後添加氧震顫素。氧震顫素之 EC₉₀ 值係根據詳述於下文之 FLIPR 度量與數據還原段落中之方法，並搭配公式 $EC_F = ((F/100-F)^{1/H})^*$ EC₅₀ 而產生。3 x EC_F 之氧震顫素濃度係在刺激板中製備，以致係將氧震顫素之 EC₉₀ 濃度添加至試驗檢測板中之各井。

用於 FLIPR 之參數為：曝光長度 0.4 秒，雷射強度 0.5 瓦特，激發波長 488 毫微米，及發射波長 550 毫微米。基線係在添加氧震顫素之前，藉由度量螢光上之改變，歷經 10 秒而測

得。在氧震顫素刺激之後，FLIPR係連續地度量螢光之改變，每0.5至1秒，歷經1.5分鐘，以捕獲最大螢光變化。

螢光之改變係表示為對各井之最大螢光減去基線螢光。原始數據係藉由非線性回歸，以GraphPad Prism (GraphPad軟體公司, San Diego, CA)，使用S形劑量-回應之內建模式，對著待測化合物濃度之對數進行分析。拮抗劑 K_{obs} 值係藉由Prism，使用氧震顫素 EC_{50} 值作為 K_D ，與氧震顫素對於配位體濃度之 EC_{90} ，根據Cheng-Prusoff方程式(Cheng & Prusoff, 1973)測得。

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

實例 15

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

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

幾乎匯合。為測定 β_3 受體激動劑功效 (EC_{50})，係使安定地表現無性繁殖人類或 β_3 腎上腺素能受體之 CHO-K1 細胞系在經補充 10% FBS 與基因素 (250 微克 / 毫升) 之 Hams F-12 培養基中生長至幾乎匯合。將細胞以 PBS 沖洗，並在含有 2 mM EDTA 或胰蛋白酶-EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶 / 0.53 mM EDTA) 之 dPBS (Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝之鹽水，未具有 $CaCl_2$ 與 $MgCl_2$) 中脫離。在 Coulter 細胞計數器中計數細胞後，使細胞在 1,000 rpm 下，藉由離心分離形成粒狀，並再懸浮於含有 IBMX (PerkinElmer 套件) 而經預溫熱至室溫之刺激緩衝劑中，至 1.6×10^6 至 2.8×10^6 個細胞 / 毫升之濃度。於此項檢測中，每井使用約 40,000 至 80,000 個細胞。將待測化合物 (10 mM 在 DMSO 中) 稀釋至 PBS 中，其含有 0.1% BSA 在 Beckman Biomek-2000 中，並在 100 μ M 至 1 pM 範圍之 11 種不同濃度中測試。使反應物在 37°C 下培養 10 分鐘，並藉由添加含有 125 I-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer 生命科學公司, Boston, M.A.) 之 100 微升冷偵測緩衝劑使其停止。所產生 cAMP 之量 (微微莫耳 / 井) 係以關於試樣所發現之計數與如製造者之使用者手冊中所述之 cAMP 標準作為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析，以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA)，使用 S 形方程式進行分析。Cheng-Prusoff 方程式 (Cheng Y 與 Prusoff WH., 生化藥理學, 1973, 22, 23, 3099-108) 係用以計算 EC_{50} 值。

在此項檢測中，較低 EC_{50} 值表示待測化合物對所測試之受體具有較高功能性活性。發現聯苯-2-基胺氨基酸

1-[2-(4-{[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯(化合物 IIa)對 β_2 腎上腺素能受體具有 EC_{50} 值低於約10 nM；對 β_1 腎上腺素能受體之 EC_{50} 值約30 nM；而對 β_3 腎上腺素能受體之 EC_{50} 值大於700 nM。

實例 16

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

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

於檢測當天, 將細胞以PBS沖洗, 經由以PBS中之5 mM EDTA磨擦而去除, 及計數。使細胞在1,000 rpm下, 藉由離心分離形成粒狀, 並再懸浮於經預熱至37°C之刺激緩衝劑中, 於最後濃度為600,000個細胞/毫升下。於此項檢測中,

細胞係在最後濃度為 100,000 至 120,000 個細胞 / 井下使用。將待測化合物連續性地稀釋至檢測緩衝液 (75 mM Tris/HCl pH 7.4, 於 25°C 下, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 中, 在 Beckman Biomek-2000 中。待測化合物係在檢測中, 於範圍為 10 μ M 至 10 pM 之 11 種不同濃度下測試。使反應物在 37°C 下培養 10 分鐘, 並藉由添加 100 微升冰冷偵測緩衝劑停止。將板密封, 於 4°C 下培養過夜, 並於隔天早上, 在 TopCount 閃爍計數器 (Packard 生物科技公司, Meriden, CT) 上計數。每毫升反應物所產生之 cAMP 量係以關於試樣所發現之計數及如製造者之使用者手冊中所述之 cAMP 標準為基準計算而得。數據係藉由非線性回歸分析, 以 GraphPad Prism 包裝軟體 (GraphPad 軟體公司, San Diego, CA), 使用關於 S 形劑量 - 回應之 4-參數模式進行分析。

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

實例 17

用於測定枝氣管保護性功效與延續時間之 Einthoven 檢測

在此項檢測中, 係使用天竺鼠測定待測化合物之枝氣管保護性功效與延續時間。此項檢測係衍生自 Einthoven (1892) *Pfugers Arch.* 51: 367-445; 與 Mohammed 等人 (2000) *Pulm Pharmacol*

Ther. 13 (6): 287-92 中所述之程序。在此項檢測中，於換氣壓力上之改變係充作氣道阻力之替代度量方式。在以待測化合物預處理之後，毒蕈鹼拮抗劑功效係於丙喏羅 (propranolol) 存在下，使用對靜脈內乙醯甲膽鹼之枝氣管收縮劑劑量-回應曲線測定。同樣地， β_2 激動劑枝氣管保護性功效係使用組織胺測定。合併之枝氣管保護性功效係於丙喏羅不存在下，使用乙醯甲膽鹼測定。

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

在檢測開始之前七十五分鐘，以肌內 (IM) 注射氯胺酮 (43.7 毫克/公斤/ 甲苯噻吡 (3.5 毫克/公斤)/ 乙醯普馬吡 (1.05 毫克/公斤) 之混合物，使天竺鼠麻醉。按需要投予此混合物之補充劑量 (首次劑量之 50%)。單離頸靜脈與頸動脈，並以充填鹽水之聚乙烯導管 (個別為微瑞那散 (renathane) 與 PE-50, Beckton Dickinson, Sparks, MD) 進行插管。將頸動脈連接至壓力傳感器，以允許度量血壓，而頸靜脈套管係用於 IV 注射無論是乙醯甲膽鹼或組織胺。然後，將氣管分割開來，並以 14 克針頭 (#NE-014, 小零件, Miami Lakes, FL) 插管。一旦完成

套管插入法，將天竺鼠使用呼吸器(683型, Harvard裝置公司, MA)進行換氣，設定在每搏量1毫升/100克體重下，但不超過2.5毫升體積，及在每分鐘100搏之速率下。換氣壓力(VP)係在氣管套管中，使用經連接至Biopac (TSD 137C)預放大器之Biopac傳感器度量。體溫係使用加熱墊被保持在37°C下。在起始數據收集之前，以腹膜腔內方式(IP)投予戊巴比妥(25毫克/公斤)，以壓抑自然呼吸，及獲得安定基線。於VP上之改變係被記錄在Biopac Windows數據收集界面上。收集基線值，歷經至少5分鐘，於此段時間後，以非累積方式，使用2-倍增量之枝氣管收縮劑(乙醯甲膽鹼或組織胺)劑量，以IV激發天竺鼠。當使用乙醯甲膽鹼作為枝氣管收縮劑時，將動物以丙喏羅(5毫克/公斤, IV)預處理，以隔離待測化合物之抗毒蕈鹼作用。丙喏羅係在建構對乙醯甲膽鹼或組織胺之劑量回應曲線之前30分鐘投予。

於VP上之改變係使用承認數據收集軟體(Santa Barbara, CA)記錄。在研究完成後，使動物安樂死。

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

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

其中X為劑量之對數，Y為回應。Y係在Min下開始，且漸

近地趨近至 Max，具有 S 形之形狀。

對乙醯甲膽鹼或組織胺之次最高劑量之枝氣管收縮劑回應之抑制百分比，係在待測化合物之各劑量下，使用下列方程式計算：回應之抑制% = $100 - ((\text{尖峰壓力}(\text{於枝氣管收縮劑激發後，經處理}) - \text{尖峰基線壓力}(\text{經處理})) * 100\% / (\text{尖峰壓力}(\text{於枝氣管收縮劑激發後，水}) - \text{尖峰基線壓力}(\text{水})) \times 100$)。抑制作用曲線係使用四參數計算術方程式 GraphPad 軟體吻合。ID₅₀ (為產生枝氣管收縮劑回應之 50% 抑制作用所需要之劑量) 與 Emax (最高抑制) 亦在適當情況下估計。

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

在服藥後 1.5 小時，發現聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基)-2,5-二甲基苯胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 (IIa)，對乙醯甲膽鹼所引致之枝氣管縮小及組織胺所引致之枝氣管縮小兩者，具有 ID₅₀ 低於約 50 微克/毫升。

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

多平 (tiotropium) (10 微克 / 毫升) (毒蕈鹼受體拮抗劑) 顯示顯著枝氣管保護，歷經大於 72 小時。

實例 18

用於測定枝氣管保護性功效與延續時間之體積描記器天竺鼠檢測

在此項檢測中，待測化合物之枝氣管保護性功效與延續時間係使用天竺鼠檢測測定。

體重在 250 與 350 克間之每組 6 隻雄性天竺鼠 (Duncan-Hartley (HsdPoc: DH) Harlan, Madison, WI) 係個別地藉由籠子卡片鑒別。在整個此研究中，係允許動物無限制地獲取食物與水。待測化合物係在全身曝露服藥室 (R&S 模具, San Carlos, CA) 中，經由吸入投藥，歷經 10 分鐘。服藥室係經安排，以致使氣溶膠從中央歧管同時被傳輸至 6 個各別室。使天竺鼠曝露至待測化合物或媒劑 (WFI) 之氣溶膠。氣溶膠係使用 LC 星型霧化罐套組 (22F51 型, PARI 呼吸設備公司, Midlothian, VA)，自水溶液產生，在 22 psi 之壓力下，藉由氣體 ($\text{CO}_2 = 5\%$, $\text{O}_2 = 21\%$, 及 $\text{N}_2 = 74\%$) 之混合物逐出。在此操作壓力下，經過霧化罐之氣流係為每分鐘大約 3 升。所產生之氣溶膠係藉由正壓力驅動至室中。在經氣溶膠化之溶液傳輸期間，未使用稀釋空氣。在 10 分鐘霧化作用期間，大約 1.8 毫升溶液被霧化。此數值係以重量分析方式度量，其方式是將經填充霧化罐之霧化作用前與後之重量作比較。

經由吸入投予之待測化合物之枝氣管保護作用，係在服藥後 1.5、24、48 及 72 小時，使用全身體積描記法評估。在

肺評估開始之前四十五分鐘，以肌內注射氯胺酮(43.75 毫克/公斤)、甲苯噻吡(3.50 毫克/公斤)及乙醯普馬吡(1.05 毫克/公斤)，使各天竺鼠麻醉。將手術位置刮毛，並以 70% 醇清理，及施行頸部腹面之 2 至 3 公分中線切開術。單離頸靜脈，並以充填鹽水之聚乙烯導管(PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD)插管，以允許靜脈內灌注鹽水中之乙醯膽鹼或組織胺。然後，將氣管分割開來，並以 14G 鐵弗龍管件(#NE-014, 小零件, Miami Lakes, FL)插管。若需要則藉由另外肌內注射麻醉混合物，保持麻醉。監測麻醉之深度，而若動物會回應其足掌之夾縮或若呼吸速率每分鐘大於 100 次呼吸，則進行調整。

一旦完成套管插入法，即將動物放置在體積描記器(#PLY3114, Buxco 電子公司, Sharon, CT)中，並插入食管壓力套管(PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD)以度量肺驅動壓力。將鐵弗龍氣管管件連接至體積描記器之開孔，以允許天竺鼠呼吸來自室外部之屋內空氣。然後，將室密封。使用加熱燈以保持體溫，並以 4 毫升空氣，使用 10 毫升校準注射器(#5520 系列, Hans Rudolph, Kansas City, MO)使天竺鼠之肺臟膨大三倍，以確保下氣道未曾陷縮，且動物不會遭遇到換氣過度。

在測定出基線值對順應性為在每公分 H_2O 0.3 至 0.9 毫升之範圍內，及對阻力為在每毫升每秒 0.1 至 0.199 公分 H_2O 之範圍內後，起始肺評估。Buxco 肺度量電腦程式係用於肺數值之收集與衍生。開始此程式係起始實驗擬案與數據收集。

於體積上隨著時間之改變，其係隨著每次呼吸發生在體積描記器內，係經由Buxco壓力傳感器度量。藉由將此信號隨著時間積分，對每次呼吸計算流量之度量值。使用Sensym壓力傳感器(TRD4100)收集之此信號與肺驅動壓力變化，係經由Buxco (MAX 2270)前置放大器連接至數據收集界面(SFT3400與SFT3813)。所有其他肺參數係衍生自此兩種輸入。

收集基線值歷經5分鐘，於此段時間後，以無論是乙醯膽鹼或組織胺激發天竺鼠。當評估待測化合物之毒蕈鹼拮抗劑作用時，丙喏羅(propanolol) (5毫克/公斤，iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)係在以乙醯膽鹼激發之前15分鐘投予。乙醯膽鹼(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0.1毫克/毫升)係自注射泵(sp210iw, 世界精密度儀器公司, Sarasota, FL)，在下列劑量及自實驗開始之開立時間下，以靜脈內方式灌注1分鐘：1.9微克/分鐘，在5分鐘下，3.8微克/分鐘，在10分鐘下，7.5微克/分鐘，在15分鐘下，15.0微克/分鐘，在20分鐘下，30微克/分鐘，在25分鐘下，及60微克/分鐘，在30分鐘下。或者，待測化合物之枝氣管保護作用係在未以丙喏羅預處理之乙醯膽鹼激發模式中評估。

當評估待測化合物之 β_2 腎上腺素能受體激動劑作用時，組織胺(25微克/毫升) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)係自注射泵在下列劑量及自實驗開始之開立時間下，以靜脈內方式灌注1分鐘：0.5微克/分鐘，在5分鐘下，0.9微克/分鐘，在10分鐘下，1.9微克/分鐘，在15分鐘下，3.8微克/分鐘，在20分鐘下，7.5微克/分鐘，在25分鐘下，及15微克/分鐘，在

30分鐘下。若阻力或順應性在各乙醯膽鹼或組織胺劑量後3分鐘未返回基線值，則以4毫升空氣，自10毫升校準注射器，使天竺鼠之肺臟膨大3倍。所記錄之肺參數包括呼吸頻率(每分鐘之呼吸數)、順應性(每公分H₂O之毫升數)及肺阻力(每毫升每秒之公分H₂O)。一旦在此擬案之35分鐘下完成肺功能度量，即將天竺鼠移離體積描記器，並藉由二氧化碳窒息使其安樂死。

數據係以兩種方式之一評估：

(a)肺阻力(R_L) (每毫升每秒之公分H₂O)係計算自壓力上改變對流量上改變之比例。對媒劑與待測化合物計算對乙醯膽鹼(60微克/分鐘，IH)之R_L回應。於媒劑處理動物中之平均乙醯膽鹼回應，在各預處理時間下，係經計算且用以計算乙醯膽鹼回應，在其相應之預處理時間下，在各試驗化合物劑量下之抑制百分比。關於"R_L"之抑制劑量-回應曲線，係以四參數計算術方程式吻合，使用GraphPad Prism Windows 3.00版(GraphPad軟體，San Diego, California)，以估計枝氣管保護性ID₅₀(抑制乙醯膽鹼(60微克/分鐘)枝氣管縮小回應達50%所需要之劑量)。使用下列方程式：

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

其中X為劑量之對數，Y為回應(乙醯膽鹼所引致R_L上增加之抑制百分比)。Y係在Min下開始，且漸近地趨近至Max，具有S形之形狀。

(b) 數量PD₂，其係被定義為造成基線肺阻力加倍所必

須之乙醯膽鹼或組織胺之量，其係使用衍生自流量與壓力之肺阻力值計算，歷經一範圍之乙醯膽鹼或組織胺激發，使用下列方程式(其係衍生自用以計算PC₂₀值之方程式，經描述於美國胸廓學會中，乙醯甲膽鹼與運用激發測試指引-1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000； 161： 309-329)：

$$PD_2 = \text{antilog} \left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

其中：

C₁=在 C₂ 前之乙醯膽鹼或組織胺之濃度

C₂=造成肺阻力(R_L)上至少2-倍增加之乙醯膽鹼或組織胺之濃度

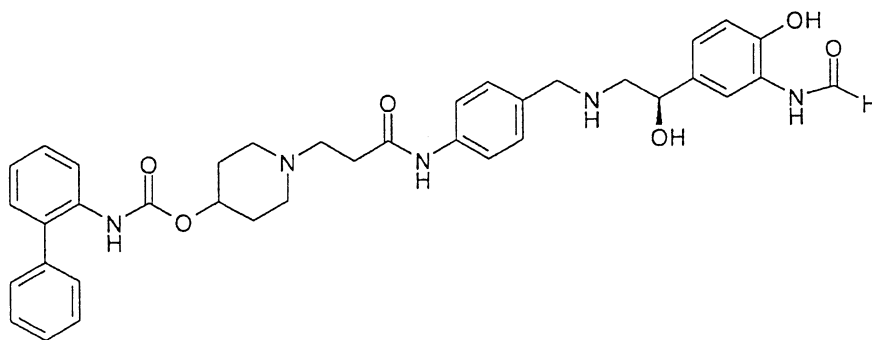
R₀=基線 R_L 值

R₁= C₁ 後之 R_L 值

R₂= C₂ 後之 R_L 值

數據之統計分析係使用二尾式 Student 氏 t-試驗進行。p-值 <0.05 係被認為是有意義。

在 2004 年 8 月 24 日公告之美國專利公報案號 US 2004/0167167A1 中所述之化合物 50，係在此項檢測中測試。化合物 50 之化學結構如下：



比較化合物 50

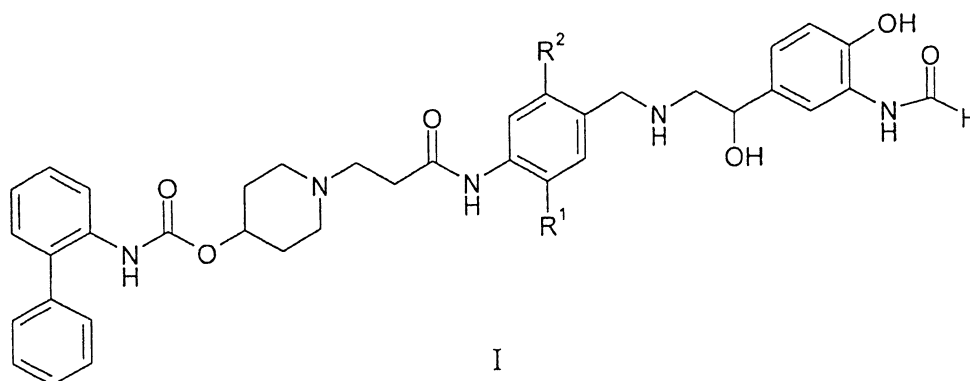
此化合物缺少存在於本發明化合物之苯環上之烷基。在此項檢測中，化合物 50 對於劑量範圍為 3 微克/毫升至 300 微克/毫升，在服藥後 24 小時，未顯示顯著枝氣管保護。對化合物 50 在 24 小時下之 PD_{2x} 值，係類似媒劑(水)組群。

在此項檢測中，沙美特醇(salmeterol) (100 微克/毫升) (β_2 腎上腺素能受體激動劑) 顯示顯著枝氣管保護，歷經至少 24 小時；而提歐多平(tiotropium) (10 微克/毫升) (毒蕈鹼受體拮抗劑) 顯示顯著枝氣管保護，歷經至少 24 小時。

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

五、中文發明摘要：

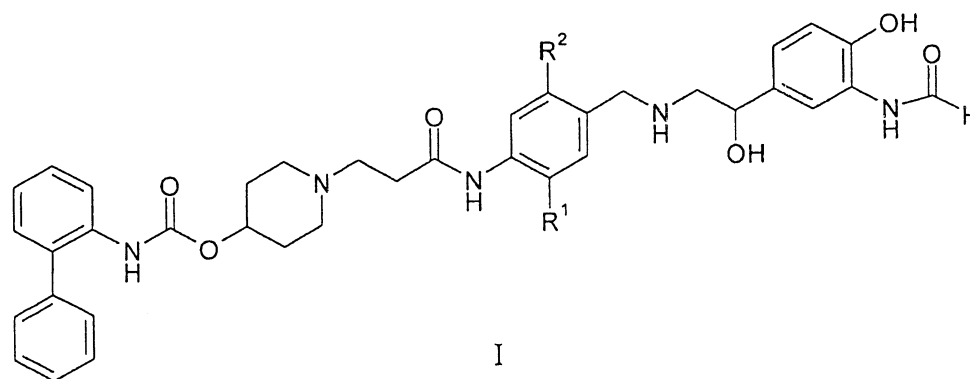
本發明係關於式I化合物：



其中 R^1 與 R^2 均如本專利說明書中之定義，或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物或立體異構物。本發明亦關於包含此種化合物之醫藥組合物與組合，製備此種化合物之方法與中間物，及使用此種化合物以治療例如肺病譬如慢性阻塞肺病與氣喘之方法。

六、英文發明摘要：

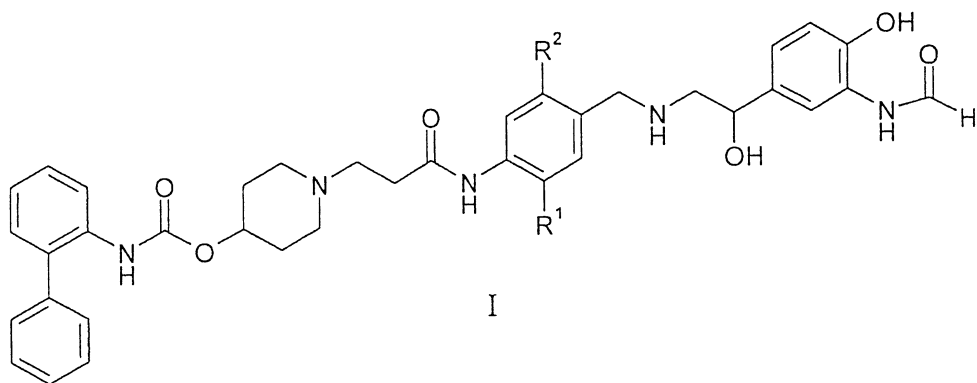
This invention relates to compounds of formula I:



wherein R^1 and R^2 are as defined in the specification, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof. The invention also relates to pharmaceutical compositions and combinations comprising such compounds, processes and intermediates for preparing such compounds, and methods of using such compound to, for example, treat pulmonary disorders, such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma.

十、申請專利範圍：

1. 一種式I化合物：

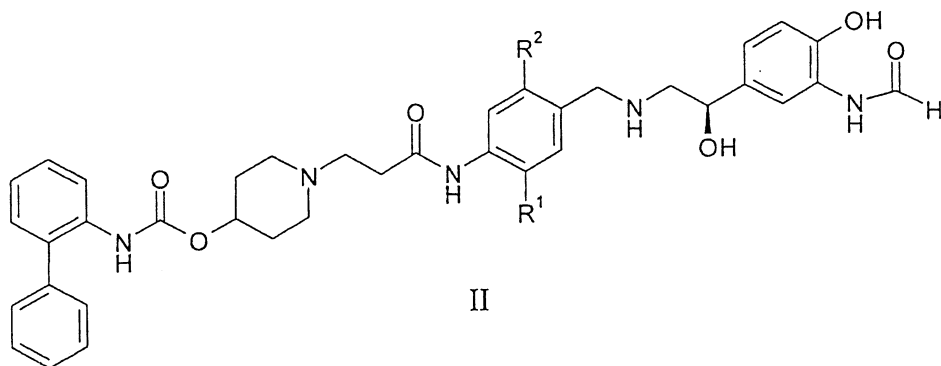


其中

 R^1 為甲基或乙基； R^2 為甲基或乙基；

或其藥學上可接受之鹽或溶劑合物或立體異構物。

2. 如請求項1之化合物，其具有式II：

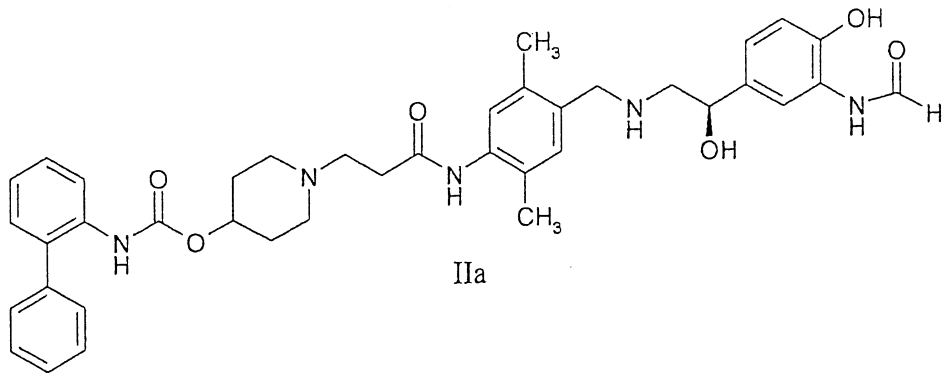


其中

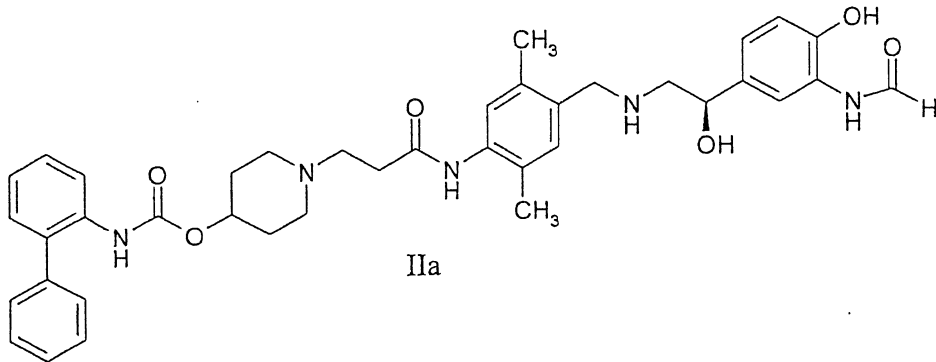
 R^1 為甲基或乙基； R^2 為甲基或乙基；

或其藥學上可接受之鹽。

3. 如請求項1之化合物，其具有式IIa：



4. 如請求項1之化合物，其中化合物為式IIa化合物之藥學上可接受鹽：



5. 一種醫藥組合物，其包含藥學上可接受之載劑與如請求項1至4中任一項之化合物。
6. 一種醫藥組合物，其包含：
- (a) 如請求項1至4中任一項之化合物；
 - (b) 類固醇消炎劑；及
 - (c) 藥學上可接受之載劑。
7. 一種治療劑之組合，其包含：
- (a) 如請求項1至4中任一項之化合物；與
 - (b) 類固醇消炎劑。
8. 一種套件，其包含：
- (a) 第一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項

之化合物與第一種藥學上可接受之載劑；與

(b) 第二種醫藥組合物，其包含類固醇消炎劑與第二種藥學上可接受之載劑；

其中第一種與第二種醫藥組合物係為個別醫藥組合物。

9. 一種如請求項1至4中任一項之化合物於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療慢性阻塞肺病或氣喘。

10. 一種如請求項1至4中任一項之化合物於藥劑製造上之用途，該藥劑係在哺乳動物中產生支氣管擴大作用。

11. 一種如請求項1至4中任一項之化合物於藥劑製造上之用途，該藥劑係在哺乳動物中拮抗毒蕈鹼受體，及催動 β_2 腎上腺素能受體。

12. 一種使用如請求項1至4中任一項之化合物作為研究工具之活體外方法，此方法包括使用如請求項1至4中任一項之化合物進行生物學檢測。

13. 一種在生物學檢測中評估待測化合物之活體外方法，此方法包括：

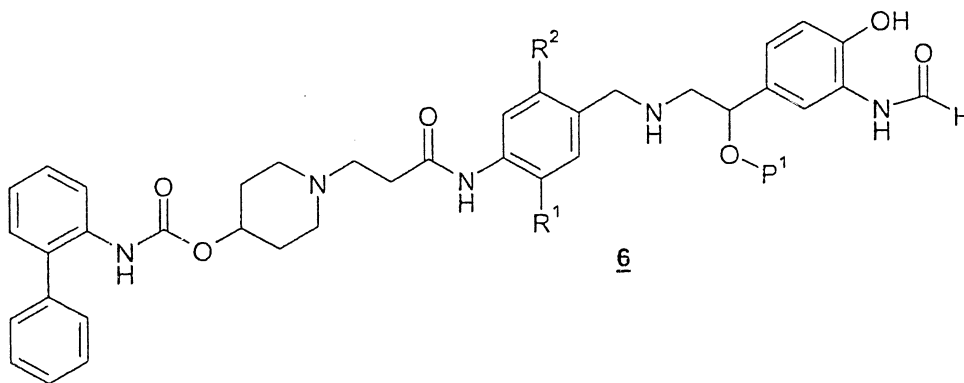
(a) 使用待測化合物進行生物學檢測，以提供第一個檢測值；

(b) 使用如請求項1至4中任一項之化合物進行該生物學檢測，以提供第二個檢測值；其中步驟(a)係無論是在步驟(b)之前、之後或同時進行；及

(c) 將得自步驟(a)之第一個檢測值與得自步驟(b)之第二個檢測值作比較。

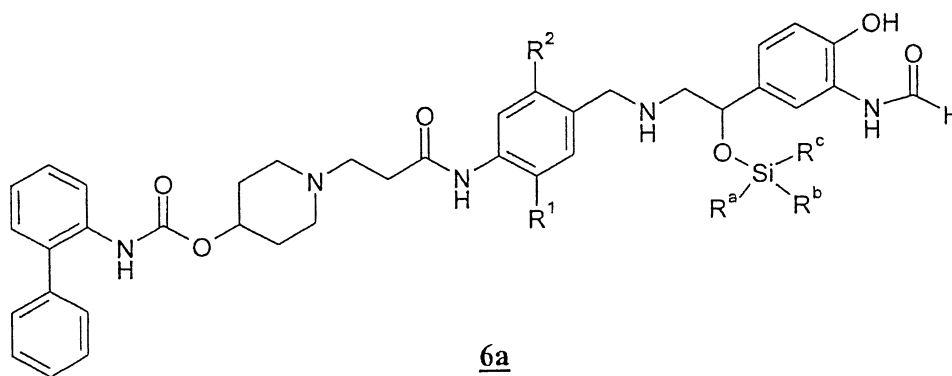
14. 如請求項 13 之方法，其中生物學檢測為毒蕈鹼受體結合檢測或 β_2 腎上腺素能受體結合檢測。

15. 一種製備如請求項 1 之化合物之方法，此方法包括使式 6 化合物去除保護：



其中 P^1 為羥基保護基，以提供式 I 化合物。

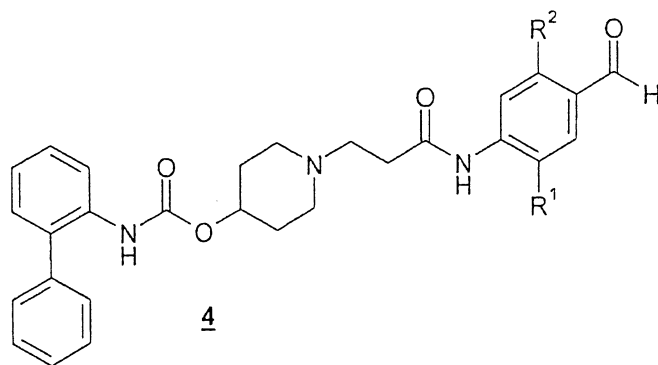
16. 一種製備如請求項 1 之化合物之方法，此方法包括使式 6a 化合物去除保護：



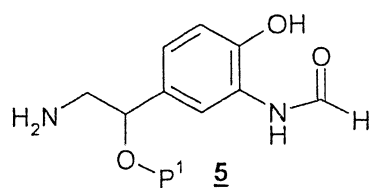
其中 R^a 、 R^b 及 R^c 係獨立選自 C_{1-4} 烷基、苯基、 $-C_{1-4}$ 烷基-(苯基)，或 R^{1a} 、 R^{1b} 及 R^{1c} 之一為 $-O-(C_{1-4}$ 烷基)；以提供式 I 化合物。

17. 一種製備如請求項 1 之化合物之方法，此方法包括：

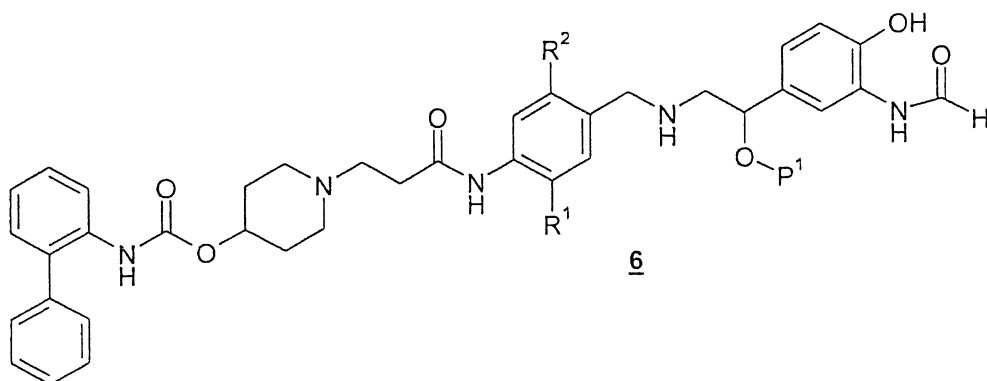
(a) 使式 4 化合物：



與式5化合物：



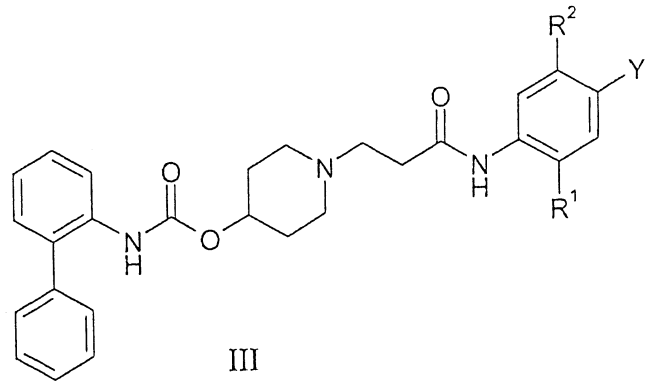
其中P¹為羥基保護基，於還原劑存在下反應，以提供式6化合物：



與

(b) 使式6化合物去除保護，以提供式I化合物。

18. 一種製備如請求項1之化合物之藥學上可接受鹽之方法，此方法包括使呈自由態鹼形式之式I化合物與藥學上可接受之酸接觸。
19. 一種用於製備如請求項1至4中任一項之化合物之中間物，其中此中間物為式III化合物：



其中

Y^1 係選自 $-CHO$ 、 $-CN$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^{3c}$ 、溴基及碘基，其中 R^{3a} 與 R^{3b} 係獨立選自 C_{1-6} 烷基，或 R^{3a} 與 R^{3b} 係接合而形成 C_{2-6} 次烷基， R^{3c} 係選自 C_{1-6} 烷基；

R^1 為甲基或乙基；

R^2 為甲基或乙基；

或其鹽或立體異構物。

20. 如請求項 19 之化合物，其中 R^1 與 R^2 為甲基。

21. 如請求項 19 之化合物，其中 Y^1 為 $-CHO$ 。

22. 如請求項 19 之化合物，其中 Y^1 為 $-CHO$ ；且 R^1 與 R^2 為甲基。

23. 如請求項 4 之化合物，其中化合物為聯苯-2-基胺甲基酸 1-[2-(4-[(R)-2-(3-甲醯胺基-4-羥苯基)-2-羥乙基胺基]甲基}-2,5-二甲基苯基-胺甲醯基)乙基]六氫吡啶-4-基酯 L-酒石酸鹽。

24. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其係供使用於治療上。

25. 一種如請求項 1 至 4 中任一項之化合物於藥劑製造上之用途，該藥劑係用於治療肺病。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

