



(21)申請案號：110105906 (22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/4545(2006.01)* *A61K31/506 (2006.01)*
A61K45/06 (2006.01) *A61P1/16 (2006.01)*

(30)優先權：2020/02/24 美國 62/980,664

(71)申請人：美商輝瑞股份有限公司(美國) PFIZER INC. (US)
 美國

(72)發明人：阿敏 妮塔 AMIN, NEETA BALKRISHAN (ZA)；柏格曼 亞瑟 BERGMAN,
 ARTHUR JAMES (US)；卡爾 羅伯托 CALLE, ROBERTO ARNALDO (US)；艾
 斯勒 威廉 ESLER, WILLIAM PAUL (US)；金 艾伯特 KIM, ALBERT MYUNG
 (US)；菲佛柯 傑弗瑞 PFEFFERKORN, JEFFREY ALLEN (US)；佛赫斯特 派
 崔克 VERHOEST, PATRICK ROBERT (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：27 共 148 頁

(54)名稱

用於治療 N A F L D / N A S H 及相關疾病之組合

(57)摘要

一種以治療有效量的組成物治療脂肪肝疾病及相關疾病或疾患之方法，該組成物包含約 25 mg 至約 1200 mg 之(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 40 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

A method for treating fatty liver disease and related diseases or disorders with a therapeutically effective amount of a composition comprising from about 25 mg to about 1200 mg of (S)-2-(5-((3-ethoxypyridin-2-yl)oxy)pyridin-3-yl)-N-(tetrahydrofuran-3-yl)pyrimidine-5-carboxamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and from about 5 mg to about 40 mg of 4-(4-(1-Isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-6-methoxypyridin-2-yl)benzoic acid or a pharmaceutically acceptable salt thereof.



202140004

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療 N A F L D / N A S H 及相關疾病之組合

【英文發明名稱】

COMBINATIONS FOR TREATMENT OF NAFLD/NASH AND
RELATED DISEASES

【中文】

一種以治療有效量的組成物治療脂肪肝疾病及相關疾病或疾患之方法，該組成物包含約 25 mg 至約 1200 mg 之 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 40 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【英文】

A method for treating fatty liver disease and related diseases or disorders with a therapeutically effective amount of a composition comprising from about 25 mg to about 1200 mg of (S)-2-(5-((3-ethoxypyridin-2-yl)oxy)pyridin-3-yl)-N-(tetrahydrofuran-3-yl)pyrimidine-5-carboxamide or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and from about 5 mg to about 40 mg of 4-(4-(1-Isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-6-methoxypyridin-2-yl)benzoic acid or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療 N A F L D / N A S H 及相關疾病之組合

【英文發明名稱】

COMBINATIONS FOR TREATMENT OF NAFLD/NASH AND
RELATED DISEASES

【技術領域】

本發明關於用於治療脂肪肝疾病及其相關疾病之新型醫藥組成物，其包含(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【先前技術】

非酒精性脂肪肝炎(NASH)為非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD，經定義為 $\geq 5\%$ 之肝脂肪變性的存在)之臨床及組織學子集，其係與增加的所有原因死亡率、硬化和晚期肝病、增加的心血管死亡率及增加的肝相關癌症和非肝相關癌症兩者發病率相關聯(Sanyal等人之 *Hepatology* 2015;61(4):1392-1405)。NAFLD為代謝症候群之肝表現，且為包含脂肪變性、NASH、纖維化、硬化和最終肝細胞

癌的一系列肝臟病症。NAFLD及NASH被認為是主要的脂肪肝疾病，因為在具有升高的膽固醇之個人中以彼等佔最大比例。NAFLD/NASH的嚴重性係以脂質的存在、發炎細胞浸潤、肝細胞空泡樣變性(hepatocyte ballooning)及纖維化程度為基礎。目前，治療選擇僅限於相關病症的管理(EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines, *J. Hepatol.* 2016;64(6):1388-1402)。

據推測脂質代謝的變化促成NAFLD及NASH之分子發病機制。脂肪變性為NASH之發病機制所必要的，但不為充分的要素(Day C.和James O.之*Hepatology.* 1998; 27(6):1463-6)。與此一致，多項研究證明脂肪變性的嚴重度預示著伴隨脂肪肝炎的風險以及進展成硬化的風險(Sorensen等人之*Lancet.* 1984; 2(8397): 241-4；Wanless I和Lentz J之*Hepatology* 1990;12(5):1106-10；Reeves H,等人之*J. Hepatol.* 1996; 25(5): 677-83)。肝脂肪變性為三酸甘油酯生產/攝入肝中及清除/移除不平衡的結果(Cohen JC等人之*Science.* 2011; 332(6037):1519-1523)。據推測減少脂肪變性(支撐NAFLD/NASH發展之代謝驅動子)導致後續改善的肝發炎和纖維化。

乙醯基-CoA羧酶(ACC)及二醯基甘油醯基轉移酶2(DGAT2)為調控脂質代謝之關鍵酵素。ACC催化在內生性脂質生成(de novo lipogenesis)(DNL)過程中的必要及限速步驟(Saggerson D之*Annu. Rev. Nutr.* 2008; 28:253-72.)。再者，ACC亦通過酵素肉鹼棕櫚醯基轉移酶1(CPT1)之別位

調控來調控脂肪酸之粒腺體 β 氧化 (Saggerson, 2008 ; Waite M. 和 Wakil SJ. 之 *J. Biol. Chem.* 1962;237:2750-2757)。新出現的數據亦示意通過 ACC 抑制之 DNL 抑制可藉由限制分泌輔助性 T 細胞 17 譜系的 T 細胞 (Th17 細胞) 之發炎性介白素 -17 (IL-17) 的形成及有利於抗發炎性 FoxP3(+) 調控性 T (Treg) 細胞的發展而直接減少發炎 (Berod L 等人之 *Nat. Med.* 2014; 20(11): 1327-33)。

假設 ACC 活性之抑制係以至少兩種獨立的機制而有利於患有 NASH 的患者。如上文總結，患有 NAFLD 的人類顯示明顯升高的肝臟 DNL 且假設通過藥理學肝臟 ACC 抑制而使此增加的通量正常化以減少脂肪變性。另外，ACC 抑制劑對增加脂肪酸氧化的效應亦可能促成降低肝脂肪含量。與此一致，ACC 抑制劑已顯示出抑制 DNL。參見 Griffith DA 等人之 *J. Med. Chem.* 2014;57(24):10512-10526 ; Kim CW 等人之 *Cell Metab.* 2017;26, 394-406 ; Stiede K. 等人之 *Hepatology.* 2017;66(2):324-334 ; Lawitz EJ 等人之 *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 (<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.042>)。另外，預期在分泌 IL-17 之 T 細胞中的 DNL 抑制係藉由限制發炎性 Th17 細胞的形成 (Berod 等人, 2014) (該形成可為 NASH 發病機制中重要的途徑) (Rau M 等人之 *J. Immunol.* 2016;196(1):97-105) 及有利於抗發炎性 Treg 細胞的發展而抑制肝發炎。再者，ACC 抑制可降低星狀細胞活化和纖維化 (Ross 等人, 2019)。

三酸甘油酯或三醯基甘油(TG)代表哺乳動物中的主要能量儲存形式。TG係藉由甘油與三種不同的鏈長度及飽和度之脂肪酸依序酯化而形成(Coleman, R. A.和Mashek, D. G.之2011. *Chem. Rev.* 111: 6359-6386)。在腸或肝內合成之TG分別被包裹在乳糜微粒或極低密度脂蛋白(VLDL)中且輸出至周邊組織，彼等在此以脂蛋白脂酶(LPL)水解成彼等的脂肪酸及甘油成分。所得未酯化之脂肪酸(NEFA)可經代謝而進一步生產能量或經再酯化且儲存。

在正常的生理條件下，能量密集型TG係於各種脂肪儲庫中維持螯合，直到要求其釋放為止，其隨之水解成甘油及游離脂肪酸，接著釋放至血流中。此過程係藉由胰島素及激素(諸如兒茶酚胺)之逆向作用而嚴格地調控，其促進TG儲存物在各種生理條件下沉積及移動。在餐後設定中，胰島素起作用以抑制脂肪分解，由此限制以NEFA形式之能量釋放且確保膳食脂質適當的儲存於脂肪儲庫中。然而，在患有第2型糖尿病的患者中，胰島素抑制脂肪分解的能力得到改善且來自脂肪細胞的NEFA通量不當地升高。這依次導致遞送至組織(諸如肌肉和肝)的脂質增加。在沒有能量需求下，TG及其他的脂質代謝物(諸如二醯基甘油(DAG))可蓄積且造成胰島素敏感度喪失(Erion, D. M.和Shulman, G. I.之2010. *Nat Med* 16: 400-402)。在肌肉中的胰島素抗性係以降低的葡萄糖攝取及肝糖儲存為特徵，而在肝中失去的胰島素傳訊引起失調的葡萄糖輸出量及過量生產富含TG之VLDL(第2型糖尿病的特點)(Choi, S. H.和

Ginsberg, H. N.之2011. *Trends Endocrinol. Metab.* 22: 353-363)。升高的富含TG之VLDL (亦稱為VLDL1粒子)分泌被視為刺激小而密的低密度脂蛋白(sdLDL)之生產，該脂蛋白為LDL之促動脈粥樣硬化次片段，其與升高的冠狀動脈心臟病風險相關聯 (St-Pierre, A. C. 等人之2005. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 553-559)。

在哺乳動物中有兩種二醯基甘油醯基轉移酶(DGAT)酵素(DGAT1和DGAT2)已特徵化。儘管該等酵素催化相同的酵素反應，但是彼等各自的胺基酸序列不相關且彼等佔據不同的基因家族。錨定編碼DGAT1之基因破壞的小鼠對膳食誘發之肥胖具有抗性且具有升高的能量消耗及活性 (Smith, S. J.等人之2000. *Nat Genet* 25: 87-90)。Dgat1^{-/-}小鼠展現失調的乳糜微粒吸收後釋放且蓄積脂質於腸細胞中 (Buhman, K. K.等人之2002. *J. Biol. Chem.* 277: 25474-25479)。在該等小鼠中觀察的代謝上有利的表現型示意由失去的腸內DGAT1表現來驅動 (Lee, B.等人之2010. *J. Lipid Res.* 51: 1770-1780)。儘管在雌性Dgat1^{-/-}小鼠中有泌乳缺陷，但重要的是該等動物保留合成TG的能力，示意有另外的DGAT酵素存在。此觀察及自真菌深黃被孢黴 (*Mortierella rammaniana*)分離的第二DGAT引導對DGAT2之鑑定及特徵化 (Yen, C. L.等人之2008. *J. Lipid Res.* 49: 2283-2301)。

DGAT2高度表現於肝及脂肪中且展現對DAG敏銳的受質特異性，不像DGAT1 (Yen, C.L., 2008)。在嚙齒動物中

的 DGAT2 基因缺失導致有缺陷的子宮內生長、嚴重的脂血症、受損的皮膚屏障功能及早期的產後死亡 (Stone, S. J. 等人之 2004. *J. Biol. Chem.* 279: 11767-11776)。由於失去 DGAT2 所引起的致死率，吾等對 DGAT2 之生理學角色的大多數理解係源自於代謝疾病之啮齒動物模式中的反義寡核苷酸 (ASO) 執行之研究。在此設定中，肝 DGAT2 之抑制導致血漿脂蛋白分布的改進 (降低總膽固醇和 TG) 及肝脂質負荷的降低，其伴隨改善的胰島素敏感度及全身葡萄糖控制 (Liu, Y. 等人之 2008. *Biochim. Biophys. Acta* 1781: 97-104; Choi, C. S. 等人之 2007. *J. Biol. Chem.* 282: 22678-22688; Yu, X. X. 等人之 2005. *Hepatology* 42: 362-371)。儘管未完全闡明構成該等觀察的基礎之分子機制，但是顯然 DGAT2 之抑制導致編碼涉及脂肪生成的蛋白質 (包括結合固醇調控元件之蛋白質 1c (SREBP1c) 和硬脂醯基 CoA 去飽和酶 1 (SCD1)) 之多重基因的表現調降 (Choi, 2007; Yu, 2005)。同時誘發氧化途徑，如以增加的基因 (諸如肉鹼棕櫚醯基轉移酶 1 (CPT1)) 表現證明 (Choi, 2007)。該等變化的淨結果為降低肝的 DAG 及 TG 脂質含量，其依次導致改善的肝內胰島素反應。此外，DGAT2 抑制作用抑制肝的 VLDL TG 分泌及降低循環膽固醇含量。最終，血漿脂蛋白元 B (APOB) 含量受到抑制，可能由於減少用於新合成之 APOB 蛋白質的脂質化之 TG 供應 (Liu, 2008; Yu, 2005)。DGAT2 抑制作用對血糖控制及血漿膽固醇分布兩者的有利效應示意此標的可能具有治療代謝疾病的價值 (Choi,

2007)。另外，抑制 DGAT2 活性導致降低的肝脂質蓄積之觀察示意此酵素之抑制劑可能具有治療 NASH 的效用。

鑑於上文，對含有 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺 (DGAT2 抑制劑) 或其醫藥上可接受的鹽及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸 (ACCI 抑制劑) 或其醫藥上可接受的鹽之組合的藥劑 (例如經口藥劑) 仍存有需求。本文所述之特定組合滿足現有需求。

【發明內容】

本發明係針對治療選自下列的疾病或病症之方法：脂肪肝；非酒精性脂肪肝疾病；非酒精性脂肪肝炎；伴有肝纖維化之非酒精性脂肪肝炎；伴有硬化之非酒精性脂肪肝炎；及伴有硬化與伴有肝細胞癌或伴有代謝相關疾病之非酒精性脂肪肝炎，該方法包含以下步驟：對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約 5 mg 至約 1200 mg 之 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 60 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

本發明亦針對治療選自下列的疾病或病症之方法：脂肪肝；酒精性脂肪肝疾病；酒精性脂肪肝炎；酒精性脂肪

肝炎伴有肝纖維化；伴有硬化之酒精性脂肪肝炎；及伴有硬化與伴有肝細胞癌或伴有代謝相關疾病之酒精性脂肪肝炎，該方法包含以下步驟：對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約 5 mg 至約 1200 mg 之 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 60 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

本發明亦針對治療選自下列的心血管疾病或病症之方法：動脈粥樣硬化症、中風、心肌梗塞、主動脈血管疾病、腦血管疾病、腎血管疾病、心衰竭、心房震顫或冠狀動脈心臟病，該方法包含以下步驟：對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約 5 mg 至約 1200 mg 之 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 60 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

本發明亦針對治療選自下列的代謝疾病或病症之方法：肥胖症、異常血脂症、第2型糖尿病、患有第2型糖尿病的患者之血糖控制、葡萄糖耐受不良(IGT)病症、空腹血漿葡萄糖不良病症、代謝症候群、症候群 X、高血糖症、高胰島素血症、胰島素抗性或葡萄糖代謝不良，該方

法包含以下步驟：對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約5 mg至約1200 mg之(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約5 mg至約60 mg之4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

應理解上文的概括說明及下文的詳細說明僅為例示及解釋而已，並非限制如所請求之本發明。

【圖式簡單說明】

[圖1]為顯示實施例1的DGAT2i化合物(化合物D)之結晶形式1的特徵性x射線粉末繞射圖案(垂直軸：強度(CPS)；水平軸： 2θ (度))。

[圖2]為顯示實施例1的DGAT2i化合物(化合物D)之結晶形式2的特徵性x射線粉末繞射圖案(垂直軸：強度(CPS)；水平軸： 2θ (度))。

[圖3]顯示在配備有Cu輻射源之Bruker AXS D4 Endeavor繞射儀上進行的實施例2(化合物A)之形式1的例證性PXRD圖案。

[圖4]顯示使用附著至FT-IR工作臺的Nicolet NXR FT拉曼配件收集的實施例2(化合物A)之形式1的例證性拉曼光譜。

[圖5]顯示在設置於Bruker-BioSpin Avance III 500

MHz (^1H 頻率) NMR光譜儀中的Bruker-BioSpin CPMAS探針上進行的實施例2(化合物A)之形式1的例證性 ^{13}C ssNMR圖案。

[圖6]顯示在配備有Cu輻射源之Bruker AXS D4 Endeavor繞射儀上進行的實施例2(化合物A)之形式2的例證性PXRD圖案。

[圖7]顯示使用附著至FT-IR工作臺的Nicolet NXR FT拉曼配件收集的實施例2(化合物A)之形式2的例證性拉曼光譜。

[圖8]顯示在設置於Bruker-BioSpin Avance III 500 MHz (^1H 頻率) NMR光譜儀中的Bruker-BioSpin CPMAS探針上進行的實施例2(化合物A)之形式2的例證性 ^{13}C ssNMR圖案。

[圖9]顯示實施例2(化合物A)之形式2的例證性單晶結構。

[圖10]總結在進食狀態下所測量之以西方膳食餵食的Sprague Dawley大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物A及化合物D對血漿三酸甘油酯含量的效應。

[圖11]總結在空腹狀態下所測量之以西方膳食餵食的Sprague Dawley大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物A及化合物D對血漿三酸甘油酯含量的效應。

[圖12]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物A及化合物D對SREBP-1核定位的效應。

[圖 13]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟脂質生成基因表現(尤其為乙醯基-CoA 羧酶 (ACC1))的效應。

[圖 14]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟脂質生成基因表現(尤其為脂肪酸合成酶 (FASN))的效應。

[圖 15]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟脂質生成基因表現(尤其為固醇-CoA 去飽和酶 (SCD1))的效應。

[圖 16]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟脂質生成基因表現(尤其為固醇調控性元件-結合蛋白 1c (SREBP-1c))的效應。

[圖 17]總結在以西方膳食餵食的大鼠中作為單一療法及組合投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟脂質生成基因表現(尤其為前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶 (proprotein convertase subtilisin)/kexin 型 9 (PCSK9))的效應。

[圖 18]總結在西方膳食餵食的 Sprague Dawley 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟三酸甘油酯含量的效應。

[圖 19]總結在以缺乏膽鹼及高脂肪膳食 (CDAHFD) 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝彈性(肝發炎和纖維化之標誌)的效應。

[圖 20]總結在以 CDAHFD 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟 α 平滑肌動蛋白 (α SMA) 免疫組織化學 (肌纖維母細胞活化和纖維生成之標誌) 的效應。

[圖 21]總結在以 CDAHFD 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟天狼星紅 (Picosirius red) 染色的效應。

[圖 22]總結在以 CDAHFD 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟 α 平滑肌動蛋白 (α SMA) 基因表現的效應。

[圖 23]總結在以 CDAHFD 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對肝臟膠原蛋白 1A1 基因表現的效應。

[圖 24]總結在以 CDAHFD 餵食之雄性 Wistar Hann 大鼠中作為單一療法及組合經口投予之化合物 A 及化合物 D 對離子化鈣結合轉接子分子 1 染色的效應。

[圖 25a]顯示本文所述之第 2A 期研究的治療分組之 WLF 數據的盒鬚圖 (Box-and-Whisker plot)。

[圖 25b]顯示具有大於或等於 30% 之肝脂肪降低的個體 %。

[圖 25c]顯示具有大於或等於 50% 之肝脂肪降低的個體 %。

[圖 26]顯示本文所述之第 2A 期研究的血清三酸甘油酯自基線的百分比變化之最小平方平均值及 90% 之 CI 的標繪

圖。

[圖 27a]顯示本文所述之第2A期研究的丙胺酸轉胺酶(ALT)自基線的百分比變化之最小平方平均值及90%之CI的標繪圖。

[圖 27b]顯示本文所述之第2A期研究的天門冬胺酸轉胺酶(AST)自基線的百分比變化之最小平方平均值及90%之CI的標繪圖。

[圖 27c]顯示本文所述之第2A期研究的鹼性磷酸酶自基線的百分比變化之最小平方平均值及90%之CI的標繪圖。

[圖 27d]顯示本文所述之第2A期研究的 γ 麩胺醯基轉移酶(GGT)自基線的百分比變化之最小平方平均值及90%之CI的標繪圖。

【實施方式】

本發明可藉由參考下列詳細說明的本發明之例示性實施態樣及其中所包括的實施例而更輕易地理解。

應理解本發明不限於構成之特定的合成方法，其當然可能改變。亦應理解本文所使用之術語僅出於說明特定的實施態樣之目的，且不意欲為限制。在本說明書及隨後的申請專利範圍中，將參考許多經定義而具有下列意義的術語：

如本文於說明書中所使用之「一(a)」或「一(an)」可意指一或更多。如本文於申請專利範圍中的使用，當與單

字「包含」結合使用時，則單字「一(a)」或「一(an)」可意指一或超過一。如本文所使用之「另一」可意指至少第二或更多。

術語「約」係指相對術語，表示其所指之標稱值加或減10%之近似值。就本揭示之領域而言，此近似水平為適當的，除非具體地陳述該值需要更窄的範圍。

當本文使用「化合物」時，其包括本文所述之化合物或任何醫藥上可接受的衍生物或變型，包括構形異構物(例如順式和反式異構物)及所有光學異構物(例如鏡像異構物和非鏡像異構物)，此等異構物之消旋性、非鏡像異構性和其他混合物，以及溶劑合物、水合物、同晶形物(isomorph)、多晶形物、互變異構物、酯、鹽形式及前藥。詞句「前藥」係指為藥物前驅物之化合物，其在投予後經由一些化學或生理過程而於活體內釋放藥物(例如前藥在達到生理pH時或通過酵素作用轉化成所欲藥物形式)。例示性前藥在裂解時釋放對應的游離酸，且本發明化合物之形成可水解酯的此等殘基包括但不限於具有羧基部分的該等殘基，其中游離氫係經下列者置換： (C_1-C_4) 烷基、 (C_2-C_7) 烷醯氧基甲基、具有4至9個碳原子的1-(烷醯氧基)乙基、具有5至10個碳原子的1-甲基-1-(烷醯氧基)-乙基、具有3至6個碳原子的烷氧基羰氧基甲基、具有4至7個碳原子的1-(烷氧基羰氧基)乙基、具有5至8個碳原子的1-甲基-1-(烷氧基羰氧基)乙基、具有3至9個碳原子的N-(烷氧基羰基)胺基甲基、具有4至10個碳原子的1-(N-(烷氧基羰基)胺

基)乙基、3-酞基、4-巴豆酸內酯基(crotonolactonyl)、 γ -丁內酯-4-基、二-N,N-(C₁-C₂)烷基胺基(C₂-C₃)烷基(諸如 β -二甲基胺基乙基)、胺甲醯基-(C₁-C₂)烷基、N,N-二(C₁-C₂)烷基胺甲醯基-(C₁-C₂)烷基和哌啶基-、吡咯啶基-或N-嗎啉基(C₂-C₃)烷基。

「患者」係指溫血動物，諸如天竺鼠、小鼠、大鼠、沙鼠、貓、兔、狗、牛、山羊、綿羊、馬、猴、黑猩猩和人類。「哺乳動物」為患者。

以「醫藥上可接受的」意指物質或組成物必須與構成調配物的其他成分及/或以其治療之哺乳動物在化學上及/或毒物學上可相容。

如本文所使用之下列術語具有用於投予醫藥劑的通用意義：QD意指每天一次及BID意指每天兩次。

如本文所使用之術語「選擇性」或「選擇的」係指化合物在第一檢定中的效應比相同化合物在第二檢定中的效應大。例如，在「腸選擇性」化合物中，第一檢定係用於化合物在腸中的半生期及第二檢定係用於化合物在肝中的半生期。

「治療有效量」意指治療本文所述之特定疾病、病症或疾患的本文所述之化合物的量。「治療有效量」亦可意指治療本文所述之特定疾病、病症或疾患的4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸的量與(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺的量

之組合，視需要地與另一化合物的量之組合。

如本文所使用之術語「治療 (treating)」、「治療 (treat)」或「治療 (treatment)」包含預防性 (preventative)，亦即預防性 (prophylactic)；舒減治療，亦即減輕、緩解或減緩患者的疾病(或病症)進展或與疾病(或病症)相關聯的任何組織損傷；及逆轉，其中患者的疾病(或病症)不僅緩解，且與疾病(或病症)相關聯的任何組織損傷處於比開始治療時更好的狀態。這後者可能出現例如但不限於下列中任何一或多者：NASH消退的證明及/或改進基於肝生檢之纖維化評分；進展成肝硬化、肝細胞癌及/或其他肝相關結果的發生率更低；減少或改善基於血清或影像之非酒精性脂肪肝炎活性標誌含量；降低或改善非酒精性脂肪肝炎疾病活性；或降低非酒精性脂肪肝炎之醫學後果。

本發明化合物可含有不對稱或手性中心，且因此以不同的立體異構物形式存在。除非另有其他指定，意欲使本發明化合物之所有立體異構物形式及其混合物(包括消旋性混合物)構成本發明的一部分。另外，本發明包含所有的幾何及位置異構物。例如，若本發明化合物併入雙鍵或稠合環，則順式和反式形式二者以及混合物皆包含在本發明之範圍內。

本發明之手性化合物(及其手性前驅物)可使用層析術(通常為高壓液相層析術(HPLC)或超臨界流體層析術(SFC))在具有不對稱靜止相及由含有0至50%之異丙醇(通常為2%至20%)及0至5%之烷胺(通常為0.1%之二乙胺

(DEA)或異丙胺)之烴(通常為庚烷或己烷)所組成的移動相之樹脂上以富集鏡像異構性形式獲得。溶析物的濃縮供給富集之混合物。

非鏡像異構物混合物可以那些熟習本技術領域者熟知的方法(諸如以層析術及/或分段結晶)以其物理化學差異為基礎而分離成彼等個別的非鏡像異構物。鏡像異構物可由以下方式分離：將鏡像異構物混合物與適當的光學活性化合物(例如手性助劑，諸如手性醇或莫雪(Mosher)氏醯基氯)反應而轉化成非鏡像異構物混合物，將非鏡像異構物分離且將個別的非鏡像異構物轉化(例如水解)成對應的純鏡像異構物。鏡像異構物亦可使用手性HPLC管柱分離。另一選擇地，特定的立體異構物可藉由以下方式合成：使用光學活性起始材料，使用光學活性試劑、受質、觸媒或溶劑之不對稱合成法，或一種立體異構物以不對稱變換而轉化成另一者。

在本發明化合物具有二或更多個立體中心且於名稱中給出絕對或相對立體化學的情況下，標示R和S分別係指根據用於各分子之習知的IUPAC編號方案而以升序編號(1、2、3等等)的各立體中心。在本發明化合物具有一或多個立體中心且未於名稱或結構中給出立體化學的情況下，應理解名稱或結構意欲包含化合物的所有形式，包括消旋物形式。

亦有可能使本發明中間物及化合物可以不同的互變異構物形式存在，且所有此等形式皆包含在本發明之範圍

內。術語「互變異構物」或「互變異構物形式」係指經由低能量屏障可相互轉化的不同能量之結構異構物。例如，質子互變異構物(亦稱為質子轉移互變異構物(*prototropic tautomer*))包括經由質子遷移的相互轉化，諸如酮-烯醇及亞胺-烯胺異構化。

價鍵互變異構物包括以一些鍵結電子重組的相互轉化。

在本發明所主張之化合物的範圍內包括本發明化合物的所有立體異構物、幾何異構物及互變異構物形式，包括展現超過一種類型的異構現象之化合物及其一或多者之混合物。亦包括酸加成鹽或鹼鹽，其中相對離子具有光學活性，例如D-乳酸鹽或L-離胺酸；或消旋性，例如DL-酒石酸鹽或DL-精胺酸。

本發明包括所有醫藥上可接受的經同位素標記之本發明化合物，其中一或多個原子係經具有相同的原子數但原子質量或質量數與經常於自然中發現之原子質量或質量數不同的原子置換。

適合於包含在本發明化合物中之同位素的實例包括下列的同位素：氫(諸如 ^2H 和 ^3H)、碳(諸如 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C)、氯(諸如 ^{36}Cl)、氟(諸如 ^{18}F)、碘(諸如 ^{123}I 、 ^{124}I 和 ^{125}I)、氮(諸如 ^{13}N 和 ^{15}N)、氧(諸如 ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O)、磷(諸如 ^{32}P)及硫(諸如 ^{35}S)。

特定的經同位素標記之本發明化合物(例如那些併入放射性同位素者)可用於藥物及/或受質組織分布研究。放

射性同位素氘(亦即 ^3H)及碳-14(亦即 ^{14}C)係鑑於彼等容易併入及現成的檢測方式而特別有用於此目的。

以較重的同位素(諸如氘，亦即 ^2H)取代可由於更大的代謝穩定性而供給特定的治療優勢，例如增加的活體內半生期或減少的劑量需求，且因此在一些情況下可能較佳。

以正電子發射同位素(諸如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N)取代可用於檢查受質受體佔有率之正電子發射斷層攝影術(PET)研究。

經同位素標記之本發明化合物通常可以那些熟習本技術領域者已知的習知技術製備，或可以類似於那些在所附實施例及製備例中所述之方法使用適當的經同位素標記之試劑代替先前所使用的未經標記之試劑來製備。

可將本發明化合物分離且以本身形式使用，或可能時以其醫藥上可接受的鹽形式使用。術語「鹽」係指本發明化合物之無機鹽和有機鹽。該等鹽可在化合物的最終分離及純化期間當場製備，或以適合的有機或無機酸或鹼分開處理化合物且分離因此形成之鹽來製備。用於製備本發明之前述鹼化合物之醫藥上可接受的酸加成鹽之酸為那些形成無毒性酸加成鹽之酸(亦即含有藥理上可接受的陰離子之鹽，諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、乙酸鹽、乳酸鹽、檸檬酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、酒石酸氫鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、蔗糖酸鹽、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、萘酸

鹽、甲磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖酸鹽(lactobionate)、月桂基磺酸鹽、六氟磷酸鹽、苯磺酸鹽、甲苯磺酸鹽、甲酸鹽、三氟乙酸鹽、草酸鹽、苯磺酸鹽(besylate)、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、丙二酸鹽、硬脂酸鹽、月桂酸鹽、蘋果酸鹽、硼酸鹽、對甲苯磺酸鹽和雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。

本發明亦關於本發明化合物之鹼加成鹽。可用作為製備在本質上為酸性的那些本發明化合物之醫藥上可接受的鹼鹽之試劑的化學鹼為那些與此等化合物形成無毒鹼鹽之鹼。此等無毒鹼鹽包括但不限於那些自此等藥理上可接受的陽離子(諸如鹼金屬陽離子(例如鋰、鉀和鈉)及鹼土金屬陽離子(例如鈣和鎂))所衍生之鹽、銨或水溶性胺加成鹽(諸如N-甲基葡糖胺(甲葡胺(meglumine))、四甲基銨、四乙基銨、甲基胺、二甲基胺、三甲基胺、三乙基胺、乙基胺和低碳烷醇銨)及醫藥上可接受的有機胺之其他鹼鹽。參見例如Berge等人之*J. Pharm. Sci.* 66, 1-19 (1977)。

特定的本發明化合物可以一種以上的晶形存在(通常稱為「多晶形物」)。多晶形物可藉由在各種條件下結晶來製備，例如以不同的溶劑或不同的溶劑混合物用於再結晶；在不同的溫度下結晶；及/或在結晶期間自非常快至非常慢冷卻為範圍的各種冷卻模式。多晶形物亦可藉由加熱或熔融本發明化合物，隨後逐漸或快速冷卻而獲得。多晶形物的存在可以固體探針NMR光譜法、IR光譜法、差示掃描熱量法、粉末X-射線繞射或此等其他技術測定。

4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸(亦稱為「化合物A」)為選擇性ACC抑制劑且在US 8,859,577之實施例9中以游離酸製得，US 8,859,577為國際申請案第PCT/IB2011/054119號之美國國家階段，以引用將兩者全文特此併入本文。化合物之結晶形式說明於2019年5月31日以WO 2019/102311公開之國際專利申請案第PCT/IB2018/058966號中，將此揭示以引用其全文特此併入本文。

顯然ACC抑制劑的投予可具有降低肝臟三酸甘油酯的積極效應且可能對NASH的治療具有其他效益。據報導增加的循環三酸甘油酯含量為肝臟ACC抑制的機制後果(Kim等人，2017)，儘管僅部分抑制DNL之ACC抑制劑的劑量可能不引起循環三酸甘油酯的升高(Bergman等人之ACCP, *Clinical Pharmacology in Drug Development* 2020, 00(0) 1-13)。WO2016/112305提供使用單獨或與一或多另外的治療劑組合之ACC抑制劑治療、穩定或減輕非酒精性脂肪肝疾病的嚴重度或進展之方法。頃發現4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸之投予(視需要以醫藥上可接受的鹽投予)具有導致西方膳食飼食的Sprague Dawley大鼠中的循環三酸甘油酯升高的可能性(通常自血漿或血清測量)，如在人類個體中的觀察。另外，據報導4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-

基)苯甲酸之投予使血小板減少(Bergman, A.等人之“Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a liver-targeting ACC inhibitor following single and multiple oral doses”, J. Hepatology, April 2018, Vol. 68, Supp 1, Pg. S582)。

(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(亦稱為「化合物D」)為DGAT2抑制劑且為美國公開之專利申請案US 2018-0051012A1中的實施例1，引用其全文特此併入本文。頃發現DGAT2抑制劑與ACC抑制劑之共同投予會逆轉經ACC抑制劑誘發之三酸甘油酯升高且得到比單一療法更大的效力。亦出乎意料地發現DGAT2抑制劑與ACC抑制劑之共同投予緩和與ACC抑制劑單一療法相關聯的血小板數減少。

儘管肝生檢仍為鑑定NASH患者的標準，但是用於鑑定患有發炎性肝病的患者之非侵入性方法已由Drescher, H.等人說明(“Current status in testing for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), Cells 2019, 8, 845)。該等非侵入性替代指標包括血液測試、肝功能測試和影像，已成功地依賴該等指標作為鑑定發炎性肝病(肝脂肪變性、脂肪肝炎和纖維化)之手段及特定的療法效力之衡量。

肝脂肪變性(脂肪變性)為NAFLD中的關鍵因素。儘管現今沒有特定的血清標誌存在，但是有數個血液生物標誌組合可用於評定脂肪變性。該等血液生物標誌可包括但不

限於：i) NAFLD稜分數(參數包括ALT、HDL、膽固醇、三酸甘油酯、HbA1c、白血球計數高血壓)；ii) NAFLD肝脂肪分數(NLFS)(參數包括肝脂肪含量、代謝症候群、第2型糖尿病、AST、AST：ALT、空腹胰島素)；iii) 肝脂肪變性指數(HIS)(參數包括AST、ALT、BMI、糖尿病、性別)；iv) 脂肪肝指數(FLI)(參數包括BMI、腰圍、三酸甘油酯、 γ -麩胺醯轉移酶)；v) 脂質蓄積物指數(LAP)(參數包括性別、三酸甘油酯、腰圍)；vi) 脂肪肝進展抑制(Fatty Liver Inhibition of Progression)(FLIP)演算法(參數包括組織學脂肪變性、疾病活動度、纖維化評分)；vii) CHeK分數(參數包括年齡、HbA1c、 γ -麩胺醯轉移酶、脂聯素、M30)；viii) NAFLD纖維化分數(NFS)(參數包括AST：ALT、白蛋白、血小板數、年齡、BMI、高血糖症)；ix) 纖維化-4-評分(FIB-4)(參數包括AST、ALT、血小板數、年齡)；x) AST對血小板比率指數(APRI)(參數包括AST、血小板數)；xi) BARD分數(參數包括BMI、AST：ALT、糖尿病)；xii) 增強之肝纖維化組合(ELF)(參數包括年齡、TIMP-1、PIIINP、透明質酸)；xiii) Hepascore (參數包括膽紅素、 γ -麩胺醯轉移酶、透明質酸、 α_2 大球蛋白、年齡、性別)；xiv) Fibro-Test-FibroSURE/Acti-Test (參數包括 α_2 大球蛋白、肝球蛋白、 γ -麩胺醯轉移酶、總膽紅素、脂蛋白元A1、ALT、年齡、性別)；及 xv) FibroMeter NAFLD指數(參數包括血小板數、凝血酶原指數、鐵蛋白、AST、ALT、體重、年齡、以振動控制之瞬時彈性成

像測定之肝硬度)。用於各生物標誌鑑定之參數有助於評定肝損傷/功能障礙(例如AST、ALT、 γ -GT、血小板數、肝球蛋白)、脂質代謝疾患(例如膽固醇、三酸甘油酯)、糖尿病(例如HbA1c、空腹胰島素含量)、發炎(例如 α_2 大球蛋白、鐵蛋白)。

影像學技術亦可與生檢及血液生物標誌結合使用以鑑定NAFLD/NASH患者。影像學技術包括但不限於超聲波(例如顯影劑增強超聲波(CEUS))；超聲波型彈性成像(ultrasound-based elastography)(例如振動控制之瞬時彈性成像(VCTE；FibroScan)、即時剪切波彈性成像(real-time shear wave elastography)(SWE)、聲頻輻射力脈衝彈性成像(acoustic radiation force impulse elastography)(ARFI)、超聲速剪切影像(supersonic shear imaging)(SSI))；可控衰減參數(controlled attenuation parameter)；磁共振影像學(MRI)，諸如MRI質子密度脂肪分數(MRI-PDF)；及磁共振彈性成像(MRE)。

在先前揭示的實施態樣之各者中，較佳的是(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽係一天投予一次。

在先前揭示的實施態樣之各者中，較佳的是(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)

嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽係一天投予兩次。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽對4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之比為約1：1、約5：1、約10：1、約15：1、約20：1或約30：1。在特定的實施態樣中，該比為約20：1。

在特定的實施態樣中，如前述請求項中任一項之方法，其中(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約25 mg、約50 mg、約75 mg、約100 mg、約150 mg、約200 mg、約225 mg、約300 mg、約400 mg、約450 mg、約600 mg或約1200 mg；及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約40 mg、約50 mg或約60 mg。

在特定的實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約600 mg及4-(4-(1-異丙

基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約20 mg。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約450 mg及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約15 mg。

在特定的實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約400 mg及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約20 mg。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約300 mg。當(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約300 mg時，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約10 mg。在其他的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-

1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 15 mg。在又另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 20 mg。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 225 mg 及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 15 mg。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 200 mg。當 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 200 mg 時，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 10 mg。在特定的其他實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 20 mg。

在又另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 150 mg。當(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 150 mg時，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 5mg。在其他的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 10 mg。在另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 15 mg。

在又另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 100 mg。當(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 100 mg，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 5mg。在另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四

氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約10 mg。在又另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約20 mg。

在其他的實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約75 mg。當(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約75 mg時，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約5 mg。在另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約15 mg。

在另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約50 mg。當(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約50 mg時，在特定的實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-

基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 5 mg。在另一實施態樣中，4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 10 mg。

在特定的其他實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 25 mg 及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 5 mg。

在另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 20 mg 及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 20 mg。

在又另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 15 mg 及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約 15 mg。

在另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧

基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約10 mg及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約10 mg。

在另一實施態樣中，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約5 mg及4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之治療有效量為約5 mg。

在上文實施態樣之任一者中，上述任意治療有效量之組合投予可以每天投予一次或兩次。

在上述實施態樣之任一者中，組合投予達成等於或大於約30%之自基線的全肝脂肪變化。在其他情況中，組合投予達成等於或大於約50%之自基線的全肝脂肪變化。

在上述實施態樣之任一者中，患者之鑑定可通過使用一或多個血液標誌組合。適合的血液標誌組合包括但不限於由下列所組成之群組：NAFLD稜分數、NAFLD肝脂肪分數(NLFS)、肝脂肪變性指數(HIS)、脂肪肝指數(FLI)、脂質蓄積物指數(LAP)、脂肪肝進展抑制(FLIP)演算法、ChE-K分數、NALFD纖維化評分(NFS)、纖維化-4分數(Fib-4)、AST對血小板比率指數(APRI)、BARD分數、增強肝纖維化組(ELF)、Hepa評分、FibroTest-FibroSURE/

ActiTest、ibroMeter NAFLD指數及前述之任何組合。

在特定的實施態樣中，當患者被鑑定為患有肝脂肪變性時，所利用的血液標誌組合為NAFLD稜分數。在另一實施態樣中，血液標誌組合為NAFLD肝脂肪分數(NLFS)。在另一實施態樣中，血液標誌組合為脂肪肝指數(FLI)。

在特定的實施態樣中，當患者被鑑定為患有脂肪肝炎時，所利用的血液標誌組合為脂肪肝進展抑制(FLIP)演算法。在另一實施態樣中，血液標誌組合為ChEκ分數。

在特定的實施態樣中，當患者被鑑定為患有纖維化時，所利用的血液標誌組合為NAFLD纖維化分數(NFS)。在另一實施態樣中，血液標誌組合為纖維化-4分數(Fib-4)。在另一實施態樣中，血液標誌組合為AST對血小板比率指數(APRI)。在另一實施態樣中，血液標誌組合為BARD分數。

在特定的其他實施態樣中，在上述方法中，鑑定患有肝脂肪變性、脂肪肝炎或兩者的患者之步驟進一步包括使用影像。影像可包括但不限於超聲波、超聲波型彈性成像、可控衰減參數(CAP)、磁共振影像(MRI)、磁共振彈性成像或前述之組合。在一個實施態樣中，影像為顯影劑增強超聲波(CEUS)。在另一實施態樣中，影像為超聲波型彈性成像，其係選自振動控制之瞬時彈性成像(VCTE)、聲頻輻射力脈衝彈性成像(ARFI)、超聲速剪切影像(SSI)或前述之組合。在另一實施態樣中，影像為磁共振影像(MRI)，其為MRI質子密度脂肪分數(MRI-PDFF)。在另一

實施態樣中，影像為磁共振彈性成像。

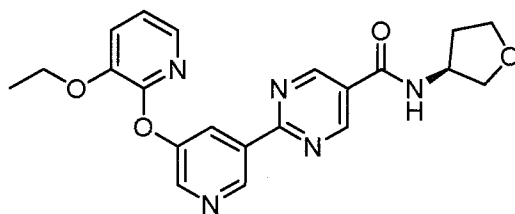
除了用於鑑定患者的發炎性肝病之上述方法及手段以外，經管理機構認可之NASH的第III期研究之條件批准係基於以肝生檢所獲得的組織學替代指標。該等普遍接受的替代指標為i)分解NASH而不惡化纖維化(亦即纖維化階段的數值增加)；ii)降低一或多個纖維化階段而不惡化NASH。細節可見於：Ratziu, A critical review of endpoints for non-cirrhotic NASH therapeutic trials, *Journal of Hepatology*, 2018, 68. 353-361及其中的參考文獻。

另外，管理機構注意自基線的非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)活動度分數(NAS)變化。NAFLD活動度分數(NAS)為綜合分數，等於由中央化病理學家評分肝生檢之脂肪變性等級(0-3)、小葉發炎等級(0-3)及肝細胞空泡樣變性等級(0-2)的總和。NAS的總分為0至8，分數越高表示越嚴重的疾病。自基線的NAFLD活動度分數(NAS)變化的結果量度具有-8至+8的可能範圍，以負值表示更好的結果(改善)及正值表示惡化的結果。NAS之組成的評分如下：脂肪變性等級0 = <5%之脂肪變性，1 = 5至33%之脂肪變性，2 = 34至66%之脂肪變性，3 = >66%之脂肪變性。小葉發炎等級 = 小葉發炎量(組合單核、脂肪肉芽腫及多形核(pmn)細胞簇)：0 = 0，1 = 在20倍放大下<2，2 = 在20倍放大下2至4，3 = 在20倍放大下>4。肝細胞空泡樣變性0 = 無，1 = 輕度，2 = 輕度以上。

除了上述方法以外，經管理機構認可之治療NASH的

藥物之完全批准係基於證明對一或多種包括下列的臨床量度之效力：(1)基於組織病理學進展至硬化，(2)減少肝臟代償不全事件(包括肝性腦病變、靜脈曲張出血、腹水)，(3)小於或等於12至大於15之MELD分數變化，(4)肝移植，或(5)總死亡率。

在進一步的實施態樣中，醫藥組成物含有(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺，如以下結構之結晶固體：

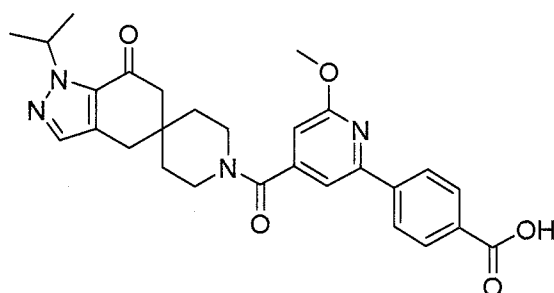


或其醫藥上可接受的鹽。

在進一步的實施態樣中，結晶固體具有包含(CuK α 輻射，1.54056 Å之波長) 5.3 \pm 0.2、7.7 \pm 0.2和15.4 \pm 0.2之2- θ 值的粉末x-射線繞射圖案。

在進一步的實施態樣中，結晶固體具有包含(CuK α 輻射，1.54056Å之波長) 6.5 \pm 0.2、9.3 \pm 0.2和13.6 \pm 0.2之2- θ 值的粉末x-射線繞射圖案。

在進一步的實施態樣中，醫藥組成物含有4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽，如以下結構之結晶固體：



或其醫藥上可接受的鹽。

在進一步的實施態樣中，結晶固體為4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸之2-氨基-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇鹽。

在進一步的實施態樣中，疾病或病症為脂肪肝。在另一實施態樣中，疾病或病症為非酒精性脂肪肝疾病。在另一實施態樣中，疾病或病症為非酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有肝纖維化之非酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化之非酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化與伴有肝細胞癌之非酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化與伴有代謝相關疾病之非酒精性脂肪肝炎。

在進一步的實施態樣中，疾病或病症為脂肪肝。在另一實施態樣中，疾病或病症為酒精性脂肪肝疾病。在另一實施態樣中，疾病或病症為酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為酒精性脂肪肝炎伴有肝纖維化。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化之酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化與伴有肝

細胞癌之酒精性脂肪肝炎。在另一實施態樣中，疾病或病症為伴有硬化與伴有代謝相關疾病之酒精性脂肪肝炎。

在進一步的實施態樣中，方法或組成物包括至少一種其他的醫藥劑，其中該醫藥劑係選自由下列所組成之群組：乙醯基-CoA 羧酶-(ACC)抑制劑、類法尼醇(farnesoid) X受體促效劑(例如托品費索(tropifexor)、奧貝膽酸(obeticholic acid))、二醯基甘油 O-醯基轉移酶 1 (DGAT-1)抑制劑、單醯基甘油 O-醯基轉移酶抑制劑、磷酸二酯酶(PDE)-10抑制劑、AMPK活化劑、磺醯脲、美格替耐(meglitinide)、 α -澱粉酶抑制劑、 α -葡萄糖苷水解酶抑制劑、 α -葡萄糖苷酶抑制劑、PPAR γ 促效劑、PPAR α/γ 促效劑(例如艾拉非諾(elafibranor))、雙胍、類升糖素肽 1 (GLP-1)調節劑、利拉魯肽(liraglutide)、阿必魯肽(albiglutide)、艾塞那肽(exenatide)、阿必魯肽、利西拉肽(lixisenatide)、度拉魯肽(dulaglutide)、索馬魯肽(semaglutide)、蛋白質酪胺酸磷酸酶-1B (PTP-1B)抑制劑、SIRT-1活化劑、二肽基肽酶 IV (DPP-IV)抑制劑、胰島素促分泌物、脂肪酸氧化抑制劑、A2拮抗劑、c-jun胺基端激酶(JNK)抑制劑、葡萄糖激酶活化劑(GK α)、胰島素、擬胰島素、肝糖磷酸化酶抑制劑、VPAC2受體促效劑、SGLT2抑制劑、升糖素受體調節劑、GPR119調節劑、FGF21衍生物或類似物、TGR5受體調節劑、GPBAR1受體調節劑、GPR40促效劑、GPR120調節劑、高親和性菸鹼酸受體(HM74A)活化劑、SGLT1抑制劑、肉鹼棕櫚醯基轉移

酶酵素抑制劑或調節劑、果糖 1,6-二磷酸酶抑制劑、醛醯還原酶抑制劑、礦物性皮質激素受體抑制劑、TORC2抑制劑、CCR2及/或CCR5抑制劑、PKC同功型(例如PKC α 、PKC β 、PKC γ)抑制劑、脂肪酸合成酶抑制劑、絲胺酸棕櫚醯基轉移酶抑制劑，下列者的調節劑：GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3，視黃醇結合蛋白4、糖皮質素受體、生長激素抑制素受體、PDHK2或PDHK4抑制劑或調節劑、MAP4K4抑制劑、包括IL1 β 之IL1家族的調節劑、HMG-CoA還原酶抑制劑、鯊烯合成酶抑制劑、纖維酸、膽酸螯合劑、ACAT抑制劑、MTP抑制劑、脂加氧酶抑制劑、膽固醇吸收抑制劑、PCSK9調節劑、膽固醇酯轉移蛋白抑制劑及RXR α 調節劑。

在進一步的實施態樣中，方法或組成物包括至少一種其他的醫藥劑，其中該醫藥劑係選自由下列所組成之群組：半胱胺或其醫藥上可接受的鹽，胱胺或其醫藥上可接受的鹽、抗氧化化合物、卵磷脂、維生素B複合物、膽鹽製劑、大麻素-1 (CB1)受體拮抗劑、大麻素-1 (CB1)受體反向促效劑、過氧小體增生物活化之受體活性調節劑、苯并噻氮吡(benzothiazepine)或苯并硫吡(benzothiepine)化合物、抑制蛋白質酪胺酸磷酸酶PTPRU之RNA反義構築體、雜原子連結之經取代哌啶和其衍生物、能夠抑制硬脂醯基輔酶 $\alpha\delta$ -9去飽和酶之氮雜環戊烷衍生物、具有脂聯素(adiponectin)之促分泌物活性或誘發體活性的醯胺(acylamide)化合物、四級銨化合物、格拉替雷(Glatiramer)

乙酸鹽、穿透素(pentraxin)蛋白質、HMG-CoA還原酶抑制劑、正乙醯基半胱胺酸、異黃酮化合物、巨環內酯抗生素、半乳糖凝集素(galectin)抑制劑、抗體或其任何組合。

特別地當以單一劑量單元提供時，在組合的活性成分之間可能存在化學交互作用。出於此原因，當第一治療劑及第二治療劑組合於單一劑量單元時，彼等係經調配而使得儘管活性成分組合於單一劑量單元中，但是活性成分之間的物理接觸減至最小(亦即減少)。例如，一種活性成分可經腸溶。藉由腸溶活性成分中之一者，不僅可能使組合的活性成分之間的接觸減至最小，亦可能控制該等組分中之一者在胃腸道中釋放，使得該等組分中之一者不在胃中釋放而於腸中釋放。活性成分中之一者亦可能經在整個胃腸道中達到持續釋放且亦適合使組合的活性成分之間的物理接觸減至最小的材料包膜。此外，持續-釋放型組分可另外經腸溶，使得此組分之釋放僅發生於腸內。又另一方法可包含組合產物之調配，其中將一種組分經持續及/或腸釋放聚合物包膜及亦將其他組分經聚合物(諸如低黏度級的羥丙基甲基纖維素(HPMC)或如本技術中已知的其他適當材料)包膜，以便於進一步分開活性組分。聚合物包膜適合於形成與其他組分交互作用的額外屏障。

一旦掌握本發明，那些熟習本技術領域者將輕易地明白該等以及其他使本發明之組合產物的組分之間的接觸減至最小的方式，無論是否經單一劑型投予或經分開劑型但同時以相同的方式投予。

在組合療法治療中，本發明化合物及其他藥物療法兩者係以習知的方法投予哺乳動物(例如人類，雄性或雌性)。

各治療劑(例如化合物A、化合物D和任何另外的治療劑)之劑量通常取決於許多因素而定，包括待治療的個體健康、所欲治療程度、同步療法(若存在)的性質和種類、治療頻率及所欲效應的性質。各治療劑之劑量範圍通常在以每天每公斤個體體重計約0.001 mg至約100 mg之範圍內，較佳為以每天每公斤個體體重約0.1 mg至約10 mg之範圍內。然而，亦可能取決於待治療的個體之年齡和體重、意欲之投予途徑、待投予之特定的抗肥胖劑及類似者而需要在通用的劑量範圍內有一些可變性。對特定患者具有本揭示之效益的劑量範圍及最適劑量的決定亦完全在一般熟習本技術領域者的能力範圍內。

根據本發明之治療方法，本發明化合物或本發明化合物與至少一種另外的醫藥劑之組合(在本文稱為「組合」)較佳地以醫藥組成物的形式投予有此治療需要的個體。在本發明之組合態樣中，本發明化合物及至少一種其他的醫藥劑(例如另一抗肥胖劑)可分開或以包含兩者之醫藥組成物投予。此投予通常較佳的是經口。

當本發明化合物與至少一種其他的醫藥劑之組合係一起投予時，此投予可在時間上依序或同時投予。藥物組合通常以同時投予較佳。用於依序投予之本發明化合物及另外的醫藥劑可以任何順序投予。此投予通常較佳的是經

口。此投予尤其佳的是經口及同時。當本發明化合物及另外的醫藥劑係依序投予時，各者之投予可以相同或不同的方式。

根據本發明之方法，本發明化合物或組合較佳地以醫藥組成物的形式投予。因此，本發明化合物或組合可以任何習知的經口、直腸、經皮、腸胃外(例如靜脈內、肌肉內或皮下)、腦池內、陰道內、腹膜內、局部(例如粉末、軟膏、乳膏、噴霧劑或洗劑)、經頰內或經鼻劑型(例如噴霧劑、滴劑或吸入劑)分開或一起投予患者。

本發明化合物或組合可單獨投予，但是通常以與本技術中已知及關於意欲的投予路徑和標準的醫藥實務所選擇之一或多種適合的醫藥賦形劑、佐劑、稀釋劑或載劑之摻合物投予。本發明化合物或組合可取決於所欲投予路徑及與治療需求相稱之釋放輪廓的特異性來調配以提供立即、延遲、修飾、持續、脈衝或控制型釋放劑型。

醫藥組成物包含本發明化合物或組合，其量通常在組成物的約1%至約75%、80%、85%、90%或甚至95%(以重量計)之範圍內，經常在約1%、2%或3%至約50%、60%或70%之範圍內，更常在約1%、2%或3%至少於50%之範圍內，諸如約25%、30%或35%。

製備具有特定量的活性化合物之各種醫藥組成物之方法為那些熟習本技術領域者已知。例如，參見 Remington: The Practice of Pharmacy, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. 20.sup.th ed. 2000。

適合於腸胃外注射之組成物通常包括醫藥上可接受的無菌水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液，及用於重組成無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。適合的水性及非水性載劑或稀釋劑(包括溶劑和媒劑)的實例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油及類似者)、其適合的混合物、三酸甘油酯(包括植物油，諸如橄欖油)及可注射的有機酯(諸如油酸乙酯)。較佳的載劑為取自 Condea Vista Co., Cranford, N.J.之 Miglyol® 品牌的具有甘油或丙二醇之辛酸/癸酸酯(例如 Miglyol®812、Miglyol®829、Miglyol®840)。適當的流動性可例如藉由使用包膜(諸如卵磷脂)、在分散液的例子中藉由維持所需粒徑及藉由使用界面活性劑來維持。

用於腸胃外注射之該等組成物亦可含有賦形劑，諸如保存劑、潤濕劑、乳化劑和分散劑。組成物之微生物污染的預防可以各種抗細菌劑及抗真菌劑完成，例如對羥苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及類似者。亦可能希望包括等張劑，例如糖、氯化鈉及類似者。可注射的醫藥組成物之延長吸收可藉由使用能夠延遲吸收之劑達成，例如單硬脂酸鋁和明膠。

用於經口投予之固體劑型包括膠囊、錠劑、咀嚼錠、口含錠、丸劑、粉末和多微粒製劑(顆粒)。在此等固體劑型中，本發明化合物或組合係與至少一種惰性賦形劑、稀釋劑或載劑摻合。適合的賦形劑、稀釋劑或載劑包括諸如檸檬酸鈉或磷酸二鈣之材料及/或(a)一或多種填充劑或增

量劑(例如微晶纖維素(自 FMC Corp.以 Avicel™取得)、澱粉、乳糖、蔗糖、甘露醇、矽酸、木糖醇、山梨醇、右旋糖、磷酸氫鈣、糊精、 α -環糊精、 β -環糊精、聚乙二醇、中鏈脂肪酸、氧化鈦、氧化鎂、氧化鋁及類似者)；(b)一或多種黏合劑(例如羧甲基纖維素、甲基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、明膠、阿拉伯膠(gum arabic)、乙基纖維素、聚乙烯醇、普魯蘭(pullulan)、預糊化澱粉、瓊脂、黃蓍膠、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯基吡咯啉酮、蔗糖、阿拉伯膠(acacia)及類似者)；(c)一或多種保濕劑(例如甘油及類似者)；(d)一或多種崩解劑(例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、特定的複合矽酸鹽、碳酸鈉、月桂基硫酸鈉、澱粉乙醇酸鈉(自 Edward Mendell Co.以 Explotab™取得)、交聯聚乙烯基吡咯啉酮、交聯羧甲基纖維素鈉 A 型(以 Ac-di-sol™取得)、波拉克林(polyacrilin)鉀(離子交換樹脂)及類似者)；(e)一或多種溶液阻滯劑(例如石蠟及類似者)；(f)一或多種吸收加速劑(例如四級銨化合物及類似者)；(g)一或多種潤濕劑(例如鯨蠟醇、單硬脂酸甘油酯及類似者)；(h)一或多種吸附劑(例如高嶺土、膨潤土及類似者)；及/或(i)一或多種潤滑劑(例如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、硬脂酸、聚氧乙稀硬脂酸酯(polyoxyl stearate)、鯨蠟醇、滑石、氫化蓖麻油、脂肪酸之蔗糖酯、二甲基聚矽氧烷、微晶蠟、黃蜂蠟、白蜂蠟、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉及類似者)。在膠囊及錠劑的例子中，劑型亦可包含緩衝劑。

類似型式的固體組成物亦可用作為使用諸如乳糖 (lactose或milk sugar)之賦形劑以及高分子量聚乙二醇及類似者的軟或硬填充型明膠膠囊中的填充劑。

固體劑型(諸如錠劑、糖衣錠、膠囊和顆粒)可以包膜及殼製備，諸如腸溶性包膜和本技術中熟知的其他包膜。彼等亦可含有遮光劑，且亦可具有以延遲方式釋放本發明化合物及/或另外的醫藥劑之此等組成物。可使用之包埋組成物的實例為聚合性物質及蠟。若適當時，藥物亦可呈具有上述賦形劑之一或多者的微囊封形式。

用於錠劑之活性劑含量通常少於調配物的50% (以重量計)，例如少於約10%，諸如5%或2.5% (以重量計)。調配物的主要部分包含填充劑、稀釋劑、崩解劑、潤滑劑和視需要的調味劑。該等賦形劑之組成為本技術中所熟知。填充劑/稀釋劑經常包含下列組分中之二或更多者的混合物：微晶纖維素、甘露醇、乳糖(所有型式)、澱粉和磷酸二鈣。填充劑/稀釋劑混合物的含量通常少於調配物的98%，且較佳為少於95%，例如93.5%。較佳崩解劑包括Ac-di-sol™、Explotab™、澱粉和月桂基硫酸鈉。當存在時，崩解劑的含量經常少於調配物的10%或少於5%，例如約3%。較佳潤滑劑為硬脂酸鎂。當存在時，潤滑劑的含量經常少於調配物的5%或少於3%，例如約1%。

錠劑可以標準的製錠方法製造，例如直接壓縮或濕式、乾式或熔融粒化、熔融凍凝法和擠壓。錠劑核心可為單層或多層，且可以本技術中已知適當的保護膜包膜。

用於經口投予之液體劑型包括醫藥上可接受的乳液、溶液、懸浮液、糖漿和酞劑。除了本發明化合物或組合以外，液體劑型可含有本技術中常使用的惰性稀釋劑，諸如水或其他溶劑、助溶劑和乳化劑，例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油類(例如棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油、芝麻籽油及類似者)、Miglyole™ (取自 CONDEA Vista Co., Cranford, N.J.)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和山梨醇酐之脂肪酸酯或該等物質之混合物及類似者。

除了此等惰性稀釋劑以外，組成物亦可包括賦形劑，諸如潤濕劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、調味劑及香味劑。

本發明化合物或組合之經口液體劑型包括其中活性化合物完全溶解之溶液。溶劑的實例包括適合於經口投予之所有醫藥上有前例的溶劑，特別為那些使本發明化合物於其中顯示良好的溶解度之溶劑，例如聚乙二醇、聚丙二醇、食用油及以甘油基和甘油酯為主的系統。以甘油基和甘油酯為主的系統可包括例如下列的品牌產品(及對應的學名產品)：Captex™ 355 EP (三辛酸/癸酸甘油酯，來自 Abitec, Columbus Ohio)、Crodamol™ GTC/C (中鏈三甘油酯，來自 Croda, Cowick Hall, UK)或 Labrafac™ CC (中鏈三甘油酯，來自 Gattefosse)、Captex™ 500P (三乙酸甘油酯 (glyceryl triacetate)，亦即三乙酸甘油酯 (triacetin)，來自

Abitec)、Capmul™ MCM (中鏈單甘油酯和雙甘油酯，來自 Abitec)、Migyol™ 812 (辛酸/癸酸三甘油酯，來自 Condea, Cranford N.J.)、Migyol™ 829 (辛酸/癸酸/丁二酸三甘油酯，來自 Condea)、Migyol™ 840 (丙二醇二辛酸酯/二癸酸酯，來自 Condea)、Labrafil™ M1944CS (油醯基聚乙二醇-6甘油酯，來自 Gattefosse)、Peceol™ (單油酸甘油酯，來自 Gattefosse)和 Maisine™ 35-1 (單油酸甘油酯，來自 Gattefosse)。特別關注的是中鏈(約 C₈至 C₁₀)三甘油酯油類。該等溶劑時常構成組成物的主要部分，亦即大於約 50%，經常大於約 80%，例如約 95%或 99%。亦可包括伴有溶劑的佐劑和添加劑，主要作為味覺掩蔽劑、適口性和調味劑、抗氧化劑、穩定劑、質地和黏度修飾劑及助溶劑。

除了本發明化合物或組合以外，懸浮液可另外包含載劑，諸如懸浮劑，例如乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨醇酐酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂和黃耆膠或該等物質之混合物及類似者。

用於直腸或陰道投予之組成物較佳地包含栓劑，其可藉由將本發明化合物或組合與適合的無刺激性賦形劑或載劑(諸如可可脂、聚乙二醇或栓劑蠟)混合來製備，該栓劑在一般室溫下為固體，但在體溫下為液體且因此在直腸或陰道腔中熔融，因而釋放活性組分。

用於局部投予本發明化合物或組合之劑型包括軟膏、乳膏、洗劑、粉末和噴霧劑。將藥物與醫藥上可接受的賦形劑、稀釋劑或載劑及可能需要的任何保存劑、緩衝劑或

推進劑摻合。

當化合物難溶於水時(例如少於約 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$)時，則溶解在非水性溶劑(諸如上文所討論的中鏈三甘油酯油類)中的液體組成物為該等化合物的較佳劑型。

固態非晶形分散體(包括以噴霧乾燥法所形成的分散體)亦為本發明之難溶性化合物的較佳劑型。以「固態非晶形分散體」意指其中至少一部分的難溶性化合物係呈非晶形式且分散於水溶性聚合物中的固體材料。以「非晶形」意指難溶性化合物不為晶形。以「晶形」意指化合物在各維度皆展現至少100個重複單元的三維度長程有序(long-range order)。因外，術語非晶形意欲包括不僅具有基本上無序的材料，且亦可能具有一些較小的有序度，但有序小於三維度及/或僅於短距離內的材料。非晶形材料可以本技術中已知的技術特徵化，諸如粉末x-射線繞射(PXRD)結晶學、固態NMR或熱分析技術，諸如差示掃描熱量法(DSC)。

在固態非晶形分散體中之至少大部分(亦即至少約60 wt%)的難溶性化合物較佳為非晶形。化合物可存在於固態非晶形分散體內相對純的非晶形域或區域中，呈均勻地分布於整個聚合物內或該等狀態或使中間物介於其間的彼等狀態之任何組合的化合物之固溶體。固態非晶形分散體較佳為實質上均勻的，使得非晶形化合物儘可能均勻地分散於整個聚合物內。如本文所使用之「實質上均勻的」意指存在於在固態非晶形分散體內相對純的非晶形域或區域中

的化合物之分率相對地較少，大約少於藥物總量的 20 wt%，且較佳為少於 10 wt%。

適合於固態非晶形分散體中使用之水溶性聚合物應為惰性，其意義在於彼等不以不利的方式與難溶性化合物化學反應，為醫藥上可接受的且在生理學相關的 pH（例如 1 至 8）之水溶液中具有至少一定的溶解度。聚合物可為中性或可離子化的，且在 1 至 8 之 pH 範圍的至少一部分內應具有至少 0.1 mg/mL 之水溶性。

適合與本發明一起使用的水溶性聚合物可為纖維素或非纖維素。聚合物在水溶液中可為中性或可離子化的。在該等聚合物之中，以可離子化及纖維素聚合物較佳，以可離子化的纖維素聚合物更佳。

例示性水溶性聚合物包括羥丙基甲基纖維素乙酸丁二酸酯 (HPMCAS)、羥丙基甲基纖維素 (HPMC)、羥丙基甲基纖維素酞酸酯 (HPMCP)、羧甲基乙基纖維素 (CMEC)、纖維素乙酸酞酸酯 (CAP)、纖維素乙酸偏苯三甲酸酯 (CAT)、聚乙烯基吡咯啉酮 (PVP)、羥丙基纖維素 (HPC)、甲基纖維素 (MC)、環氧乙烷與環氧丙烷之嵌段共聚物 (PEO/PPO，亦稱為泊洛沙姆 (poloxamer)) 及其混合物。尤其佳的聚合物包括 HPMCAS、HPMC、HPMCP、CMEC、CAP、CAT、PVP、泊洛沙姆及其混合物。最佳的是 HPMCAS。參見歐洲專利申請公開案第 0 901 786 A2 號，引用其揭示內容併入本文。

固態非晶形分散體可根據用於形成固態非晶形分散體

之任何方法製備，該方法導致至少大部分(至少60%)的難溶性化合物呈非晶形態。此等方法包括機械方法、加熱方法和溶劑方法。例示性機械方法包括研磨和擠壓；熔融方法包括高溫融合、經溶劑修飾之融合和熔融凍凝方法；及溶劑方法包括非溶劑沉澱、噴塗和噴霧乾燥。參見例如下列的美國專利，引用其相關揭示內容併入本文：第5,456,923號和第5,939,099號，其說明以擠壓方法形成分散體；第5,340,591號和第4,673,564號，其說明以研磨方法形成分散體；及第5,707,646號和第4,894,235號，其說明以熔融凍凝方法形成分散體。在較佳的方法中，固態非晶形分散體係以噴霧乾燥形成，如歐洲專利申請公開案第0 901 786 A2號中所揭示。在此方法中，將化合物及聚合物溶解在溶劑中，諸如丙酮或甲醇，且接著藉由噴霧乾燥快速地自溶液移除溶劑以形成固態非晶形分散體。可依需要製備含有至多約99 wt%之化合物的固態非晶形分散體，例如1 wt%、5 wt%、10 wt%、25 wt%、50 wt%、75 wt%、95 wt%或98 wt%。

固態分散體本身可用作為劑型，或其可能適合作為製造應用產物(manufacturing-use-product)(MUP)以製備其他的劑型，諸如膠囊、錠劑、溶液或懸浮液。水性懸浮液的實例為1:1 (w/w)之化合物/HPMCAS-HF的噴霧乾燥之分散體的水性懸浮液，含有在2%之聚山梨醇酯-80中的2.5 mg/mL之化合物。用於錠劑或膠囊之固態分散體通常與典型地於此等劑型中發現的其他賦形劑或佐劑混合。例如，

用於膠囊之例示性填充劑含有 2 : 1 (w/w) 之化合物 /HPMCAS-MF 的噴霧乾燥之分散體 (60%)、乳糖 (快速流動) (15%)、微晶纖維素 (例如 Avicel^(R0-102)) (15.8%)、澱粉鈉 (7%)、月桂基硫酸鈉 (2%) 及硬脂酸鎂 (1%)。

HPMCAS 聚合物係自 Shin-Etsu Chemical Co., LTD, Tokyo, Japan 分別以低級、中級和高級之 Aqoa^{(R)-LF}、Aqoa^{(R)-MF} 和 Aqoa^{(R)-HF} 取得。以較高級 MF 及 HF 通常較佳。

以下段落說明有用於非人類動物的例示性調配物、劑量等等。化合物 A 或其醫藥上可接受的鹽與化合物 D 或其醫藥上可接受的鹽組合之投予可作為兩種藥劑或與另一藥劑之組合經口或非經口方式實現。

將化合物 A 或其醫藥上可接受的鹽與化合物 D 或其醫藥上可接受的鹽一起或與另一藥劑組合的量投予，使得接收到有效劑量。經口投予動物的日劑量通常係介於約 0.01 與約 1,000 mg/kg 體重之間，例如介於約 0.01 與約 300 mg/kg 體重之間、或介於約 0.01 與約 100 mg/kg 體重之間、或介於約 0.01 與約 50 mg/kg 體重之間、或介於約 0.01 與約 25 mg/kg 之間、或介於約 0.01 與約 10 mg/kg 之間、或介於約 0.01 與約 5 mg/kg 之間。投予之化合物 A 的日劑量可為 5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、40 mg、50 mg 或 60 mg。日劑量可分成多次劑量，諸如一天兩次 (例如「BID」或「q12 小時給藥間隔」)。例如，在特定的情況中，化合物 A 的日劑量可以一天投予兩次 15 mg (例如 q12 小時)。投予之化合物 D 的

日劑量可為 5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、50 mg、75 mg、100 mg、150 mg、200 mg、225 mg、300 mg、450 mg或600 mg。日劑量可分成多次劑量，諸如一天兩次(例如「**BID**」或「**q12**小時給藥間隔」)。例如，在特定的情況中，化合物D的日劑量可以一天投予兩次300 mg(例如**q12**小時)。

本發明化合物(或組合)可方便地攜載於飲用水中，使得化合物之治療劑量與日常供水一起攝取。化合物可直接計量至飲用水中，較佳地呈液體、水溶性濃縮物(諸如水溶性鹽之水溶液)的形式。

本發明化合物(或組合)亦可方便地以原樣子或以動物飼料補充物(亦稱為預混物或濃縮物)的形式直接添加至飼料中。更常使用化合物於賦形劑、稀釋劑或載劑中的預混物或濃縮物而使藥劑內含在飼料中。適合的賦形劑、稀釋劑或載劑係依需要為液體或固體，諸如水、各種粗粉(諸如苜蓿粉、大豆粉、棉籽油粉、亞麻籽油粉、玉米穗軸粉和玉米粉、糖蜜、尿素、骨粉)及礦物混合物(諸如常用於家禽飼料中)。特別有效的賦形劑、稀釋劑或載劑為各自的動物飼料本身；亦即此飼料的一小部分。載劑促成化合物均勻分布在與其摻合的預混物之最終飼料中。化合物較佳地充分摻合於預混物中及隨後於飼料中。在此方面，化合物可分散或溶解於適合的油性媒劑中(諸如大豆油、玉米油、棉籽油及類似者)或揮發性有機溶劑中，且接著與載劑摻合。應理解化合物於濃縮物中的比例能夠廣泛的變

化，因為化合物於最終飼料中的量可藉由摻合適當比例的預混物與飼料來調整，以獲得所欲含量的化合物。

高效濃縮物可由飼料製造商與蛋白質性載劑(諸如上文所述之大豆油粉和其他粗粉)摻合以生產濃縮之補充物，其適合於直接餵食動物。在此等情況中，准許動物食用平常的膳食。另一選擇地，此等濃縮之補充物可直接添加至飼料中以生產含有治療有效含量的本發明化合物之營養學上平衡的最終飼料。混合物係以標準的程序(諸如在雙筒摻合機中)充分地摻合以確保均勻性。

若補充物係用作為飼料的頂層調料(top dressing)，則其同樣地有助於確保化合物在調製之飼料頂層上的分布均勻性。

有效增加瘦肉沉積且改良瘦肉對脂肪之比例的飲用水及飼料通常係藉由將本發明化合物與足夠量的動物飼料混合來製備，以在飼料或水中提供約 10^{-3} 至約500 ppm化合物。

較佳的加藥之豬、牛、綿羊及山羊飼料通常含有以每公噸飼料計約1至約400克本發明化合物(或組合)，用於該等動物的最適量經常為以每公噸飼料計約50至約300克。

較佳的家禽及家養寵物飼料經常含有以每公噸飼料計約1至約400克，且較佳為約10至約400克本發明化合物(或組合)。

用於動物的腸胃外投予之本發明化合物(或組合)可以糊劑或丸劑的形式製備且經常在動物的頭或耳皮膚下以植

人物投予，其中尋求增加的瘦肉沉積及改良的瘦肉對脂肪之比例。

糊劑調配物可藉由將藥物分散於醫藥上可接受的油(諸如花生油、芝麻油、玉米油或類似者)中來製備。

含有治療有效量的化合物 A 或其醫藥上可接受的鹽與化合物 D 或其醫藥上可接受的鹽之組合、醫藥組成物或組合之丸劑可藉由將化合物 A 或其醫藥上可接受的鹽與化合物 D 或其醫藥上可接受的鹽、稀釋劑(諸如卡波蠟(carbowax)、巴西棕櫚蠟及類似者)摻合而製備，且可添加潤滑劑(諸如硬脂酸鎂或硬脂酸鈣)以改良製丸方法。

當然，應理解可以一種以上的丸劑投予動物，以達成提供增加的瘦肉沉積及改良的瘦肉對脂肪之所欲比例的所欲劑量水平。而且，亦可在動物治療期間定期進行植入，以便於動物體內維持適當的藥物水平。

本發明具有許多有利的獸醫學特徵。本發明對渴望增加寵物動物的瘦肉及/或修整其非所需脂肪之寵物主人或獸醫提供可實現此渴望的方式。家禽、肉牛及豬飼養者利用本發明之方法產出較精瘦的動物，自肉類工業贏得較高的銷售價格。

實施例

除非另有其他指定，否則起始材料通常係自商業來源取得，諸如 Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee, WI)、Lancaster Synthesis, Inc. (Windham, NH)、Acros Organics

(Fairlawn, NJ) 、 Maybridge Chemical Company, Ltd. (Cornwall, England)及 Tyger Scientific (Princeton, NJ) 。已使用特定的常用縮寫及頭字語，其可包括：AcOH (乙酸)、DBU (1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯)、CDI (1,1'-羰基二咪唑)、DCM (二氯甲烷)、DEA (二乙胺)、DIPEA (N,N-二異丙基乙胺)、DMAP (4-二甲基胺基吡啶)、DMF (N,N'-二甲基甲醯胺)、DMSO (二甲亞砜)、EDCI (N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳二醯亞胺)、Et₂O (二乙醚)、EtOAc (乙酸乙酯)、EtOH (乙醇)、G或g (克)、HATU (2-(1H-7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸甲銨)、HBTU (O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽)、HOBT (1-羥基苯并三唑)、H或h (小時)、IPA (異丙醇)、KHMDS (六甲基二矽氮烷鉀)、MeOH (甲醇)、L或l (公升)、mL (毫升) MTBE (三級丁基甲醚)、mg (毫克)、NaBH(OAc)₃ (三乙醯氧基硼氫化鈉)、NaHMDS (六甲基二矽氮烷鈉)、NMP (N-甲基吡咯啉酮)、RH (相對濕度)、RT或rt (與周圍溫度相同(約20至25°C)的室溫)、SEM ([2-(三甲基矽基)乙氧基]甲基)、TEA (三乙胺)、TFA (三氟乙酸)、THF (四氫呋喃)及T₃P (丙烷膦酸酐)。

¹H核磁共振(NMR)光譜在所有的例子中與所提出之結構一致。特徵性化學位移(δ)係以相對於氘化溶劑中的殘留質子信號(在7.27 ppm之CHCl₃；在3.31 ppm之CD₂HOD)而以百萬分點(parts-per-million, ppm)給出，且使用主要峰的名稱之習用縮寫報告：例如s，單峰；d，雙峰；t，

三重峰；q，四重峰；m，多重峰；br，寬峰。

ssNMR意指固態NMR。

PXRD意指粉末x-射線繞射。

當術語「實質上相同」用於說明X-射線粉末繞射圖案時，其意指包括其中峰係在 $\pm 0.2^\circ 2\theta$ 之標準偏差範圍內的圖案。

如本文所使用關於特定的結晶形式之術語「實質上純的」意指結晶形式包括少於10重量%，較佳為少於5重量%，較佳為少於3重量%，較佳為少於1重量%之任何其他物理形式的化合物A或化合物D。

反應係在空氣中進行，或當使用氧或濕氣敏感性試劑或中間物時，則反應係在惰性氛圍下(氮氣或氬氣)下進行。在適當時，將反應裝置在動態真空下使用熱槍乾燥且使用無水溶劑(來自Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin之Sure-Seal™產品或來自EMD Chemicals, Gibbstown, NJ之DriSolv™產品)。使用市售溶劑及試劑而無需進一步純化。當指示時，反應係使用Biotage Initiator或Personal Chemistry Emrys Optimizer微波之微波照射加熱。反應進程係使用薄層層析術(TLC)、液相層析術-質譜術(LCMS)、高性能液相層析術(HPLC)及/或氣相層析術-質譜術(GCMS)分析監測。TLC係在具有螢光指示劑(254 nm激發波長)的預塗佈之矽膠板上執行，且在UV光下及/或以I₂、KMnO₄、CoCl₂、磷鉬酸及/或鉬酸銻銨染色劑顯現。LCMS數據係在具有Leap Technologies自動取樣器、

Gemini C18管柱、MeCN/水之梯度及TFA、甲酸或氫氧化銨修飾劑之Agilent 1100 Series儀器上擷取。管柱溶析液係使用正離子及負離子兩種模式自100至1200 Da掃描之Waters ZQ質譜儀分析。亦使用其他類似的儀器。HPLC數據係在使用Gemini或XBridge C18管柱、MeCN/水之梯度及TFA或氫氧化銨修飾劑之Agilent 1100 Series儀器上擷取。GCMS數據係使用具有HP 6890注射器、HP-1管柱(12 mm×0.2 mm×0.33 μm)及氮載運氣體之Hewlett Packard 6890烘箱擷取。樣品係在使用電子游離自50至550 Da掃描之HP 5973質量選擇性檢測器上分析。純化係以使用Isco CombiFlash Companion、AnaLogix IntelliFlash 280、Biotage SP1或Biotage Isolera One儀器及預裝填之Isco RediSep或Biotage Snap二氧化矽匣之中性能液相層析術(MPLC)執行。手性純化係以使用Berger或Thar儀器；ChiralPAK-AD、-AS、-IC、Chiralcel-OD或-OJ管柱；及與MeOH、EtOH、iPrOH或MeCN之CO₂混合物(單獨或使用TFA或iPrNH₂修飾)的手性超臨界流體層析術(SFC)執行。使用UV檢測以觸發流份收集。

質譜術數據係自LCMS分析報告。質譜術(MS)係經由大氣壓化學電離(APCI)、電噴灑電離(ESI)、電子衝擊電離(EI)或電子散射(ES)游離源執行。質子核磁光譜法(¹H NMR)化學位移係自四甲基矽烷之低磁場以百萬分點給出且記錄於300、400、500或600 MHz Varian光譜儀上。化學位移係以參考氘化溶劑殘留峰之百萬分點(ppm, δ)表示。

峰形狀說明如下：s，單峰；d，雙峰；t，三重峰；q，四重峰；quin，五重峰；m，多重峰；br s，寬單峰；app，表觀。分析性SFC數據係在如上述之Berger分析儀器上擷取。旋光度數據係在使用1 dm槽之PerkinElmer型343偏光計上擷取。矽膠層析術主要係使用中壓力Biotage或ISCO系統執行，該系統係使用由各種市場供應商(包括Biotage和ISCO)預裝填之管柱。微分析係由Quantitative Technologies Inc.執行且在計算值的0.4%之內。

除非另有其他註明，否則化學反應係在室溫(約攝氏23度)下執行。

下文所述之化合物及中間物通常係使用以ChemBioDraw Ultra，12.0版(CambridgeSoft Corp., Cambridge, Massachusetts)所提供之命名常規命名。以ChemBioDraw Ultra，12.0版所提供之命名常規為那些熟習本技術領域者所熟知，且咸信以ChemBioDraw Ultra，12.0版所提供之命名常規通常與有機化學命名法之IUPAC(國際純化學暨應用化學聯合會(International Union for Pure and Applied Chemistry))建議及CAS索引規則相符。除非另有其他註明，否則所有的反應物係市場上獲得而無需進一步純化或使用文獻中已知的方法製備。

術語「濃縮」、「蒸發」及「在真空中濃縮」係指在減壓下以低於60°C之浴溫的旋轉式蒸發器上移除溶劑。縮寫「min」和「h」分別代表「分鐘」和「小時」。術語「TLC」係指薄層層析術，「室溫或周圍溫度」意指介於

18至25°C之間的溫度，「GCMS」係指氣相層析術-質譜術，「LCMS」係指液相層析術-質譜術，「UPLC」係指超性能液相層析術，及「HPLC」係指高壓液相層析術，「SFC」係指超臨界流體層析術。

氫化可在指定的溫度下，在帕爾震盪器(Parr Shaker)中於加壓氫氣下或在Thales-nano H-Cube流動氫化裝置中於全氫氣及介於1至2 mL/min之間的流速下執行。

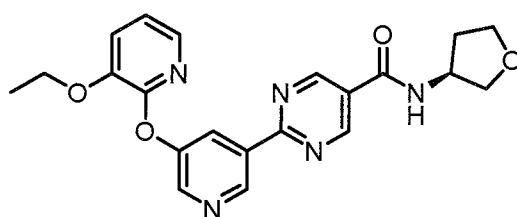
HPLC、UPLC、LCMS、GCMS及SFC滯留時間係使用程序中註明之方法測量。

本發明化合物可以合成路徑合成，其包括類似於那些在化學技術中所熟知的方法，特別依照本文所納入的說明。起始材料通常取自於市場來源，諸如Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)，或使用那些熟習本技術領域者熟知的方法輕易地製備(例如以Louis F. Fieser和Mary Fieser之Reagents for Organic Synthesis, v. 1-19, Wiley, New York (1967-1999 ed.)或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin，包括附錄(亦經由Beilstein線上數據庫取得)中概括說明方法製備)。(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺之製備係呈示於US 2018-0051012A1的實施例1中，藉此引用其全文併入本文，適用於所有目的。4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸之製備係於US 8,859,577的實施例9中，藉此引用其全文併入本

文，適用於所有目的。[(1R,5S,6R)-3-{2-[(2S)-2-甲基氮唑-1-基]-6-(三氟甲基)嘧啶-4-基}-3-氮雜雙環[3.1.0]己-6-基]乙酸(包括其結晶游離酸形式)之製備說明於美國專利第9,809,579號的實施例4中。GLP-1R促效劑之製備說明於美國專利第10,208,019號中。

中間物之製備例及實施例

實施例 1 (DGAT2i 化合物 / 化合物 D) : (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺



步驟 1 : 3-乙氧基吡啶

將碳酸銨 (12 mol, 1.5 當量) 及碘乙烷 (9.7 mol, 1.2 當量) 添加至 15°C 下在丙酮 (12L) 中的 3-羥基吡啶 (8.10 mol, 1.0 當量) 之溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌 24 小時。將反應混合物過濾且將有機層濃縮，以給出粗製產物。添加乙酸乙酯 (20L) 且以水 (3x5L) 清洗。將有機層經硫酸鈉乾燥，過濾且濃縮，以給出呈油狀物的 3-乙氧基吡啶 (620g, 62%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (t, 3H), 4.07 (q, 2H), 7.15-7.23 (m, 2H), 8.20 (dd, 1H), 8.30 (d, 1H)。

步驟 2：3-乙氧基吡啶-1-氧化物

將間-氯過氧苯甲酸(6.5 mol, 1.3當量)添加至10°C下在二氯甲烷(12L)中的3-乙氧基吡啶(5.0 mol, 1.0當量)之溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌24小時。添加硫代硫酸鈉(4 kg, 在5L水中)。將反應混合物在15°C下攪拌2小時。添加另一份硫代硫酸鈉(1.5 kg, 在5L水中)。將反應混合物在15°C下攪拌1小時。將混合物以二氯甲烷(16x10L)萃取。將合併的有機層濃縮, 以給出粗製產物。將粗製產物以矽膠管柱層析術純化(二氯甲烷: 甲醇; 100: 1-10: 1), 以給出呈棕色油狀物的標題化合物(680g, 97%)。將其在室溫下以石油醚(4L)研碎24小時而進一步純化, 以給出呈黃色固體的3-乙氧基吡啶-1-氧化物(580g, 83%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.41 (t, 3H), 4.02 (q, 2H), 6.84 (dd, 1H), 7.12 (dd, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.91-7.95 (m, 1H)。

步驟 3：2-((5-溴吡啶-3-基)氧基)-3-乙氧基吡啶

此反應係以五個並行的批次進行。

將二異丙基乙基胺(2.69 mol, 3.7當量)及三N-吡咯啶基溴化磷六氟磷酸鹽(0.93 mol, 1.3當量)添加至室溫下在四氫呋喃(2500 mL)中的3-乙氧基吡啶-1-氧化物(0.72 mol, 1.0當量)及3-溴-5-羥基吡啶(0.72 mol, 1.0當量)之攪拌溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌2天, 接著將分開的批次合併成單一批次。將所得懸浮液濃縮至乾燥且溶解

在二氯甲烷(25L)中。將有機層以1N氫氧化鈉(15L)、水(3×20L)及鹽水(20L)清洗。將有機層經硫酸鈉乾燥、過濾且濃縮，以給出油狀物。將粗製油以矽膠管柱層析術純化(石油醚：乙酸乙酯；10：1至1：1)，以給出呈棕色固體的粗製產物。將此固體以甲基三級丁基醚：石油醚(1：10；11L)研碎，以供給呈灰黃色固體的2-((5-溴吡啶-3-基)氧基)-3-乙氧基吡啶(730g，69%)。¹H NMR (400 MHz，CDCl₃) δ 1.49 (t, 3H), 4.16 (q, 2H), 7.04 (dd, 1H), 7.25 (dd, 1H), 7.68-7.73 (m, 2H), 8.44 (d, 1H), 8.49 (d, 1H)。MS (ES+) 297.1 (M+H)。

步驟4：2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸乙酯

將四氫呋喃(1.3L)中的2-((5-溴吡啶-3-基)氧基)-3-乙氧基吡啶(300 mmol，1.0當量)之溶液以氮脫氣30分鐘。在室溫下以維持內溫低於30℃之速率添加強效格任亞劑(Turbo Grignard)(390 mmol，1.3當量，1.3M於四氫呋喃中)。容許反應混合物冷卻至室溫且攪拌3小時。將反應冷卻至10℃且以維持溫度低於15℃之速率添加氯化鋅(390 mmol，1.3當量，1.9M於2-甲基四氫呋喃中)。將所得懸浮液溫熱至室溫，直到所有的沉澱物溶解，且接著冷卻回至10℃。添加固體的2-氯嘧啶-5-羧酸乙酯(360 mmol，1.2當量)及二氯[雙(2-(二苯基膦基)苯基)醚]鈣(II)(6.00 mmol，0.02當量)。將所得懸浮液以氮脫氣30分鐘，接著加熱至50

℃ 經 16 小時。將反應在水性條件下進行，接著依序以乙二胺四乙酸二鈉鹽、硫代氧化矽 (thiosilica) 及木炭處理以移除金屬雜質。將粗製化合物自甲醇 (450 mL) 再結晶，以得到呈淡黃色固體的 2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸乙酯 (77g, 70%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (t, 3H), 1.50 (t, 3H), 4.19 (q, 2H), 4.46 (q, 2H), 7.00-7.04 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.71 (d, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.66 (d, 1H), 9.32 (s, 2H), 9.55 (s, 1H)。

步驟 5：2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸 (中間物 1)

將氫氧化鈉 (307 mmol, 1.5 當量, 4M 水性) 及甲醇 (50 mL) 添加至四氫呋喃 (300 mL) 中的 2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸酯 (205 mmol, 1.0 當量) 之懸浮液中。將所得溶液在室溫下攪拌 3 小時。將反應混合物以水 (400 mL) 稀釋且以 2:1 之二乙醚:庚烷 (2x 300 mL) 萃取。將水層以 4M 氫氯酸酸化至 pH 4。將所得懸浮液在室溫下攪拌 1 小時。將固體過濾，以水清洗且乾燥，以得到呈淡黃色固體的 2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸 (69g, 100%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.37 (t, 3H), 4.18 (q, 2H), 7.19 (dd, 1H), 7.58 (dd, 1H), 7.70 (dd, 1H), 8.35-8.40 (m, 1H), 8.66 (d, 1H), 9.33 (s, 2H), 9.41 (d, 1H), 13.9 (br. s, 1H)。

步驟 6：(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(實施例 1 (DGAT2i 化合物))

將草醯氯(13.8 mL, 160 mmol, 1.2當量)及二甲基甲醯胺(0.510 mL, 6.65 mmol, 0.05當量)添加至二氯甲烷(500 mL)中的2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸(45.0g, 133 mmol, 1.0當量)之懸浮液中。當達成溶液時，將懸浮液攪拌2小時。將反應混合物濃縮以得到呈紅色固體的粗製醯基氯。將四氫呋喃(100 mL)中的(S)-四氫呋喃-3-胺(12.2g, 140 mmol, 1.05當量)及二異丙基乙基胺(51.0 mL, 293 mmol, 2.2當量)之溶液逐滴添加至0°C下在二氯甲烷(200 mL)中的粗製醯基氯之溶液中。容許反應溫熱至室溫且攪拌16小時。添加水(1.0L)及乙酸乙酯(600 mL)且將有機層分離，以飽和碳酸氫鈉清洗，經硫酸鎂乾燥且過濾。將過濾物以活性炭(20g)處理，在65°C下攪拌20分鐘。將懸浮液溫過濾且將過濾物濃縮成淡黃色固體，將其自乙酸乙酯中的甲醇(1:4, 1L)再結晶，以得到呈無色固體的(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(43.5g, 81%)。將標題化合物與以相同的方式製備的先前批次(108.7g, 266.8 mmol)合併且在80°C下以乙酸乙酯(1.0L)經4小時漿液化。容許懸浮液冷卻至室溫且攪拌4天。將固體過濾，以乙酸乙酯(3x200 mL)清洗且在50°C之高真空下經24小時乾燥，以得到呈無色固體的(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺

(100.5 g, 92%)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.38 (t, 3H), 1.89-1.98 (m, 1H), 2.15-2.26 (m, 1H), 3.65 (dd, 1H), 3.70-3.78 (m, 1H), 3.85-3.92 (m, 2H), 4.18 (q, 2H), 4.46-4.55 (m, 1H), 7.18 (dd, 1H), 7.58 (dd, 1H), 7.69 (dd, 1H), 8.37 (dd, 1H), 8.64 (d, 1H), 8.95 (d, 1H), 9.28 (s, 2H), 9.39 (d, 1H)。MS (ES+) 408.4 (M+H)。熔點 177.5 °C。C₂₁H₂₁N₅O₄之元素分析：計算值 C, 61.91；H, 5.20；N, 17.19；實測值 C, 61.86；H, 5.18；N, 17.30。

將來自此程序之固體形式以粉末 X-射線繞射 (PXRD) 分析特徵化且標示為化合物 D 之形式 1。

用於製備 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(實施例 1 (化合物 D))之替代步驟 6

將乙腈 (35 mL)、2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)嘧啶-5-羧酸 (5.0 g, 15 mmol) 及 (S)-四氫呋喃-3-胺鹽酸鹽 (2.2 g, 18 mmol, 1.2 當量) 裝入 100 mL 反應器中。裝入二異丙基乙基胺 (18 mL, 103 mmol, 7.0 當量)，同時使溫度維持在 20°C 至 30°C。以維持溫度低於 45°C 之速率裝入在乙腈中的丙烷膦酸酐 (T3P) 溶液 (21 mL, 30 mmol, 2.0 當量)。將反應器加熱至 40±5°C 經 1 小時，接著取樣以反應完成。將反應冷卻至 20°C 至 25°C 且添加四氫呋喃 (25 mL)。裝入碳酸氫鈉溶液 (0.5M, 40 mL) 且將混合物攪拌 1 小時。檢查 pH 且測得為 8.5。添加乙酸乙酯 (40 mL) 且將混合物攪

拌15分鐘。混合物沉降且相分離。將水層轉移至分液漏斗中且以乙酸乙酯(100 mL)反萃取。將有機相合併且以水(40 mL)清洗。將有機層分次地轉移至100 mL反應器中且在真空下濃縮至低體積。添加甲基乙基酮(100 mL)且將混合物濃縮至約60 mL的最終體積。移除真空，將漿液加熱至回流且固定，直到固體自反應器壁洗下來。將漿液經2小時冷卻至15°C且經隔夜粒化。以過濾單離固體，以甲基乙基酮清洗反應器及濾餅兩次(各10 mL)。將固體在50°C之真空烘箱中乾燥以得到4.86g (81%)所欲產物。將來自此程序之固體形式以PXRD分析特徵化且標示為化合物D之形式2。

化合物D之形式2轉化成形式1

將(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(實施例1)之形式2 (10.0g, 24.6 mmol, 1.00當量)、甲基乙基酮(8.8 mL/g, 88.0 mL)及水(1.2 mL/g, 12.0 mL)裝入100 mL反應器中。將反應器經30分鐘加熱至50°C。在約44°C出現完全溶液。將反應器經30分鐘冷卻至40°C，接著裝入(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺(實施例1的化合物D)之晶種形式1 (0.050g, 0.123 mmol, 0.0050當量)。在種晶後，經2小時冷卻至5°C之前，將渾濁的漿液攪拌1小時，且接著在5°C下攪拌12小時。在過程中抽樣對照樣品且以PXRD分析特徵化，以確認固體為化合

物D之形式1。將漿液過濾且將反應器及濾餅以0°C的甲基乙基酮(2.5 mL/g, 25 mL)清洗。將固體在50°C之真空烘箱中乾燥以得到8.15g (81.5%)所欲產物。所欲產物之PXRD圖案係與化合物D之形式1一致。

粉末X-射線繞射：

粉末X-射線繞射分析係使用配備有Cu輻射源(1.54056Å之K α 平均波長)、配備有利用gobel鏡之雙原色(twin primary)之Bruker AXS D8 Advance繞射儀進行。經繞射之輻射係以PSD-Lynx Eye檢測器檢測。原色及次原色(secondary)二者配備有2.5索勒狹縫(soller slit)。X-射線管電壓及電流量分別設定在40 kV及40 mA。在 θ - θ 測角計中使用每步6秒之掃描速度以1000步自3.0至40.0度 2θ 之鎖定式配對掃描(locked couple scan)收集數據。樣品係藉由放置在矽低背景樣品架中做準備(C79298A3244B261)。使用Bruker DIFFRAC Plus軟體收集數據。以EVA Diffract Plus軟體執行分析。

在峰搜尋前，不處理PXRD數據檔案。使用EVA軟體中的峰搜尋演算法，選擇具有5之閾值及0.2之寬度值的峰。以目視檢查自動化分配之輸出以確保適切性且若必要時以手動調整。通常選擇具有相對強度 $\geq 3\%$ 之峰。亦棄置未解析或與雜訊一致的峰。與來自USP所述之PXRD的峰位置相關聯的典型誤差係在 $\pm 0.2^\circ$ 範圍內(USP-941)。

表1：使結晶材料實施例1(化合物D)特徵化之
關鍵的PXRD峰

實施例1之形式1	實施例1之形式2
角2 θ (°)	角2 θ (°)
5.3, 7.7, 15.4	6.5, 9.3, 13.6

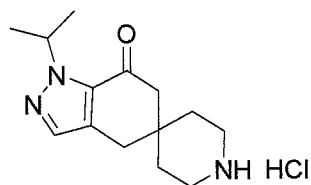
圖1為顯示實施例1(化合物D)之結晶形式1的特徵性x-射線粉末繞射圖案(垂直軸：強度(CPS)；水平軸：2 θ (度))。

圖2為顯示實施例1(化合物D)之結晶形式2的特徵性x-射線粉末繞射圖案(垂直軸：強度(CPS)；水平軸：2 θ (度))。

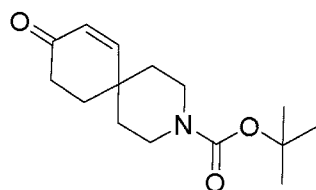
實施例2：4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸，化合物A (ACCi化合物)之製備：

在化合物A之製備中，應注意本文所述之一些製備方法可能需要保護遠端的官能基(例如在式I前驅物中的一級胺、二級胺、羧基)。此等保護的必要性係取決於遠端官能基的本性及製備方法的條件而改變。此等保護的必要性係由熟習本技術領域者輕易地決定。此等保護/去保護方法的使用亦在本技術領域內。保護基及彼等用途的概括說明參見 T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991。此外，本發明不限於本文所提供之特定的合成方法，其可能改變。

中間物 A1：1-異丙基-4,6-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-7(1H)-
酮，鹽酸鹽



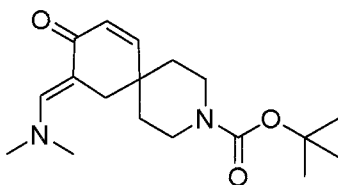
步驟 1. 9-側氧基-3-氮雜螺[5.5]十一-7-烯-3-羧酸三級丁酯



將 4-甲醯基哌啶-1-羧酸三級丁酯 (108 Kg)、環己烷 (1080L) 及吡咯啉 (64.8 Kg) 在 25 至 30°C 下裝入乾燥反應器中。將混合物攪拌 5 至 10 min 且接著加熱至回流經 12 至 16h，同時使用迪恩-斯達克 (Dean-Stark) 分水器收集水。接著將反應混合物冷卻至 50 至 60°C，在此溫度下施予真空以蒸餾過量的吡咯啉及環己烷。接著將反應混合物冷卻至 25 至 30°C，且裝入環己烷 (648L)，接著裝入甲基乙炔基酮 (49.63 Kg)。將混合物攪拌 12 至 16h，接著過濾且將過濾物裝入乾淨且乾燥的反應器中。將溶液冷卻至 10 至 15°C，接著緩慢地添加在水 (54L) 中的乙酸 (54.75 Kg) 之溶液，使溫度維持在低於 15°C。在添加完成時，將混合物溫熱至 25 至 30°C 且攪拌 12 至 16h。將層分離且將水層以乙酸乙酯 (324L) 萃取。將合併的有機層以水 (324L) 中的碳酸氫鈉 (32.34 Kg) 之溶液清洗，接著經硫酸鈉乾燥。將固體以乙酸乙酯 (54L) 清洗且將合併的過濾物在減壓下低於 40°C 下

濃縮。將正庚烷(216L)裝入反應器中且在減壓下及低於40℃下進行蒸餾，直到乾燥。將混合物冷卻至25至30℃且將正庚烷(216L)裝入反應器中。將混合物攪拌1至2h，然後形成固體。接著過濾固體，以正庚烷(54L)清洗且在40至50℃下經10至12h乾燥，以產生所欲材料(90.1 kg，67%之產率)。

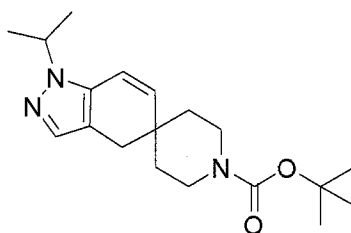
步驟2. (E)-10-((二甲基胺基)亞甲基)-9-側氧基-3-氮雜螺[5.5]十一-7-烯-3-羧酸三級丁酯



將9-側氧基-3-氮雜螺[5.5]十一-7-烯-3-羧酸三級丁酯(50 Kg)、N,N-二甲基甲醯胺(500L)及N,N-二甲基甲醯胺二甲基縮醛(135 Kg)在25至30℃下於氮氛圍下裝入乾淨且乾燥的反應器中。將反應混合物攪拌5至10 min，接著加熱至120至130℃經20h。接著將混合物冷卻至50至60℃且在高真空下低於60℃下蒸餾出溶劑。在低於45℃下裝入混合-二甲苯(200L)且在高真空下低於60℃下蒸餾出溶劑。以另一批混合-二甲苯(200L)重複此操作。接著將甲苯(200L)裝入反應器中且在高真空下低於60℃下蒸餾出溶劑。以第二批甲苯(200L)重複此操作。接著在低於30℃下裝入甲基三級丁基醚(100L)且在高真空下低於40℃下蒸餾出溶劑。將混合物冷卻至15至20℃且在低於20℃下裝入甲基三級丁基

醚(100L)。將混合物攪拌20至30 min且過濾固體，以甲基三級丁基醚(50L)清洗且在50至55°C之非真空下經10h乾燥，以提供所欲化合物(52.1 kg, 87%之產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.48 (s, 1H), 6.57 (d, J=9.97 Hz, 1H), 5.99 (d, J=10.16 Hz, 1H), 3.32-3.51 (m, 4H), 3.06 (s, 6H), 2.72 (s, 2H), 1.57-1.66 (m, 2H), 1.41-1.53 (m, 11H)。

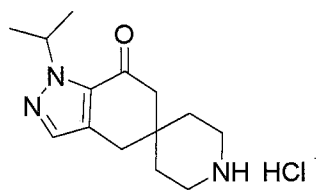
步驟3. 1-異丙基-1,4-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羧酸三級丁酯



將10-((二甲基胺基)亞甲基)-9-側氧基-3-氮雜螺[5.5]十一-7-烯-3-羧酸(E)-三級丁酯(80 Kg)、甲苯(704L)及三甲基胺(16L)於25至30°C下裝入乾淨且乾燥的反應器中。將反應混合物溫熱至70至80°C且經4至5h添加在甲醇中的異丙基胍鹽酸鹽溶液(1.25當量, 141 Kg總量)。冷卻至15至25°C之前接著將反應混合物在70至80°C下攪拌8至10h。接著緩慢地添加在水(480L)中的檸檬酸(48 Kg)之溶液,使內溫維持在低於25°C。添加乙酸乙酯(208L)且將混合物攪拌10 min。將層分開且將有機層以水(480L)中的檸檬酸(48 Kg)之溶液,接著僅以水(320L)連續清洗。將合併的水層以乙酸乙酯(320L)萃取。接著將合併的有機層經硫酸鈉(8

Kg)乾燥且在減壓下及低於40°C下蒸發溶劑至乾燥。將二氯甲烷(240L)裝入反應器中且將混合物在25至30°C下攪拌，直到澄清。在25至30°C下連續裝入活性碳(1.84 Kg)、矽酸鎂(1.84 Kg)及矽膠(32 kg, 100至200網目)，且將不均勻混合物攪拌1h。接著將漿液在藉由混合Hyflow supercell(8 Kg)與二氯甲烷(40L)而製備的Hyflow床上過濾。將濾餅以二氯甲烷(三次120L)清洗。將合併的過濾物裝回反應器中且在減壓下低於40°C下蒸發溶劑。接著裝入正庚烷(160L)且在減壓下低於40°C下蒸發。將正庚烷(200L)裝入反應器中且將混合物冷卻至0至5°C。在攪拌12至15h後，在0°C下過濾固體，以急冷(0至5°C)的正庚烷(160L)清洗且在40至50°C之真空下乾燥，以提供標題化合物(82.4 kg, 75%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.25 (s, 1H), 6.42 (dd, J=10.05, 0.49 Hz, 1H) 5.84 (d, J=9.95 Hz, 1H), 4.42-4.52 (m, 1H), 3.36-3.53 (m, 4H), 2.62 (s, 2H) 1.56-1.68 (m, 2H) 1.45-1.55 (m, 17H)。

步驟4. 1-異丙基-4,6-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-7(1H)-酮，鹽酸鹽



將1-異丙基-1,4-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羧酸三級丁酯(60 Kg)及甲醇(600L)在25至30°C下裝入乾淨且乾燥的

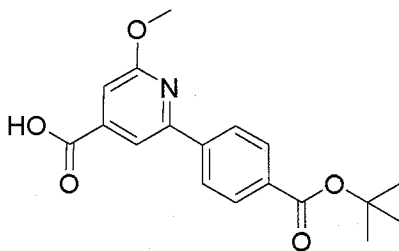
反應器中。在 25 至 30°C 下經 30 至 40 min 分 5 部份添加 N-溴丁二醯亞胺 (32.4 Kg) 且持續攪拌 30 至 60 min。緩慢地添加在水 (102L) 中的硫代硫酸鈉五水合物 (5.4 Kg) 之溶液，使內溫維持在低於 30°C。將混合物攪拌 20 至 30 min，接著在減壓下低於 45°C 下蒸發溶劑。將殘餘物冷卻至 25 至 30°C 且將 2-甲基四氫呋喃 (420L) 與水 (90L) 一起裝入反應器中。將混合物攪拌 15 至 20 min，接著將層分開，將水層再以 2-甲基四氫呋喃 (120L) 萃取。將合併的有機萃取物在 25 至 30°C 下以水 (120L) 中的氫氧化鈉 (4.8 Kg) 之溶液處理 15 至 20 min。將層分開且將有機層以水 (120L)，接著以水 (120L) 中的氯化鈉 (12 Kg) 之溶液清洗且接著經硫酸鈉 (6 Kg) 乾燥。在過濾後，將濾餅以 2-甲基四氫呋喃 (30L) 清洗且將合併的過濾物裝回反應器中。在減壓下低於 45°C 下完全蒸發溶劑且將殘餘物溶解在四氫呋喃 (201L) 中。將三級丁醇鉀 (60.6 Kg) 及四氫呋喃 (360L) 在 25 至 30°C 下裝入另一乾淨且乾燥的反應器中。將四氫呋喃中的殘餘物之溶液緩慢地添加至該混合物中，使溫度維持在低於 30°C。接著將反應混合物溫熱至 60 至 65°C 且保持在此溫度下 1 至 2h。在完成時，將混合物冷卻至 0 至 10°C，且以氫氯酸溶液 (1N，196L) 緩慢地淬滅，使內溫維持在低於 10°C。容許反應混合物溫熱至 25 至 30°C 且裝入乙酸乙酯 (798L)。在攪拌 15 至 20 min 後，將層分開且將水層再以乙酸乙酯 (160L) 萃取。將合併的有機層以水 (160L) 清洗，經硫酸鈉 (8 Kg) 乾燥，過濾且將濾餅以乙酸乙酯 (300L) 清洗。在減壓下低於 45°C 下完全蒸發

溶劑且將乙酸乙酯(540L)裝入25至30°C下的反應器中，接著裝入甲醇(156L)。將混合物冷卻至0至5°C，在此時緩慢地添加乙醯氯(79.8 Kg)，使溫度維持在特定的範圍內。接著容許混合物溫熱至20至25°C且以攪拌保持在此溫度下4至5h。將所得漿液過濾且將固體以乙酸乙酯(120L)清洗，接著在40至45°C下經8至10h乾燥，以供應所欲粗製產物(33.5 kg, 65%)。

最終的純化步驟係藉由將此粗製固體(56.8 Kg)在25至30°C下於乾淨的乾燥反應器中溶解在甲醇(454.4L)中來進行。將溶液攪拌30至45 min，接著在25至30°C下通過0.2微米濾筒進入乾淨且乾燥的反應器中。在減壓下低於50°C下蒸餾出甲醇，直到剩餘~1 vol溶劑。將反應混合物冷卻至25至30°C且通過0.2微米濾筒裝入新鮮乙腈(113.6L)。在減壓下低於50°C下蒸餾出溶劑，直到剩餘~1 vol溶劑。將反應混合物冷卻至25至30°C且通過0.2微米濾筒裝入新鮮乙腈(190L)至反應器中。將混合物溫熱至65至70°C且攪拌45 min，接著冷卻至25至30°C且攪拌1h。將所得漿液過濾且將濾餅以急冷(15°C)的乙腈(56.8L)清洗。將固體在40至50°C之減壓下經8h乾燥，以供給中間物A1 (36.4 kg, 64%)。
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.43 (s, 1H), 5.32-5.42 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 4H), 2.89 (s, 2H), 2.64 (s, 2H), 1.69-1.90 (m, 4H), 1.37-1.45 (m, 6H); ESI $[\text{M}+\text{H}]^+ = 248$ 。

中間物A2：2-(4-(三級丁氧基羰基)苯基)-6-甲氧基異菸鹼

酸

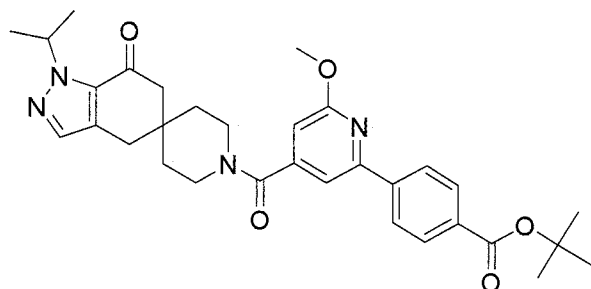


將 2,6-二氯異菸鹼酸 (30 Kg) 及 甲醇 (120L) 在 20 至 25°C 下裝入乾淨且乾燥的反應器中。將漿液攪拌 5 min，接著加熱至 65°C (回流)。接著經由加料漏斗經至少 4h 緩慢地裝入在甲醇中的甲醇鈉溶液 (30%，87.2 Kg)。將漏斗以甲醇 (15L) 沖洗且在 65°C 下進行至少 15h 攪拌。接著將混合物冷卻至 45°C 且在減壓下蒸餾，直到 ~90L 之殘餘體積。接著將水 (180L) 中的碳酸氫鉀 (28.2 Kg) 及碳酸鉀 (21.6 Kg) 之溶液在 40 至 45°C 下裝入反應器中。將含有水溶液的反應器以水 (21L) 沖洗且將洗液裝入反應混合物中。將混合物在減壓下低於 80°C 下蒸餾，直到 ~240L 之殘餘體積，接著冷卻至 20 至 25°C。

將 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼雜環戊烷-2-基) 苯甲酸三級丁酯 (52.3 Kg) 及 二噁烷 (340 Kg) 裝入另一乾淨且乾燥的反應器中，且在 2 至 25°C 下攪拌，直到完全溶解。接著將前反應器的內容物在 40°C 下加熱以確保完全溶解且轉移至此新反應器中。將反應混合物冷卻至 20 至 25°C 且經由真空/氮氣循環執行脫氧步驟。將混合物再冷卻至 0 至 10°C，且將乙酸鈮 (0.65 Kg) 裝入反應器中，接著在氮氣流下裝入三苯基膦 (2.46 Kg)。將混合物溫熱至 20 至 25°C 且經由

真空/氮氣循環進行另一脫氧步驟。接著將混合物加熱至 80°C 且在此溫度下維持至少 18h。將混合物冷卻至 20 至 25°C，接著將甲基三級丁基醚 (133.2 Kg) 及水 (30L) 連續裝入反應器中。將層分開且將水層以水 (110L) 稀釋，接著以甲基三級丁基醚 (110L) 萃取。將合併的有機萃取物以水 (84L) 中的檸檬酸 (52 Kg) 之溶液清洗且將層分開。將水層再以甲基三級丁基醚 (88.8 Kg) 萃取且將有機層合併，接著以水 (80L) 中的氯化鈉 (43 Kg) 之溶液的三分之一清洗三次。在最後的層分開後，將有機層通過含有木炭筒的頗爾 (pall) 過濾器過濾且將濾餅以甲基三級丁基醚 (11.2 Kg) 清洗。將過濾物在減壓下低於 50°C 下蒸餾至 ~90L 且接著在低於 50°C 下與庚烷 (120L) 連續共同蒸餾及至 ~120L。接著將混合物經 1h 冷卻至 20 至 25°C，接著在此溫度下再攪拌 1h。將漿液過濾且將濾餅以庚烷 (3x18L) 清洗三次，接著以乙腈 (3x18L) 清洗三次。將所得濕固體在真空及氮氣流下低於 45°C 下經至少 15h 乾燥，以供給中間物 A2 (44.6 kg, 87% 之產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.13 (s, 2H), 8.09 (s, 2H), 7.97 (d, J=1.17 Hz, 1H), 7.34 (d, J=0.98 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 1.61 (s, 9H); ESI [M+H]⁺ = 330。

中間物 A3：4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸三級丁酯



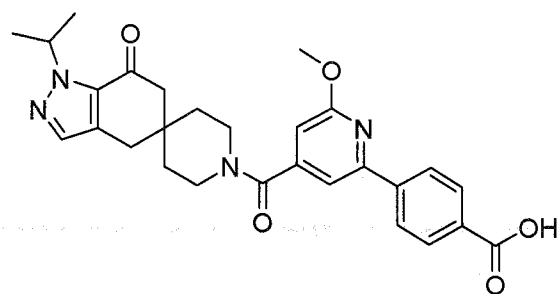
將2-(4-(三級丁氧基羰基)苯基)-6-甲氧基異菸鹼酸(中間物 A2, 15.2g, 46.2 mmol)及乙酸乙酯(140 mL)裝入圓底燒瓶中。添加一份1,1'-羰基二咪唑(8.98g, 55.4 mmol)且在rt下攪拌1h。添加1-異丙基-4,6-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-7(1H)-酮鹽酸鹽(中間物 A1, 14.8g, 52.2 mmol), 接著添加N,N-二異丙基乙胺(9.1 mL, 52.2 mL)且將反應在rt下攪拌18h。添加水性2 M HCl (40 mL), 接著添加1 M硫酸氫鉀(40 mL)及50 mL庚烷。將所獲得的混合物在rt下攪拌1h。將混合物轉移至分液漏斗。將有機相分開, 以水(20 mL)、飽和碳酸氫鈉(30 mL)、水(20 mL)、鹽水(20 mL)連續清洗, 經20g硫酸鎂及10g矽膠乾燥, 過濾且在真空中濃縮。在濃縮趨向結束時開始形成固體。將殘餘物在80°C下於40 mL乙酸乙酯中攪拌且緩慢地逐滴添加庚烷(120 mL)。將混合物在80°C下攪拌1h, 接著經1h以攪拌緩慢地冷卻至室溫且在rt下攪拌18h。經由過濾收集固體, 以水及乙酸乙酯-庚烷(1:3)清洗且在50°C之真空下經18h乾燥, 以獲得中間物 A3 (19.64g, 76%之產率)。

中間物 A3之替代製備法：

將乙腈(219 Kg)及2-(4-(三級丁氧基羰基)苯基)-6-甲氧

基異菸鹼酸(中間物 A2, 34.8 Kg)在 20 至 25°C 下裝入乾淨且乾燥的反應器中。將混合物攪拌 5 min, 接著分三連續部分裝入 1,1-羰基二咪唑(18.9 Kg)。將漿液在 20 至 25°C 下再攪拌至少 1h, 接著將 1-異丙基-4,6-二氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-7(1H)-酮鹽酸鹽(中間物 A1, 33.0 Kg)裝入反應器中, 接著經由幫浦裝入 N,N-二異丙基乙基胺(20.5 Kg)。將試劑幫浦以及反應器壁以乙腈(13.7 Kg)清洗且在 20 至 25°C 下進行至少 2h 攪拌。在完成時, 將混合物以 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸三級丁酯(中間物 A3, 209g)種晶且攪拌至少 30 min。在確認開始結晶後, 經 1h 裝入在水(257L)中的檸檬酸單水合物(58.5 Kg)之溶液。將所得漿液在 20 至 25°C 下再攪拌至少 2h, 接著過濾且將濾餅以乙腈(68.4 Kg)與水(87L)之混合物清洗。亦使用此洗液沖洗反應器。將固體在減壓下低於 55°C 下乾燥, 以供給中間物 A3 (43.44 kg, 73%之產率)。

化合物 A (成為游離酸): 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸



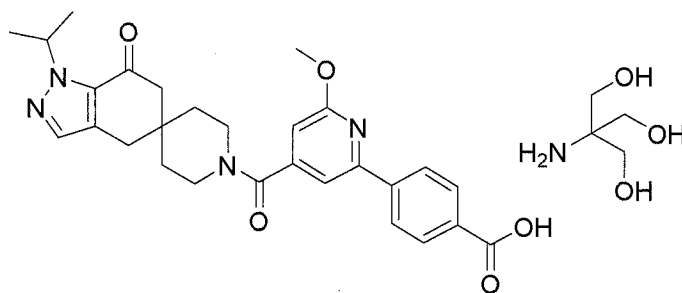
將 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸三級丁酯 (3.7 g, 6.6 mmol) 及甲苯 (25 mL) 裝入圓底燒瓶中。以攪拌逐滴添加 85% 之磷酸 (3.0 mL) 且將反應加熱至 60°C 經 4 小時。形成無色的稠膠。將反應冷卻至 rt 且添加水。觀察到白色固體。將甲苯有機層棄置，保留水層及固體。添加乙酸乙酯 (60 mL) 且添加 4N NaOH 溶液以調整 pH 至 ~7。將層分開且將水層以乙酸乙酯 (50 mL) 萃取。將合併的乙酸乙酯有機層經硫酸鈉乾燥、過濾且在真空中濃縮，以提供白色固體。將該等固體在 50°C 下溶解於乙酸乙酯 (80 mL) 中且緩慢地添加庚烷 (90 mL)。移除熱，將混合物冷卻至 rt 且攪拌 16h。經由過濾收集所得固體，以母液沖洗且乾燥，以提供呈白色固體的標題化合物 (化合物 A 之游離形式，2.15 g, 65% 之產率)。

化合物 A (成為游離酸) 之替代製備法：

將乙腈 (130.4 Kg) 及 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基) 苯甲酸三級丁酯 (中間物 A3, 20.72 Kg) 在 20 至 25°C 下裝入乾淨且乾燥的反應器中。將混合物攪拌 5 min，接著在溫和的氮氣吹掃下裝入對甲苯磺酸 (8.5 Kg)。將反應混合物溫熱至 70°C 且在此溫度下維持至少 6.5h。在完成時，將混合物冷卻至 40°C，以化合物 A (104g) 種晶且經至少 1h 緩慢地裝入水 (83L)。將混合物在 40°C 下再攪拌最少 4h，接著經 2h

冷卻至 20 至 25°C。再攪拌至少 2h，接著過濾且將濾餅以乙腈 (33 Kg) 及水 (41L) 之溶液沖洗。亦使用此洗液沖洗反應器。將所得固體在減壓下低於 55°C 下乾燥，以供給化合物 A (16.5 kg, 89% 之產率)。

化合物 A 之形式 1 - 無水單-參 (mono-tris) 的化合物 A 之製備法：



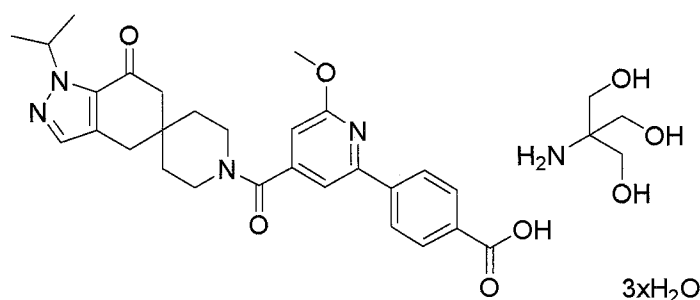
將 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸 (151 mg, 0.300 mmol) 及 3 mL 乙醇裝入小瓶中。將混合物加熱至 80°C 經 5 分鐘以溶解固體且接著冷卻至 rt。添加參(羥基甲基)胺基甲烷 (39 mg, 0.32 mmol) 且將混合物在 rt 下攪拌隔夜。逐滴添加庚烷 (2.25 mL) 以產生漿液，將其加熱至 50°C 以產生澄清溶液。將混合物以攪拌冷卻至 rt 隔夜。觀察到白色固體且將混合物再攪拌 3 天。將材料過濾且在 50°C 之真空烘箱中經隔夜乾燥，以產生形式 1 (151 mg, 0.242 mmol, 81% 之產率)。

化合物 A 之形式 1：無水單-參的化合物 A 之替代製備法：

將乙醇 (83L) 裝入乾淨且乾燥的反應器，接著裝入化

合物 A (9.43 Kg)及參(2.55 kg)，同時將混合物維持在20至25°C之溫度下。將槽壁以乙醇(2L)沖洗且將所得混合物在65至70°C下加熱，在此溫度下維持至少30分鐘，直到所有固體溶解，接著冷卻至45至50°C。通過連線的10 μm聚丙稀過濾器執行溫過濾且將反應器以及過濾器以乙醇(9L)清洗。將正庚烷(24L)通過相同的連線過濾器裝入溫溶液中且將混合物在45至50°C下以乙醇(0.5L)中的4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸無水參鹽(100g)種晶。將溫度保持至少2h，然後經至少2h冷卻至20至25°C。進行至少5天攪拌。接著過濾漿液且將濾餅以乙醇(13L)與正庚烷(6L)之混合物清洗。將固體在減壓下低於45°C下經至少12h乾燥，以供給實施例1(11.7 kg，77%)。

化合物 A 之形式 2 - 化合物 A 之單-參鹽的三水合物之製備法：



化合物 A 之形式 2 係自轉化化合物 A 之形式 1 而獲得。將形式 1 (1.7214g，2.760 mmol)、異丙醇(16.50 mL，215.8 mmol)及水(688 μL，38.190 mmol)添加至 50 mL EasyMax 反應器中。將混合物在 25°C 的反應器夾套溫度下攪拌(300

rpm)約72 hr。接著將反應混合物經15 min溫熱至40°C且在40°C下保持約24小時，一旦冷卻至20°C，取出用於測試的樣品。以PXRD查看到混合物形式；因此添加額外的水(688 μL, 38.190 mmol)。將攪拌速率增加至400 rpm，容許漿液攪拌6小時且接著冷卻至15°C。在60 mL/40 M過濾器上分離出固體且以96/4之異丙醇/水清洗。所得材料以PXRD確認與化合物A之形式2一致。

化合物A之形式2 - 化合物A之單-參鹽的三水合物之替代製備法：

將異丙醇(60.4 Kg)裝入乾淨且乾燥的反應器中，且添加化合物A(16.68 Kg)及參(4.42 kg)，同時將混合物維持在20至25°C之溫度下。將混合物攪拌5 min，接著裝入水(6.7 Kg)且將漿液溫熱至55°C。現將澄清的溶液通過連線的10 μm聚丙烯過濾器過濾至預溫熱之乾淨且乾燥的反應器(50至55°C)中。接著將溶液以化合物A之單參鹽(成為三水合物)(167g)種晶。在驗證晶種持續存在後，將混合物經至少2h冷卻至15°C，接著在15°C下維持最少16h。將漿液過濾且將濾餅以急冷的異丙醇(13.1 Kg)清洗。接著將固體在減壓下低於25°C下乾燥，供給僅化合物A之形式2(22.1 kg, 98%之產率)。

化合物A之形式1為無水的且在周圍溫度下具有低於約0.2之水活性(20%之RH)的熱力學穩定性。化合物A之形式1具有與圖3中所示之化合物A實質上相同的PXRD圖案。化

化合物 A 之形式 1 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 2θ 表示的特徵性 PXRD 峰係在 9.6、10.7 和 11.3。將圖 3 中的 PXRD 圖案之峰位置及強度提供於表 2 中。

表2-化合物A之形式1的PXRD峰及相對強度

$2\theta \pm 0.2^\circ$ 20度	相對 強度(%)	$2\theta \pm 0.2^\circ$ 20度	相對 強度(%)	$2\theta \pm 0.2^\circ$ 20度	相對 強度(%)
5.2	62	17.8	86	25.4	25
9.6	13	18.9	100	26.4	9
10.7	14	19.5	77	26.6	11
11.3	11	20.1	11	27.2	9
12.1	6	21.1	29	28.3	9
13.3	60	22.2	15	29.3	10
13.9	9	22.4	19	29.9	9
14.0	10	22.6	21	30.4	13
15.5	11	23.6	53	31.7	13
16.2	58	24.1	54	33.4	15
17.0	27	24.5	16		

化合物 A 之形式 1 具有與圖 4 中所示之實質上相同的拉曼光譜。化合物 A 之形式 1 具有以 cm^{-1} 表示在 568、698、989、1218、1511、1561 和 1615、 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的特徵性拉曼峰位位移。將圖 4 中的化合物 A 之形式 1 的峰位置 ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) 及標準化強度 (W=弱，M=中，S=強) 列於表 3 中。

表3 - 化合物A之形式1的拉曼峰及標準化強度

拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度	拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度	拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度
115	M	794	W	1363	W
156	W	842	W	1388	W
170	W	885	W	1435	W
241	W	929	W	1466	W
274	W	989	W	1478	W
311	W	1011	W	1511	W
334	W	1047	W	1561	W
350	W	1071	W	1615	S
417	W	1090	W	1671	M
456	W	1119	W	2840	W
476	W	1143	W	2885	W
568	W	1169	W	2914	W
608	W	1187	W	2945	W
628	W	1196	W	2998	W
653	W	1218	W	3027	W
678	W	1244	W	3066	W
698	W	1265	W	3129	W
755	W	1315	W		
779	W	1345	M		

化合物A之形式1具有與圖5中所示之實質上相同的¹³C ssNMR光譜。化合物A之形式1具有以ppm表示在22.9、146.2、157.9、161.9和172.9、±0.2 ppm的特徵性¹³C ssNMR化學位移。將圖5中所示之化合物A之形式1的¹³C化學位移(±0.2 ppm)列於表4中。

表4 - 化合物A之形式1的 ¹³C 化學位移及強度

¹³ C 化學 位移 (ppm)	強度	¹³ C 化學 位移 (ppm)	強度	¹³ C 化學 位移 (ppm)	強度
20.1	95	56.4	84	137.5	62
22.9	90	59.1	27	137.9	59
28.4	66	61.2	55	144.9	44
34.3	68	107.1	65	146.2	48
37.7	100	118.9	42	157.9	36
40.8	63	126.6	59	161.9	44
42.5	76	127.3	70	168.6	36
44.3	66	130.2	47	172.9	38
51.6	87	131.7	92	187.7	56
53.6	96	132.3	56		

化合物 A 之形式 2 為三水合物且在周圍溫度及 20% RH 下為高於約 0.2 之水活性的熱力學穩定性。化合物 A 之形式 2 具有與圖 6 中所示之實質上相同的 PXRD 圖案。化合物 A 之形式 2 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 2θ 表示的特徵性 PXRD 峰係在 8.4、9.0、10.5、15.0 和 24.7。將圖 6 中的 PXRD 圖案之峰位置及強度提供於表 5 中。

表5 - 化合物A之形式2的PXRD峰及相對強度

20±0.2° 2θ度	相對 強度(%)	20±0.2° 2θ度	相對 強度(%)	20±0.2° 2θ度	相對 強度(%)
5.0	11	16.1	10	26.9	71
8.4	18	16.7	59	28.2	52
9.0	12	17.4	74	29.0	15
10.0	6	17.8	13	29.4	18
10.5	62	18.6	30	29.9	13
12.1	9	18.9	45	31.4	15
13.3	46	19.9	93	31.7	16
13.7	45	20.1	50	32.4	14
13.9	46	21.2	46	33.6	5
14.6	37	21.5	21	34.5	7
15.0	80	24.7	100	37.0	12
15.4	15	25.2	97		

化合物 A 之形式 2 具有與圖 7 中所示之實質上相同的拉曼光譜。化合物 A 之形式 2 具有以 cm^{-1} 表示在 562、692、984、1225、1507、1557 和 $1610 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的特徵性拉曼峰值位移。將圖 7 中的化合物 A 之形式 2 的峰位置 ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) 及標準化強度 (W=弱, M=中, S=強) 列於表 6 中。

表6 - 化合物A之形式2的拉曼峰及標準化強度

拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度	拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度	拉曼峰位置 (cm ⁻¹)	標準化 強度
123	W	864	W	1344	W
179	W	884	W	1369	W
232	W	931	W	1387	W
284	W	984	W	1410	W
405	W	1019	W	1433	W
441	W	1048	W	1460	W
481	W	1077	W	1480	W
562	W	1097	W	1507	W
620	W	1109	W	1557	M
628	W	1118	W	1610	S
639	W	1140	W	1670	W
650	W	1194	W	2884	W
667	W	1225	W	2916	W
692	W	1246	W	2946	W
710	W	1261	W	2995	W
758	W	1277	W	3073	W
790	W	1305	W	3108	W
839	W	1321	W		

化合物A之形式2具有與圖8中所示之實質上相同的¹³C ssNMR光譜。化合物A之形式2具有以ppm表示在19.2、149.5、155.6、163.8和188.3、±0.2 ppm的特徵性¹³C ssNMR化學位移。將圖8中所示之化合物A之形式2的¹³C化學位移(±0.2 ppm)列於表7中。

表7 - 化合物A之形式2的 ^{13}C 化學位移及強度

^{13}C 化學 位移 (ppm)	強度	^{13}C 化學 位移 (ppm)	強度	^{13}C 化學 位移 (ppm)	強度
19.2	60	63.1	44	139.1	33
25.7	87	107.0	40	149.5	33
32.0	40	108.7	35	155.6	30
38.0	92	125.1	56	163.8	36
38.5	94	128.0	44	169.5	26
44.2	41	130.0	70	174.0	29
53.2	100	132.3	33	188.3	39
55.5	53	135.9	37		
59.4	76	137.4	35		

基於本文所提供的揭示內容，發明所屬技術領域中具有通常知識者應理解化合物A之各形式1和形式2可藉由幾個不同的光譜峰或圖案以不同的組合進行獨特的鑑定。下文說明特徵峰值的示例性組合，可使用其分別鑑定化合物A之形式1和形式2，但絕不應將該等示例性組合視為限制本文所揭示之其他峰值組合。

為了確認化合物A之形式2中有三個水分子的存在，使用Bruker D8 Venture繞射儀在室溫下收集數據。參見圖9。結構係藉由使用SHELX套裝軟體以單斜晶族空間群 $P2_1/c$ 之內在定相解析(5.1版，Bruker AXS，1997)來處置。接著將結構以全矩陣最小平方法精修。發現所有的非氫原子且使用各向異性位移參數精修。

位於氮及氧上的氫原子係自傅立葉差異圖(Fourier difference map)發現且以約束的距離精修。剩餘的氫原子係安置在計算出的位置上且容許該等氫原子搭載於彼等的載承原子上。

最終的R指數為7.2%。最終的差異傅立葉揭露無遺失或錯位的電子密度。

表8提供關於化合物A之形式2所收集的數據：

表8	
實驗式	$C_{28}H_{30}N_4O_5 \cdot C_4H_{11}NO_3 \cdot 3H_2O$
式量	677.74
溫度	RT
波長	1.54178 Å
晶系	單斜晶系
空間群	$P2_1/c$
單位晶格尺寸	$a = 17.6927(9) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 13.2753(7) \text{ Å}$ $\beta = 92.451(3)^\circ$ $c = 14.6480(8) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$
體積	$3437.3(3) \text{ Å}^3$
Z	4
密度(計算值)	1.310 Mg/m^3
對F ² 之適合度	1.053
最終的R指數[I>2σ(I)]	R1 = 0.0723, wR2 = 0.1835
R指數(所有數據)	R1 = 0.1244, wR2 = 0.2110

4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸之結晶狀2-胺基-2-(羥基甲基)丙烷-1,3-二醇鹽。此結晶鹽通常稱為化合物A之參鹽。

化合物A之結晶狀參鹽，其中4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸對鹽之比為1：1。

化合物A之結晶狀參鹽，其中結晶鹽為無水結晶鹽。

化合物A之無水結晶狀參鹽，其中該無水結晶鹽具有

包含在 9.6 、 10.7 和 11.3 2θ ， $\pm 0.2^\circ$ 2θ 之繞射角的峰之 PXRD 圖案。

化合物 A 之無水結晶狀參鹽，其中該無水結晶鹽具有包含在 1511 、 1561 和 1615 $\text{cm}^{-1} \pm 2$ cm^{-1} 之峰值位移的拉曼光譜。

化合物 A 之無水結晶狀參鹽，其中該無水結晶鹽具有包含在 22.9 、 146.2 和 161.9 $\text{ppm} \pm 0.2$ ppm 之化學位移的 ^{13}C ssNMR 光譜。

化合物 A 之無水結晶狀參鹽，其中該無水結晶鹽具有選自由下列所組成之群組的分析參數：包含在 1511 和 1615 $\text{cm}^{-1} \pm 2$ cm^{-1} 之峰值位移的拉曼光譜，及包含在 22.9 、 146.2 或 161.9 ppm 、 ± 0.2 ppm 之至少一個化學位移的 ^{13}C ssNMR 光譜。

化合物 A 之無水結晶狀參鹽，其中該無水結晶鹽為實質上純。

化合物 A 之結晶狀參鹽，其中結晶鹽為三水合物結晶鹽。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶鹽具有包含在 8.4 、 9.0 和 10.5 2θ 、 $\pm 0.2^\circ$ 2θ 之繞射角的峰之 PXRD 圖案。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶鹽具有包含在 1507 、 1557 和 1610 cm^{-1} 、 ± 2 cm^{-1} 之峰值位移的拉曼光譜。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶

鹽具有包含在 19.2、149.5 和 163.8 ppm、 ± 0.2 ppm 之化學位移的 ^{13}C ssNMR 光譜。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶鹽具有選自由下列所組成之群組的分析參數：

包含在 8.4 和 9.0 2θ 、 $\pm 0.2^\circ$ 2θ 之繞射角的峰之 PXRD 圖案，

包含在 1557 或 1610 cm^{-1} 、 ± 2 cm^{-1} 之峰值位移的拉曼光譜，及

包含在 19.2、149.5 或 163.8 ppm、 ± 0.2 ppm 之至少一個化學位移的 ^{13}C ssNMR 光譜。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶鹽具有選自由下列所組成之群組的分析參數：包含在 8.4 和 9.0 2θ 、 $\pm 0.2^\circ$ 2θ 之繞射角的峰之 PXRD 圖案，及包含在 1507、1557 或 1610 cm^{-1} 、 ± 2 cm^{-1} 之至少一個峰值位移的拉曼光譜。

化合物 A 之三水合物結晶參鹽，其中該三水合物結晶鹽具有選自由下列所組成之群組的分析參數：包含在 8.4 和 9.0 2θ 、 $\pm 0.2^\circ$ 2θ 之繞射角的峰之 PXRD 圖案，及包含在 19.2、149.5 或 163.8 ppm、 ± 0.2 ppm 之至少一個化學位移的 ^{13}C ssNMR 光譜。

藥理學數據

以下方案當然可由發明所屬技術領域中具有通常知識者改變。

隨機、媒劑對照、8個平行分組研究係在雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Charles River (Boston, MA)) 中進行，以獲得循環及肝臟 TG 含量。使用標準的實驗室條件圈養 96 隻大鼠 (~200g)；將彼等以成對圈養且保持在 12：12 小時的逆向光-暗時間表 (在 8:00 AM 關燈)。大鼠係在抵達後隨機分為正常膳食 (chow) 或西方膳食組及劑量組，且在研究開始前給予 14 天基於標準的大鼠正常膳食或西方膳食之導入期。標準的實驗室嚙齒動物正常膳食 5053 係來自 LabDiet (PMI, St Louis, Missouri)。西方膳食 D12079Bi 係來自 Research Diets (New Brunswick, NJ)。

製備用於該等研究之媒劑，製造在去離子水中的 0.5% (wt/體積) 之甲基纖維素 (MC, Sigma Aldrich; 274429)。具有化合物 A (自參鹽製得) 或化合物 D 的儲備溶液係以各自的化合物製備，以提供使得 10 mL 之溶液可遞送所欲 mg/kg 之劑量的濃度，其中所使用之大鼠平均重量為約 200g。

在研究的第 1 天開始，將大鼠以媒劑對照 (在去離子水中的 0.5% 之 MC (wt/體積 %))、低或高劑量的化合物 A (分別為 1 mg/kg 或 10 mg/kg QD)、低或高劑量的化合物 D (分別為 5 mg/kg 或 30 mg/kg BID)、或共同投予的低劑量 (1 mg/kg QD 之化合物 A 及 5 mg/kg BID 之化合物 D)、或共同投予的高劑量 (10 mg/kg QD 之化合物 A 及 30 mg/kg BID 之化合物 D) 經口給藥 (10 mL/kg)。

進食之血漿分析物：用於測定進食之血漿 TG 濃度的血液係在劑量後 2 小時 (進入暗循環 2 小時) 經由側尾靜脈收

集，轉移至以乙二胺四乙酸二鉀 (K_2EDTA) 塗佈之 BD Microtainer 管 (PN365974) 且在 $4^\circ C$ 下離心。接著將所得血漿樣品在 Siemens Chemistry XPT 臨床分析儀 (Malven, PA) 上使用 Siemens 三酸甘油酯₂ 檢定試劑 (參考 10335892) 分析。

空腹之血漿分析物：用於測定空腹之血漿 TG 的血液係在空腹 4 小時後，劑量後 2 小時 (進入暗循環 2 小時) 經由側尾靜脈收集，轉移至以 K_2EDTA 塗佈之 BD Microtainer 管 (PN365974) 且在 $4^\circ C$ 下離心。接著將所得血漿樣品在 Siemens Chemistry XPT 臨床分析儀 (Malven, PA) 上使用 Siemens 三酸甘油酯₂ 檢定試劑 (參考 10335892) 分析。

在研究的最後一天 (第 28 天)，將大鼠在空腹 4 小時後，劑量後 2 小時犧牲以收集組織：在劑量後 2 小時，用於測定血漿分析物的血液係經由側尾靜脈收集且接著將動物以 CO_2 窒息犧牲。將血液轉移至以 K_2EDTA 塗佈之 BD Microtainer 管 (PN365974)，在 $4^\circ C$ 下離心，將血漿轉移至 96 孔微量滴定盤中且保存在 $-20^\circ C$ 下。將肝臟迅速取出，以液態 N_2 中預冷卻之 Wollenberg 鉗冷凍夾緊，個別包裹在鋁箔中且隨後保存在 $-80^\circ C$ 下。

組織粉碎：將冷凍的肝臟在液態 N_2 中冷卻的鋁塊上迅速粉碎，確保組織在整個粉碎過程中維持冷凍。將粉碎之組織轉移至 7 mL 聚丙烯錐形管且儲存在 $-80^\circ C$ 下，直到分析。

肝臟三酸甘油酯之萃取：將約 50 至 100 mg 粉碎之組織

添加至含有 800 μL 冰冷的 1 : 1 之 CHCl_3 : MeOH 的 2 mL 分解基質 D 管 (MP Bio) 中。將樣品立即在 4°C 下使用 Qiagen 組織研磨機 II (Qiagen 目錄號 85300) 以 30 Hz 萃取 4 分鐘。接著將勻質物轉移至 13 \times 100 mm 玻璃管中且放置在冰上。接著將研磨管以 800 μL 的 1 : 1 之 CHCl_3 : MeOH 沖洗，渦旋 30 秒且接著添加至 13 \times 100 mm 玻璃管中。在冰上時，將 2.4 mL 之 100% CHCl_3 添加至所有玻璃小瓶中，使 CHCl_3 : MeOH 達到 4 : 2 之比。接著將樣品放入 -20°C 冷凍櫃中隔夜。在次日，添加 1.75 mL 之 1M KCl H_2O ，使 CHCl_3 : MeOH : H_2O 達到 4 : 2 : 1.75 之比。接著將樣品渦旋 30 秒且在 4°C 下以 1500 rpm \times 15 min 離心。在離心後，將有機相轉移至新的 13 \times 100 mm 萃取管中，在 N_2 下以 37°C 乾燥且再懸浮至 750 μL 之 CHCl_3 中。將胺基丙基固相萃取 (SPE) 筒 (Waters 目錄號 054560，6 mL，500 mg) 弄濕且以 5 mL 己烷清洗。在清洗後，將 CHCl_3 中的 200 μL 樣品萃取液添加至筒中且以真空移除而不乾燥管柱。接著將中性脂質以 5 mL 的 2 : 1 之 CHCl_3 : 異丙醇 / 50 μM 丁基化羥基甲苯溶析。接著將樣品在 N_2 下以 37°C 乾燥且再懸浮至 1.75 mL 的 98 : 2 之異辛烷 : 異丙醇中。將樣品通過 0.2 μM 針筒過濾器過濾，然後注射在 HPLC 氰丙基管柱 (3.5 μM 粒徑 - 4.6 \times 150 mm 管柱，Agilent Zorbax Eclipse XBD-CN) 上。操作方法為使用溶劑 A (1000 : 1 : 2 之異辛烷 : 異丙醇 : 乙酸) 及溶劑 B (50 : 50 之異丙醇 : 甲基三級丁基醚) 以 4 μL 注射液進行 27 分鐘操作時間。自 0 至 3 分鐘，將溶劑組成保持在 100% 之

溶劑 A。自 3 至 8 分鐘，將溶劑組成自 100% 之溶劑 A 改變成 95% 之溶劑 A 及 5% 之溶劑 B。自 8 至 18 分鐘，將溶劑組成改變成 50：50 之比。自 18 至 19 分鐘，將溶劑組成改回 100% 之溶劑 A 且自 19 至 27 分鐘保持此組成。

核及膜部分係使用標準方法自各治療組匯集的粉碎之肝樣品的一部分以超離心製備。將來自核萃取物及膜部分的樣品以西方墨點法對 SREBP1 進行分析。使用鈣連伴護蛋白 (Calnexin) 之西方墨點作為膜部分的標誌，使用肌動蛋白作為總樣品裝載的標誌及使用組織蛋白 2B 作為核部分的標誌。核 SREBP1 含量係使用相對單位來定量且以組織蛋白 2B 標準化，以控制核分群 (fractionation) 及凝膠裝載期間的樣品損失。

將另一部分的粉碎肝進行處理且對脂質生成基因表現進行分析。針對 ACC1、FASN、SCD1、PCSK9 及 SREBP-1c 之大鼠 taqman 探針全部在 qPCR 上使用作為管家基因之 Actb 來評定。

與化合物 A 作為單一療法投予時的血漿及肝 TG 含量比較，(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺 (化合物 D) 或其醫藥上可接受的鹽與 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸 (化合物 A) 或其醫藥上可接受的鹽之組合投予導致顯著降低的血漿 (圖 10、11) 及 TG (圖 18)。

相對於正常膳食餵食的大鼠，以西方膳食餵食導致進

食狀態之血漿TG增加2.2倍(圖10)。相對於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，僅化合物A(單一療法)以低劑量(1 mg/kg QD)或高劑量(10 mg/kg QD)經口投予導致進食狀態之血漿TG分別增加1.7倍及1.3倍。相反地，相對於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，僅化合物D(單一療法)以低劑量(5 mg/kg BID)或高劑量(30 mg/kg BID)經口投予使進食狀態之血漿TG分別降低55%及63%。化合物A及化合物D之共同投予導致完全阻斷在進食狀態經化合物A媒介增加之血漿TG。相對於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，化合物A及化合物D皆以低劑量或皆以高劑量經口共同投予使進食狀態之血漿TG含量降低37%及64%。

相對於正常膳食餵食的大鼠，西方膳食餵食導致空腹狀態之血漿TG增加1.6倍(圖11)。相對於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，作為單一療法的化合物A以低及高劑量經口投予導致空腹之血漿TG分別增加2.4倍及1.7倍。相反地，相對於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，作為單一療法的化合物D以低及高劑量經口投予使空腹之血漿TG分別降低20%及35%。化合物A及化合物D分別皆以低劑量或分別皆以高劑量經口共同投予，完全緩和在僅投予化合物A時所觀察的經化合物A媒介增加之空腹血漿TG。共同投予之化合物A及化合物D的低劑量組(109 mg/dl)及高劑量組(81 mg/dl)之空腹血漿TG含量類似於媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠(96 mg/dl)。

在來自投予媒劑、高劑量化合物A單一療法、高劑量

化合物D單一療法或共同投予高劑量化合物A及高劑量化合物D之西方膳食餵食的大鼠之樣品中比較核SREBP-1定位(圖12)。相對於媒劑治療之西方膳食餵食的大鼠，化合物A之投予造成增加的SREBP-1核定位，表示增加的SREBP-1活化。相反地，化合物D之投予降低SREBP-1核定位及SREBP-1活化。化合物A及化合物D之共同投予阻斷經化合物A媒介增加的核SREBP-1定位，與僅化合物A之單一療法比較，造成降低50%。

相對於正常膳食餵食之媒劑治療的大鼠，以西方膳食餵食且以媒劑治療的動物趨向於顯示增加的脂質生成基因表現：ACC1 (圖13)、FASN (圖14)、SCD1 (圖15)和SREBP1 (圖16)，但沒有PCSK9 (圖17)，其在西方膳食餵食的大鼠中較低。相對於西方膳食餵食且以媒劑治療的動物，化合物A之投予趨向於進一步增加ACC1、FASN (僅高劑量之化合物A)、SCD表現，但沒有PCSK9和SREBP1。相反地，化合物D之投予降低所有的脂質生成基因表現。化合物A及化合物D之共同投予導致與以媒劑治療之西方膳食餵食的大鼠中所觀察到的表現水平相當或更低。

相對於正常膳食餵食的大鼠，以媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠顯示肝臟三酸甘油酯蓄積增加約2.7倍(圖18)。相對於以媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，化合物A以低劑量及高劑量經口投予造成脂肪變性分別降低36%及53%。相對於以媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，化合物D以低劑量及高劑量經口投予同樣地使脂肪變性分別降低

25%及30%。相對於以媒劑投予之西方膳食餵食的大鼠，化合物A及化合物D兩者以低劑量或高劑量經口共同投予使脂肪變性分別降低50%及73%。化合物A及化合物D以低劑量或高劑量組合經口投予造成比作為單一療法之相同劑量水平的化合物A或化合物D投予所觀察到的脂肪變性降低更多。

隨機、媒劑對照、5個平行分組研究係在以缺乏膽鹼及高脂肪膳食(CDAHFD)(Research diets; A16092003)餵食的雄性Wistar-Han大鼠(Charles River (Boston, MA))中進行，以鑑定在作為單一療法單獨或組合投予化合物A或化合物D時對肝發炎和纖維化標誌之改善的差異。使用標準的實驗室條件圈養60隻大鼠(~200g)；將彼等以成對圈養且保持在12：12小時的逆向光-暗時間表(在8:00 AM關燈)。大鼠係在研究開始前的6週開始以缺乏膽鹼及高脂肪膳食(CDAHFD)餵食。大鼠係隨機分為4個給藥組(n=12/組)，每天接受兩次媒劑、化合物A (5 mg/kg)單一療法、化合物D (30 mg/kg)單一療法或共同投予化合物A (5 mg/kg)及化合物D (30 mg/kg)之投予，為期6週。在整個研究中維持正常膳食且每天投予兩次媒劑的動物(n=12)被用作為對照組。在開始投予化合物前及在投予化合物後3週和6週收集血液樣品以評定循環標誌。在第-3週、第0週(第一次投予前)、第3週和第6週進行剪切波彈性成像(Aixplorer Ultimate imager, Supersoinc imagine)測量，以評定隨時間的發炎和纖維化進展。在藥物投予6週後評定

組織學，其相當於以 CDAHFD 進行 12 週。結果係以每一各給藥組的動物之平均值提供。

在以 CDAHFD 進行 12 週後，將動物以 CO₂ 窒息犧牲。收取肝的右外側、內側及左外側葉。自每隻動物的左外側、右內側及右外側葉取得切片，且固定在福爾馬林中及加工成石蠟塊。將每隻動物的一個左側葉切片冷凍保存在最適化切割溫度 (OCT) 化合物中。將來自每隻動物的其餘肝臟冷凍且在液態 N₂ 中冷卻的鋁塊上迅速粉碎，確保組織在整個粉碎過程中維持冷凍。將粉碎之組織轉移且儲存在 -80°C 下，直到分析。將來自每隻動物的一部分粉碎肝樣品進行處理且對纖維生成之基因表現標誌進行分析。針對 α SMA 及 COL1A1 之大鼠 taqman 探針全部在 qPCR 上使用作為管家基因之 Actb 來評定。

下列終點係由理事會認證的獸醫病理學家以定性組織學評估及組織形態定量法評估：藉由 α SMA 免疫組織化學 (IHC) 使肝臟星狀細胞活化及分化成肌纖維母細胞；藉由天狼星紅染色使膠原蛋白與纖維化互相關聯。影像係使用 Visiopharm 軟體分析。一致地應用具有閾值參數的 Visiopharm 應用以鑑定組織切片及以百分比面積定量各 IHC (DAB (3,3'-二胺基聯苯胺) 陽性) 或經組織化學染色之玻片上的標的：關注之染色區域 / 總組織 ROI - 空白) \times 100%。使用非參數統計量分析來自此研究的數據。組值係以平均值 \pm 平均值之標準誤差報告。

相對於正常膳食進食且投予媒劑的對照動物，接受

CDAHFD且投予媒劑的動物顯示在研究期間明顯增加的肝硬度(使用剪切波彈性成像(SWE)評定,以千帕(kPa)測量),表示進展性肝發炎和纖維化(圖19)。作為單一療法的化合物A或化合物D之投予各自降低肝硬度,示意降低的肝發炎及/或纖維化。化合物A及化合物D之共同投予比作為單一療法之任一劑產生更降低肝硬度(圖19)。

相對於正常膳食進食且投予媒劑的對照動物,接受CDAHFD且投予媒劑的動物顯示明顯增加的肝 α 平滑肌肌動蛋白(α SMA)染色,表示肌纖維母細胞活化和纖維生成(圖20)。作為單一療法的化合物A或化合物D之投予各自使 α SMA染色分別減少41%及23%,示意降低的肝臟肌纖維母細胞活化和纖維生成。化合物A及化合物D之共同投予比作為單一療法之任一劑產生更減少的 α SMA染色,減少72%之染色(圖20)。

相對於正常膳食進食且投予媒劑的對照動物,接受CDAHFD且投予媒劑的動物顯示明顯增加的天狼星紅(PSR)染色,表示膠原蛋白沉積及纖維化(圖21)。作為單一療法的化合物A或化合物D之投予各自使PSR染色分別減少26%及20%,示意降低的膠原蛋白沉積及纖維化。化合物A及化合物D之共同投予比作為單一療法之任一劑產生更減少的PSR染色,減少56%之染色(圖21)。

相對於正常膳食進食且投予媒劑的對照動物,接受CDAHFD且投予媒劑的動物顯示明顯增加的離子化鈣結合轉接分子1(Iba1)染色,表示肝臟巨噬細胞活化(圖24)。作

為單一療法的化合物A之投予使Iba1染色減少15%，示意降低的肝臟發炎調性(tone)。儘管作為單一療法的D之投予不改變Iba1染色，但是A及D之共同投予比作為單一療法投予之化合物A產生更減少的Iba1染色，減少33%之染色(圖24)。

相對於正常膳食進食且投予媒劑的對照動物，接受CDAHFD且投予媒劑的動物顯示明顯增加的肝 α 平滑肌肌動蛋白(α SMA)(圖22)及膠原蛋白A1A (COL1A1)(圖23)基因表現，表示肌纖維母細胞活化和纖維生成。作為單一療法的化合物A或化合物D之投予各自降低肝臟 α SMA及COL1A1基因表現，示意降低的肝臟肌纖維母細胞活化和纖維生成。化合物A及化合物D之共同投予比作為單一療法之任一劑產生更減少的肝臟 α SMA (圖22)及COL1A1 (圖23)基因表現。

第II期藥效學、安全性和耐受性研究

進行第2A期、隨機、雙盲、安慰劑對照、平行分組研究以評定在患有非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)的成人中共同投予6週的實施例2之化合物(化合物A)及實施例1之化合物(化合物D)的藥效學、安全性和耐受性。化合物之共同投予包括每12小時經口投予300 mg劑量(各100 mg的3個錠劑)的化合物D及每12小時經口投予15 mg劑量(各5 mg的3個錠劑)的化合物A。

據推測以化合物A抑制乙醯基-CoA (輔酵素A)羧酶1和

2及以化合物D抑制二醯基甘油醯基轉移酶2能以不同及互補的方式調節脂質代謝，示意以兩種化合物之共同投予可導致比單獨投予之任一劑改善的效益-風險概況。全肝脂肪(WLF)之主要PD終點、關於安全性(血小板)和耐受性之關鍵次要終點及關鍵第三/探索性PD和生物標誌終點(包括脂質(例如三酸甘油酯，TG)和肝功能測試(LFT))的結果總結於以下表9中：

表9：全肝脂肪、三酸甘油酯及血小板之治療效應的總結(自基線至第42天的變化，經安慰劑調整)。

表9

治療	N	經安慰劑調整，在第42天自基線的變化% (N=12)		
		肝脂肪PDF	三酸甘油酯	血小板
		LS平均值 (90% CI)	LS平均值 (90% CI)	LS平均值 (90% CI)
化合物A 15mg Q12H	22	-44.52 (-54.97, -31.65)	47.30 (21.77, 78.19)	-7.12 (-14.51, 0.91)
化合物D 300 mg Q12H	24	-35.40 (-47.40, -20.68)	-8.63 (-24.37, 10.38)	7.50 (-0.99, 16.71)
化合物A 15 mg Q12H + 化合物D 300 mg Q12H	26	-44.64 (-54.80, -32.19)	6.00 (-12.21, 27.99)	1.23 (-6.75, 9.91)

CI = 信賴區間

在第42天對全肝脂肪(WLF)及三酸甘油酯的關鍵發現顯示：i)所有的治療分組皆符合WLF的預指定之決策準則(亦即 $\geq 95\%$ 之信賴度，治療分組優於安慰劑；且觀察到經安慰劑調整之減少量大於30%之標的值)；ii)以化合物A之單一療法誘發明顯的三酸甘油酯升高，及以化合物D之單一療法導致適度降低的三酸甘油酯；及iii)與安慰劑比較，化合物A及化合物D之共同投予導致三酸甘油酯值的變化最小，造成有力地緩和以化合物A之單一療法查看到的三酸甘油酯升高。

安全性和耐受性的關鍵發現顯示：i)所有的治療分組

在研究期間通常為安全的且耐受良好；及 ii) 未於任何治療分組中觀察到具有臨床意義的血小板變化。與安慰劑比較，以化合物 A 單一療法分組觀察到減少的血小板。這於化合物 D 中不明顯。驚訝的是化合物 A/化合物 D 之共同投予分組中的血小板減少得到改善。

總的看來，化合物 A/化合物 D 之共同投予通常為安全的且耐受良好，提供比單獨的化合物 D 投予更多的 WLF 降低且實質地緩和以化合物 A 之單一療法相關聯的誘發之三酸甘油酯升高。

基線特徵

以下表 10 提供有關研究群體的關鍵人口統計學及基線特徵的訊息。

表10

	安慰劑 Q12H	化合物 A (15mg Q12H)	化合物 D (300mg Q12H)	化合物 A (15mg Q12H) + 化合物 D (300mg Q12H)
N	14	29	29	28
年齡	56.9 (13.3)	55.3 (10.6)	53.5 (11.0)	53.2 (9.6)
性別: 男性	7 (50.0)	15 (51.7)	13 (46.4)	18 (64.3)
種族: 白種人	13	25	26	25
其他	1	4	2	3
體重(kg)	95.94	99.68	100.48	104.69
BMI(kg/m ²)	34.69	35.01	36.16	36.96
血紅素 A1c(%)	5.7 (0.4)	6.1 (0.5)	5.8 (0.5)	5.8 (0.6)
血小板(10 ³ /mm ³) [130-394]	271.4 (40.2)	269.8 (57.2)	263.4 (55.7)	250.5 (49.4)
空腹血糖(mg/dL)	99.1 (10.3)	115.1 (29.3)	109.4 (22.0)	105.9 (22.3)
全肝脂肪(%)	15.6 (7.6)	16.0 (6.6)	17.7 (8.2)	16.1 (6.9)
肝功能測試				
ALT (U/L)	35.0 (23.0)	31.9 (15.7)	36.0 (18.5)	32.8 (16.1)
AST(U/L)	25.9 (9.5)	24.0 (8.1)	26.0 (8.5)	23.5 (7.4)
鹼性磷酸酶 (U/L)	91.9 (37.4)	85.8 (32.3)	82.4 (15.8)	84.0 (18.3)
GGT (U/L)	38.0 (25.0)	32.9 (17.0)	37.2 (17.7)	34.6 (19.3)
脂質&脂蛋白元				
三酸甘油酯(mg/dL)	164.2 (82.1)	214.2 (134.9)	173.3 (90.5)	175.3 (66.8)
總膽固醇	193.4 (57.5)	182.7 (41.4)	193.9 (29.1)	194.5 (36.6)
HDL-膽固醇(mg/dL)	46.3 (8.4)	43.4 (9.7)	47.6 (11.1)	43.1 (8.7)
直接 LDL-膽固醇 (mg/dL)	129.8 (50.6)	112.8 (39.8)	126.9 (24.6)	129.3 (31.7)
脂蛋白元 C3	13.6 (4.5)	15.2 (5.9)	14.2 (5.6)	13.9 (7.0)

對連續變量以平均值(SD)呈現；對性別以計數(%)呈現

以 MRI-PDFP 之原發性全肝脂肪

以 MRI-PDFP 自基線至第 42 天在 WLF 的對數轉換之相對變化係使用共變異數分析 (ANCOVA) 進行分析。模式包括以 MRI-PDFP 的對數轉換之基線 WLF 作為共變量。經模式導出之估計值係自對數尺度反轉換且轉化成百分比變化。圖 25a 顯示治療分組之 WLF 數據的盒鬚圖及表 11 來自 ANCOVA 模式的結果。

表11

治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑的%變化		組合的%變化 相對於各單一療法	
		LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (50%之CI)* (90%之CI)	2-端 P-值
安慰劑	12	8.14 (-8.56, 27.89)				
化合物A 15 mg	22	-40.01 (-47.00, -32.09)	-44.52 (-54.97, -31.65)	<0.0001	-0.21 (-6.82, 6.87) (-15.66, 18.08)	0.9836
化合物D 300 mg	24	-30.14 (-37.97, -21.33)	-35.40 (-47.40, -20.68)	0.0007	-14.30 (-19.86, -8.35) (-27.32, 1.06)	0.1233
化合物A 15 mg + 化合物D 300 mg	26	-40.13 (-46.58, -32.90)	-44.64 (-54.80, -32.19)	<0.0001		

與顯示數值增加的安慰劑比較，所有的治療分組皆在第42天導致自基線降低的WLF。各治療分組符合相對於安慰劑之WLF的預指定之決策準則(亦即 $\geq 95\%$ 之信賴度，治療分組優於安慰劑；且觀察到經安慰劑調整之減少量大於30%之標的值)。此外，以交叉分組比較WLF降低幅度顯示以下證據：化合物A及化合物D之共同投予導致在數值上比以化合物D之單一療法降低更多且可比得上以化合物A之單一療法的降低值[-0.21% (50%之CI -6.82, 6.87)](參見表11)。

圖25b和25c展示相對降低的肝脂肪符合 $\geq 30\%$ 或 $\geq 50\%$ 之肝脂肪降低閾值的參與者比例。

血清三酸甘油酯

自基線之血清三酸甘油酯的對數轉換之相對變化係使用重複測量的混合模式(MMRM)進行分析。模式包括對數轉換之基線TG及基線全肝脂肪作為共變量。經模式導出之估計值係自對數尺度反轉換且轉化成百分比變化。表

12a提供血清三酸甘油酯自基線的百分比變化之統計學分析-FAS。圖26為血清三酸甘油酯自基線的百分比變化-FAS之最小平方平均值及90%之CI的標繪圖。

表12a

研究日	治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑的%變化		組合的%變化相 對於各單一療法	
			LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值
5	安慰劑	13	16.72 (3.18, 32.03)				
	化合物A 15mg	29	27.89 (17.67, 38.99)	9.57 (-5.63, 27.22)	0.3117	-9.53 (-13.87, -4.98)	0.1706
	化合物D 300mg	26	-4.59 (-12.52, 4.05)	-13.26 (-29.69, -4.97)	0.0286	21.26 (15.34, 27.50)	0.0107
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	15.70 (6.05, 26.22)	-0.87 (-14.76, 15.27)	0.9231		
	安慰劑	12	0.42 (-13.37, 16.40)				
14	化合物A 15mg	27	43.67 (30.12, 58.62)	43.06 (19.72, 70.96)	0.0012	-12.58 (-17.47, -7.39)	0.1176
	化合物D 300mg	27	-17.53 (-25.31, -8.93)	-17.87 (-31.25, -1.90)	0.0689	52.29 (43.76, 61.32)	<0.0001
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	25.60 (13.54, 38.93)	25.07 (4.59, 49.56)	0.0405		
	安慰劑	12	14.74 (-3.60, 36.57)				
28	化合物A 15mg	24	59.36 (41.06, 80.03)	38.89 (12.25, 71.85)	0.0121	-25.99 (-30.96, -20.67)	0.0043
	化合物D 300mg	26	-7.35 (-17.72, 4.33)	-19.25 (-34.59, -0.31)	0.0951	27.29 (18.86, 36.31)	0.0193
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	17.93 (4.69, 32.86)	2.79 (-16.77, 26.93)	0.8290		
	安慰劑	12	7.38 (-8.06, 25.41)				
42	化合物A 15mg	22	58.17 (41.76, 76.48)	47.30 (21.77, 78.19)	0.0011	-28.03 (-32.39, -23.40)	0.0006
	化合物D 300mg	24	-1.89 (-11.94, 9.32)	-8.63 (-24.37, 10.38)	0.4290	16.02 (9.05, 23.43)	0.1081
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	13.83 (2.27, 26.69)	6.00 (-12.21, 27.99)	0.6080		
	安慰劑	12	7.38 (-8.06, 25.41)				

表12a顯示在各時間點來自MMRM模式的結果。數據顯示以化合物A之單一療法投予觀察到經ACCi-誘發之三酸甘油酯升高。然而，與研究的推測一致，化合物A/化合物D之共同投予導致三酸甘油酯的升高緩和。在第42天，經安慰劑調整增加的三酸甘油酯在化合物A治療分組為47.30% (21.77%, 78.19%)，但是在化合物A/化合物D組合

分組僅為6.00% (-12.21%，27.99%)。相對於化合物A之單一療法分組，這等同於使組合分組的三酸甘油酯含量在統計學上顯著的降低28.03% (23.40%，32.39%)。組合分組在第5天和第14天的三酸甘油酯升高幅度低於以化合物A之單一療法分組中所見，在第28天和第42天的值類似於安慰劑(參見圖26)。

另外，表12b提供在NAFLD患者中的三酸甘油酯異常的總結。數據係以超過三酸甘油酯閾值的個體之總數(%)呈現。數據集顯示緩和在>400 mg/dl；>600 mg/dl；及>800 mg/dl的經化合物A媒介之三酸甘油酯異常。具體地，數據顯示以化合物A及化合物D之共同投予完全阻斷經化合物A媒介之三酸甘油酯異常(>600 mg/dl；及>800 mg/dl)。

表12b

	安慰劑 (BID)	ACCi (15 mg BID)	DGAT2i (300 mg BID)	ACCi:DGAT2i (15 mg:300 mg BID)
可評估的個體數	14	29	27	26
>400 mg/dl	2 (14.3)	11 (37.9)	2 (7.4)	3 (11.5)
>600 mg/dl	1 (7.1)	4 (13.8)	1 (3.7)	0
>800 mg/dl	0	3 (10.3)	0	0

其他的脂質及脂蛋白元

在第42天，其他空腹血清脂質參數自基線的百分比變化之統計學分析-FAS的總結提供於表13中。

表13

第42天	治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑 的%變化		組合的%變化相 對於各單一療法	
			LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值
總膽固醇	安慰劑	12	1.98 (-4.27, 8.63)				
	化合物A 15mg	22	-2.72 (-7.02, 1.77)	-4.61 (-11.73, 3.09)	0.3153	-5.22 (-10.97, 0.91)	0.1583
	化合物D 300mg	24	-5.87 (-9.93, -1.63)	-7.70 (-14.55, -0.30)	0.0878	-2.05 (-7.92, 4.20)	0.5795
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	-7.80 (-11.71, -3.71)	-9.58 (-16.26, -2.38)	0.0317		
HDL- 膽固醇	安慰劑	12	-3.19 (-9.87, 3.98)				
	化合物A 15mg	22	-15.56 (-19.70, -11.20)	-12.77 (-20.08, -4.80)	0.0110	-3.14 (-9.70, 3.90)	0.4517
	化合物D 300mg	24	-13.43 (-17.62, -9.03)	-10.58 (-18.02, -2.45)	0.0354	-5.52 (-11.91, 1.33)	0.1890
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	-18.21 (-22.13, -14.09)	-15.51 (-22.53, -7.85)	0.0018		
LDL- 膽固醇	安慰劑	12	2.04 (-9.52, 15.09)				
	化合物A 15mg	22	-19.74 (-26.24, -12.67)	-21.35 (-32.09, -8.92)	0.0081	12.81 (0.17, 27.07)	0.0953
	化合物D 300mg	24	-5.22 (-12.81, 3.02)	-7.12 (-19.77, 7.52)	0.4030	-4.46 (-15.08, 7.47)	0.5198
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	-9.45 (-16.68, -1.59)	-11.27 (-23.34, 2.72)	0.1775		
非-HDL 膽固醇	安慰劑	12	2.17 (-5.74, 10.74)				
	化合物A 15mg	22	1.86 (-3.82, 7.87)	-0.30 (-9.68, 10.06)	0.9600	-5.94 (-13.15, 1.86)	0.2046
	化合物D 300mg	24	-3.51 (-8.78, 2.05)	-5.56 (-14.40, 4.19)	0.3355	-0.70 (-8.22, 7.43)	0.8819
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	-4.19 (-9.34, 1.25)	-6.22 (-14.96, 3.41)	0.2775		

三個治療分組(化合物A單一療法、化合物D單一療法及化合物A/化合物D共同投予)關於第42天對關鍵脂質參數(總膽固醇、HDL-膽固醇、LDL-膽固醇、非-HDL-膽固醇)的影響顯示於以上表13中，比較各分組與安慰劑及化合物A/化合物D之共同投予分組與各單一療法分組。對於總膽固醇，所有治療分組趨向比安慰劑低，以化合物A/化合物D之共同投予分組所見之統計學上顯著的降低[-9.58% (-16.26, -2.38)]。當比較各單一療法分組與組合分組時，未觀察到統計學上顯著的差異。當與安慰劑比較時，HDL-膽固醇在所有的治療分組中具有類似幅度的降低。

化合物 A/化合物 D 之共同投予未使 HDL-膽固醇顯著地降得比各單一療法更低。在化合物 A 之單一療法分組中的 LDL-膽固醇在統計學上顯著地降低，以化合物 D 單一療法及化合物 A/化合物 D 之共同投予分組具有在統計學上不顯著的數值下降趨勢。非-HDL 膽固醇在任何治療分組中與安慰劑沒有顯著的差異。

測量三個治療分組(化合物 A、化合物 D 及化合物 A/化合物 D 共同投予)對治療 ApoA1、ApoB 及 ApoC3 的影響。將第 42 天的脂蛋白元 C3 (ApoC3) 自基線的百分比變化之統計學分析-FAS 的結果顯示於表 14 中，比較各分組與安慰劑及化合物 A/化合物 D 之共同投予分組與各單一療法分組。給出在第 42 天自安慰劑的 LS 平均值 (及 90% 之 CI) 百分比變化。

表14

第42天	治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑 的%變化		組合的%變化相 對於各單一療法	
			LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值
ApoC3	安慰劑	12	1.82 (-9.64, 14.72)				
	化合物A 15mg	21	45.31 (32.75, 59.05)	42.71 (22.86, 65.77)	0.0002	-24.66 (-33.31, -14.88)	0.0002
	化合物D 300mg	23	-6.52 (-14.25, 1.90)	-8.19 (-20.75, 6.36)	0.3365	17.11 (3.96, 31.93)	0.0302
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	9.48 (0.91, 18.77)	7.52 (-6.96, 24.26)	0.4064		

ApoC3 在化合物 A 之單一療法分組中以統計學上顯著的方式增加 [42.71% (22.86, 65.77)]。驚訝的是，以化合物 D 之單一療法分組的 ApoC3 未增加 [-8.19% (-20.75, 6.36)]，其在此仍維持類似於安慰劑。亦驚訝的是，在化合物 A/化合物 D 之共同投予分組中，ApoC3 含量亦類似於

安慰劑 [7.52% (-6.96, 24.26)]；因此，經化合物 A 誘發之 ApoC3 升高係以與化合物 D 之共同投予緩和。

關注之其他終點-肝功能測試

關注之其他終點的總結提供於表 15 中。給出在第 42 天自安慰劑的 LS 平均值 (及 90% 之 CI) 百分比變化。表 15 提供在第 42 天的肝功能測試自基線的百分比變化之統計學分析 -FAS。圖 27a 至 27d 提供肝功能測試自基線的百分比變化之最小平方平均值及 90% 之 CI-FAS 的標繪圖。圖 27a 提供丙胺酸轉胺酶 (ALT) 的標繪圖；圖 27b 提供天門冬胺酸轉胺酶 (AST) 的標繪圖；圖 27c 提供鹼性磷酸酶的標繪圖；及圖 27d 提供 γ 麩胺醯基轉移酶 (GGT) 的標繪圖。

表15

第42天	治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑 的%變化		組合的%變化相 對於各單一療法	
			LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值
ALT	安慰劑	12	-3.01 (-11.76, 6.61)				
	化合物A 15mg	22	-12.41 (-18.24, -6.18)	-9.70 (-19.67, 1.51)	0.1508	5.15 (-4.42, 15.67)	0.3842
	化合物D 300mg	24	-4.15 (-10.30, 2.42)	-1.18 (-11.95, 10.91)	0.8647	-3.92 (-12.51, 5.53)	0.4803
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	24	-7.91 (-13.80, -1.61)	-5.05 (-15.40, 6.57)	0.4575		
AST	安慰劑	12	5.13 (-4.44, 15.65)				
	化合物A 15mg	22	-0.03 (-6.73, 7.15)	-4.91 (-15.50, 7.01)	0.4798	-3.84 (-12.77, 6.01)	0.5062
	化合物D 300mg	22	2.21 (-4.67, 9.59)	-2.77 (-13.59, 9.40)	0.6923	-5.95 (-14.73, 3.74)	0.3011
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	23	-3.87 (-10.25, 2.96)	-8.56 (-18.72, 2.88)	0.2100		
鹼性 磷酸酶	安慰劑	12	2.93 (-1.78, 7.87)				
	化合物A 15mg	22	11.20 (7.59, 14.92)	8.03 (2.01, 14.40)	0.0276	-10.74 (-14.75, -6.53)	0.0001
	化合物D 300mg	24	-7.51 (-10.46, -4.46)	-10.15 (-15.12, -4.88)	0.0025	7.32 (2.53, 12.33)	0.0118
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	-0.74 (-3.88, 2.50)	-3.57 (-8.90, 2.07)	0.2903		
GGT	安慰劑	12	0.01 (-9.77, 10.85)				
	化合物A 15mg	22	22.63 (14.06, 31.84)	22.62 (8.12, 39.07)	0.0085	-10.16 (-18.77, -0.63)	0.0808
	化合物D 300mg	24	-6.31 (-12.70, 0.54)	-6.32 (-17.31, 6.13)	0.3867	17.60 (6.45, 29.91)	0.0082
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	26	10.17 (2.71, 18.18)	10.17 (-2.73, 24.78)	0.1995		

當與安慰劑比較時，在所有的治療分組中於整個前四週觀察到短暫增加的ALT和AST。在第42天兩者皆低於基線值。關於鹼性磷酸酶，注意到安慰劑分組中適度的增加，在化合物A之單一療法分組中明顯且統計學上顯著的升高。驚訝的是，注意到化合物D之治療分組中明顯且統計學上顯著降低的鹼性磷酸酶。在化合物A/化合物D之共同投予分組中，鹼性磷酸酶值係在基線值附近波動，在整個研究期間沒有統計學上顯著的變化。GGT顯示在安慰劑或化合物D之單一療法分組中沒有顯著的自基線變化，而驚訝的是，在化合物A之單一療法分組及化合物A/化合物

D之共同投予分組中觀察到增加。在共同投予分組中觀察到GGT的增加顯著地低於在第42天僅化合物A之單一療法分組。

安全性和耐受性

表16顯示個體在安全性分析集中的不良事件(所有的因果性)數目。具體地，表16顯示治療緊急的不良事件(AE)(所有的因果性)-安全性分析集。

表16

	安慰劑	化合物A 15 mg	化合物D 300 mg	化合物A 15 mg + 化合物D 300 mg
個體數目(%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
可評估不良事件的個體	14	29	28	28
不良事件的數目	7	17	22	15
具有不良事件的個體	3 (21.4)	10 (34.5)	10 (35.7)	10 (35.7)
具有過多不良事件的個體	0	0	0	1 (3.6)
具有嚴重不良事件的個體	0	1 (3.4)	0	0
由於不良事件而中斷研究的個體(a)	0	1 (3.4)	1 (3.6)	0
由於AE而中斷研究藥物且繼續研究的個體(b)	0	0	1 (3.6)	0
由於不良事件而具有減少或暫時中斷劑量的個體	0	1 (3.4)	0	0

(a)具有AE記錄的個體表示AE造成個體中斷研究

(b)具有AE記錄的個體表示研究治療所採取的動作為停用藥物，但是AE不造成個體中斷研究

在化合物A/化合物D之共同投予分組與兩種單一療法治療分組之間具有類似的AE發病率。在化合物A/化合物D之共同投予分組中報告一件「下頷膿瘍」之SAE(認為與治療無關)。兩位個體係由於AE而中斷研究。在化合物A之單一療法分組中的一位個體係由於TG升高的嚴重AE而中斷(認為與治療有關)；個體維持無症狀。在化合物D之單一療法分組中的另一位個體係由於肌胺酸激酶及AST升高的輕度AE而中斷研究藥物(認為與治療無關)。除了上述

注意到的TG、CK及AST升高以外，未提到主要的實驗室異常。總體而言，所有的治療皆為安全的且耐受良好。

其他關注之安全性終點

表17提供在第42天的血小板自基線的百分比變化之統計學分析-FAS。

表17

第42天	治療	N	自基線的 %變化	自安慰劑 的%變化		組合的%變化相 對於各單一療法	
			LS平均值 (90%之CI)	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值	LS平均值 (90%之CI)	2-端 P-值
血小板	安慰劑	12	-2.40 (-8.76, 4.40)				
	化合物A 15mg	22	-9.35 (-13.66, -4.82)	-7.12 (-14.51, 0.91)	0.1423	9.00 (1.87, 16.62)	0.0371
	化合物D 300mg	24	4.92 (0.10, 9.97)	7.50 (-0.99, 16.71)	0.1473	-5.83 (-11.86, 0.62)	0.1351
	化合物A 15mg + 化合物D 300mg	25	-1.2 (-5.70, 3.52)	1.23 (-6.75, 9.91)	0.8044		

當與安慰劑比較時，在化合物A之單一療法治療分組中觀察到血小板數值隨時間減少的趨勢。注意到化合物D之單一療法分組中的血小板未減少。相對於安慰劑，驚訝的發現以化合物A/化合物D之共同投予分組亦觀察到血小板未減少。

在整個本申請案中參考各種公開案。將該等公開案的揭示內容特此以引用彼等全文併入本申請案，適用於所有目的。

那些發明所屬技術領域中具有通常知識者將顯而易知可在不背離本發明之範疇或精神下進行本發明之各種修飾及變化。自探討本文所揭示的本發明之說明書及實施而使那些熟習本技術者顯而易知本發明之其他實施態樣。意欲

將說明書及實施例僅視為例示性而已，本發明之真正範疇及精神係由以下的申請專利範圍表明。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療選自下列的疾病或病症之方法：脂肪肝、非酒精性脂肪肝疾病、非酒精性脂肪肝炎、伴有肝纖維化之非酒精性脂肪肝炎、伴有硬化之非酒精性脂肪肝炎、及伴有硬化與伴有肝細胞癌或伴有代謝相關疾病之非酒精性脂肪肝炎，該方法包含以下步驟：

對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約5mg至約1200 mg之(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約5 mg至約60 mg之4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項2】一種治療選自下列的疾病或病症之方法：脂肪肝、酒精性脂肪肝疾病、酒精性脂肪肝炎、伴有肝纖維化之酒精性脂肪肝炎、伴有硬化之酒精性脂肪肝炎、及伴有硬化與伴有肝細胞癌或伴有代謝相關疾病之酒精性脂肪肝炎，該方法包含以下步驟：

對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約5 mg至約1200 mg之(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約5 mg至約60 mg之4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項3】一種治療選自下列的心血管疾病或病症

之方法：動脈粥樣硬化症、中風、心肌梗塞、主動脈血管疾病、腦血管疾病、腎血管疾病、心衰竭、心房震顫或冠狀動脈心臟病，該方法包含以下步驟：

對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約 5 mg 至約 1200 mg 之 (*S*)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-*N*-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 60 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項 4】 一種治療選自下列的代謝疾病或病症之方法：肥胖症、異常血脂症、第 2 型糖尿病、患有第 2 型糖尿病的患者之血糖控制、葡萄糖耐受不良 (IGT) 病症、空腹血漿葡萄糖不良病症、代謝症候群、症候群 X、高血糖症、高胰島素血症、胰島素抗性或葡萄糖代謝不良，該方法包含以下步驟：

對有其需要的人類投予治療有效量的組成物，該組成物包含約 5 mg 至約 1200 mg 之 (*S*)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-*N*-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽及約 5 mg 至約 60 mg 之 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項 5】 如前述請求項中任一項之方法，其中 (*S*)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-*N*-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽對 4-(4-(1-異丙

基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之比為約1:1、約5:1、約10:1、約15:1、約20:1或約30:1。

【請求項6】如前述請求項中任一項之方法，其中(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之該治療有效量為約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約25 mg、約50 mg、約75 mg、約100 mg、約150 mg、約200 mg、約225 mg、約300 mg、約400 mg、約450 mg、約600 mg或約1200 mg；及該4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之該治療有效量為約5 mg、約10 mg、約15 mg、約20 mg、約40 mg、約50 mg或約60 mg。

【請求項7】如請求項6之方法，其中(S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺或其醫藥上可接受的鹽之該治療有效量為約300 mg。

【請求項8】如請求項7之方法，其中該4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之該治療有效量為約10 mg。

【請求項9】如請求項7之方法，其中該4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之該治療有

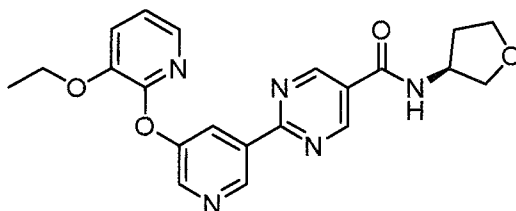
效量為約 15 mg。

【請求項 10】如請求項 7 之方法，其中該 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸或其醫藥上可接受的鹽之該治療有效量為約 20 mg。

【請求項 11】如前述請求項中任一項之方法，其中該組成物係一天投予一次。

【請求項 12】如前述請求項中任一項之方法，其中該組成物係一天投予兩次。

【請求項 13】如前述請求項中任一項之方法，其中該 (S)-2-(5-((3-乙氧基吡啶-2-基)氧基)吡啶-3-基)-N-(四氫呋喃-3-基)嘧啶-5-甲醯胺為以下結構之結晶固體：



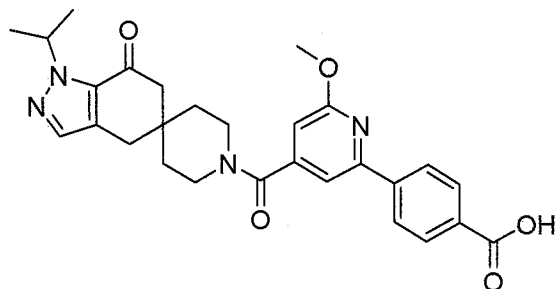
或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項 14】如請求項 13 之方法，其中該結晶固體具有包含 (CuK α 輻射，1.54056 Å 之波長) 5.3 \pm 0.2、7.7 \pm 0.2 和 15.4 \pm 0.2 之 2- θ 值的粉末 x-射線繞射圖案。

【請求項 15】如請求項 13 之方法，其中該結晶固體具有包含 (CuK α 輻射，1.54056 Å 之波長) 6.5 \pm 0.2、9.3 \pm 0.2 和 13.6 \pm 0.2 之 2- θ 值的粉末 x-射線繞射圖案。

【請求項 16】如前述請求項中任一項之方法，其中該 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-哌啶]-

1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸為以下結構之結晶固體：

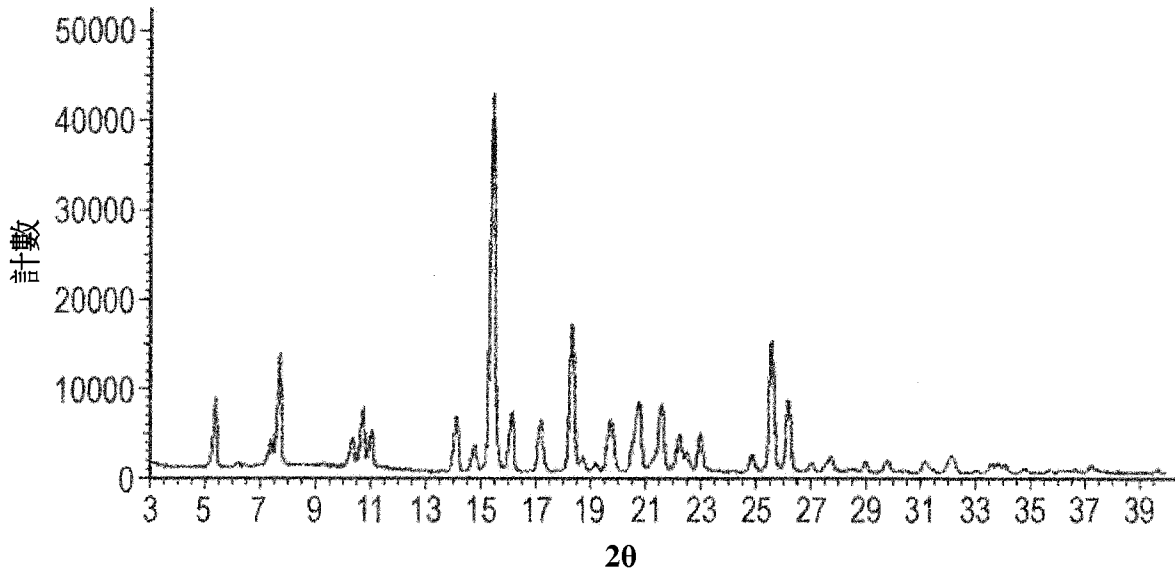


或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項 17】如請求項 16 之方法，其中該結晶固體為 4-(4-(1-異丙基-7-側氧基-1,4,6,7-四氫螺[吡啶-5,4'-吡啶]-1'-羰基)-6-甲氧基吡啶-2-基)苯甲酸之 2-胺基-2-(羥基甲基)丙烷-1,3-二醇鹽。

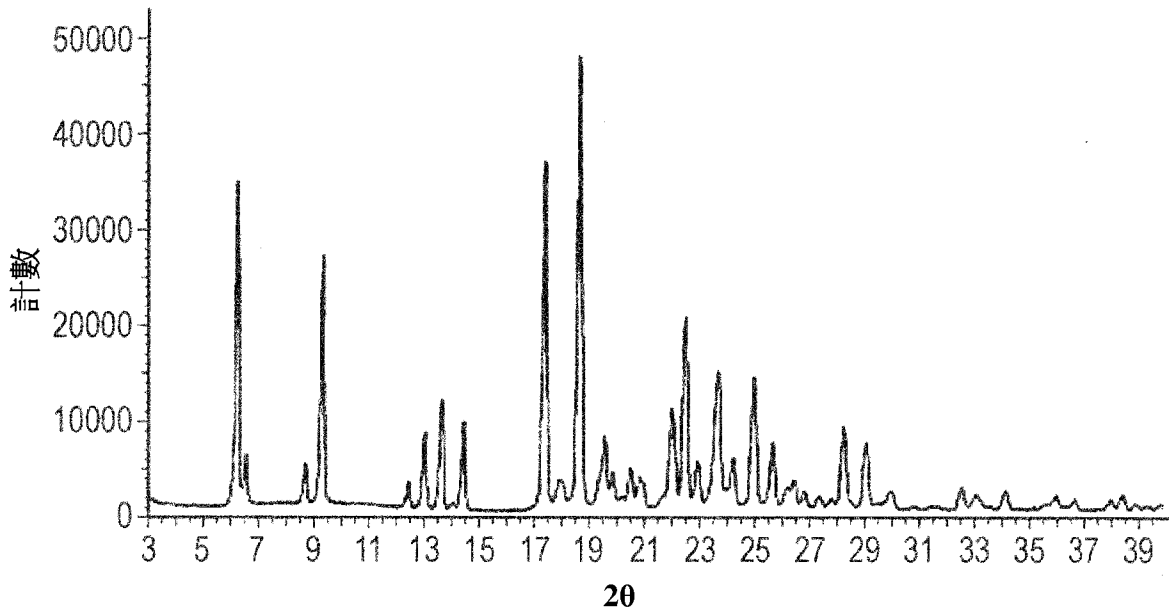
【發明圖式】

實施例1之形式1結晶材料的PXRD圖案

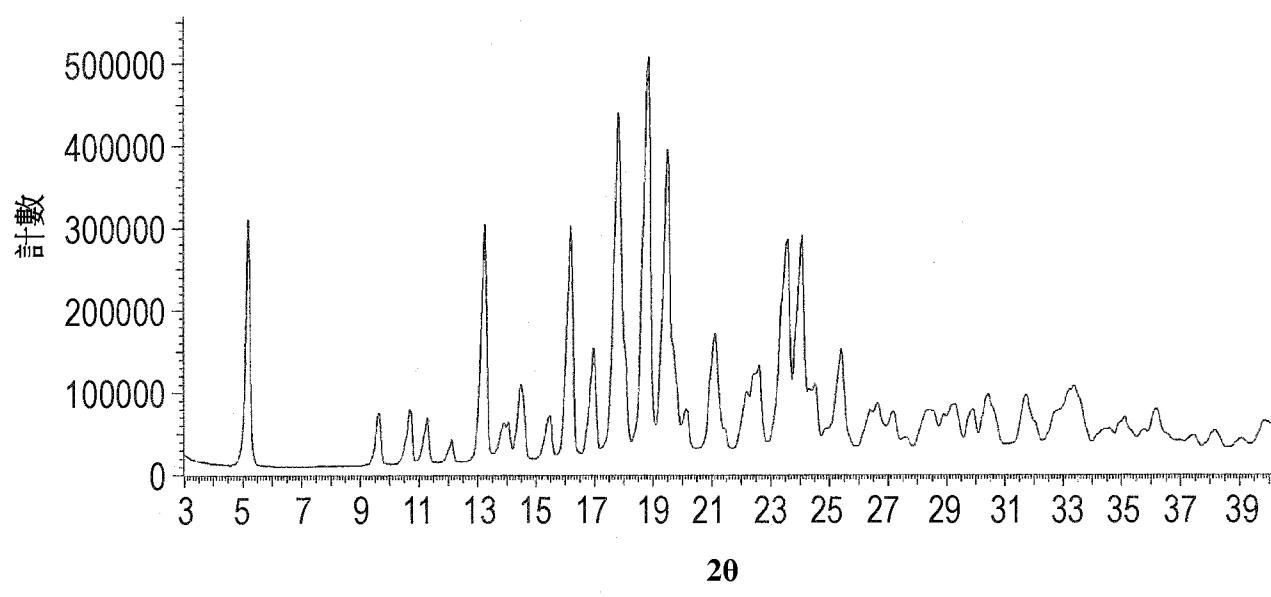


【圖 1】

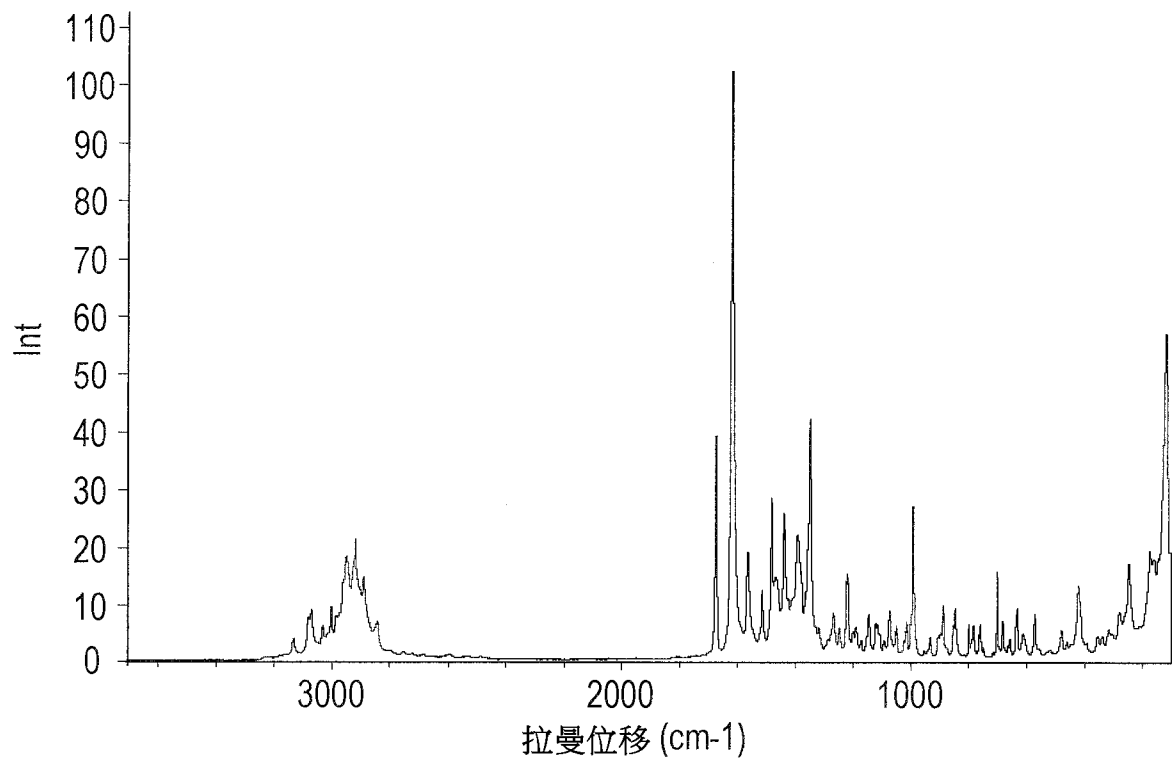
實施例1之形式2結晶材料的PXRD圖案



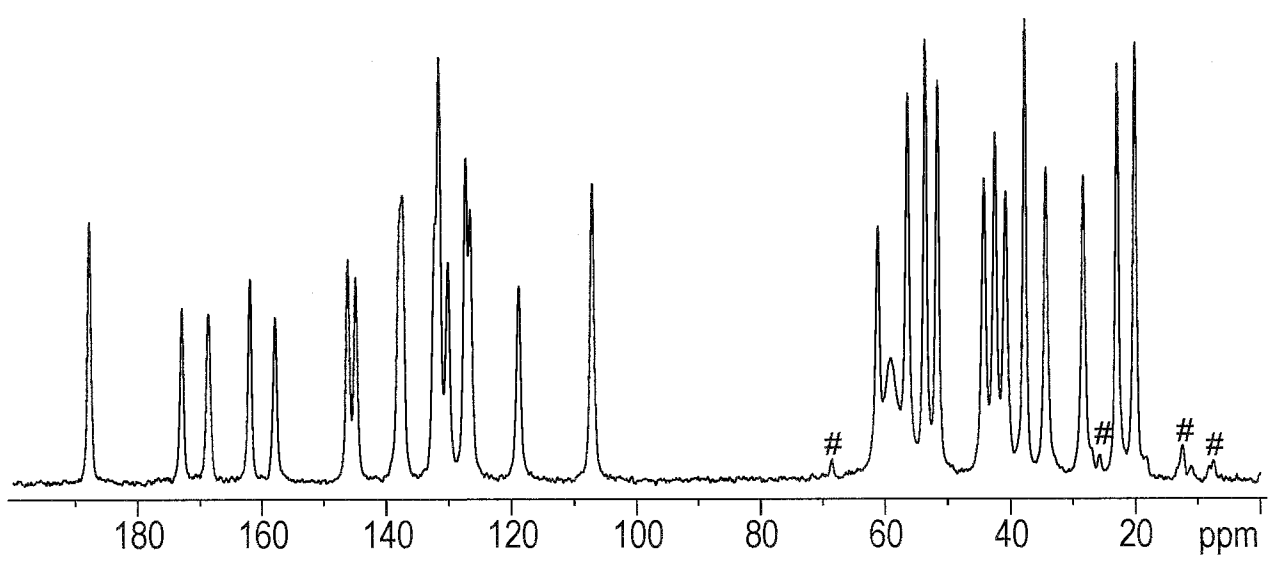
【圖 2】



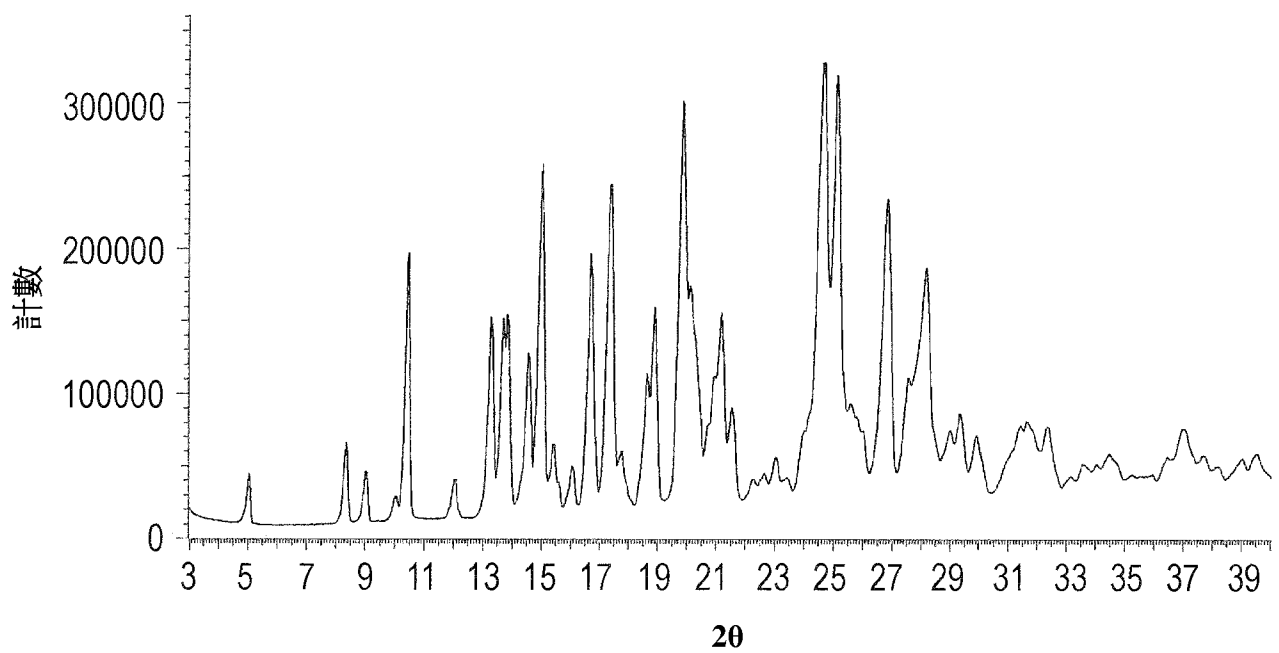
【圖 3】



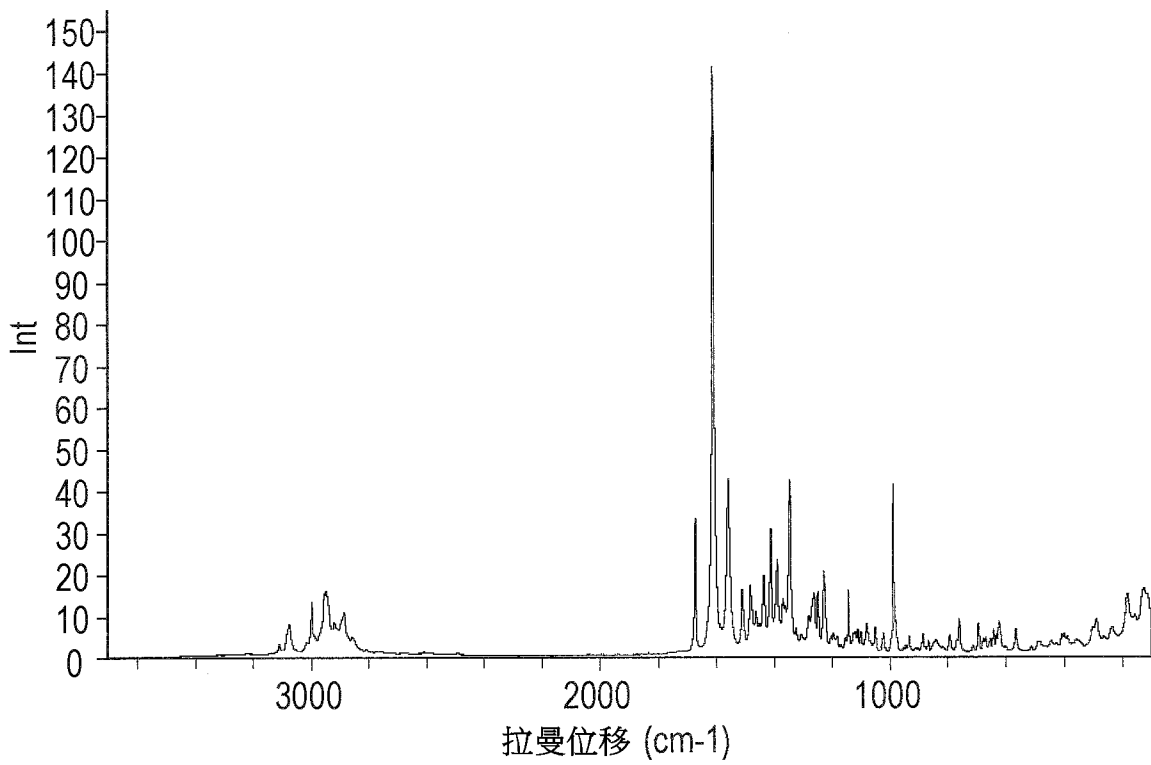
【圖 4】



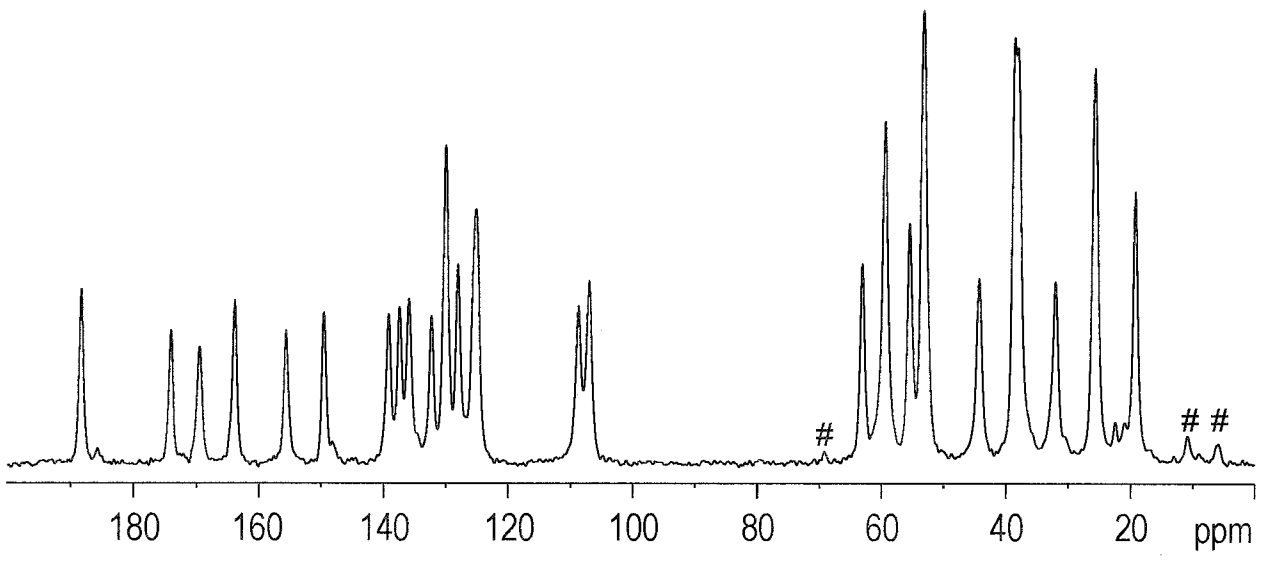
【圖 5】



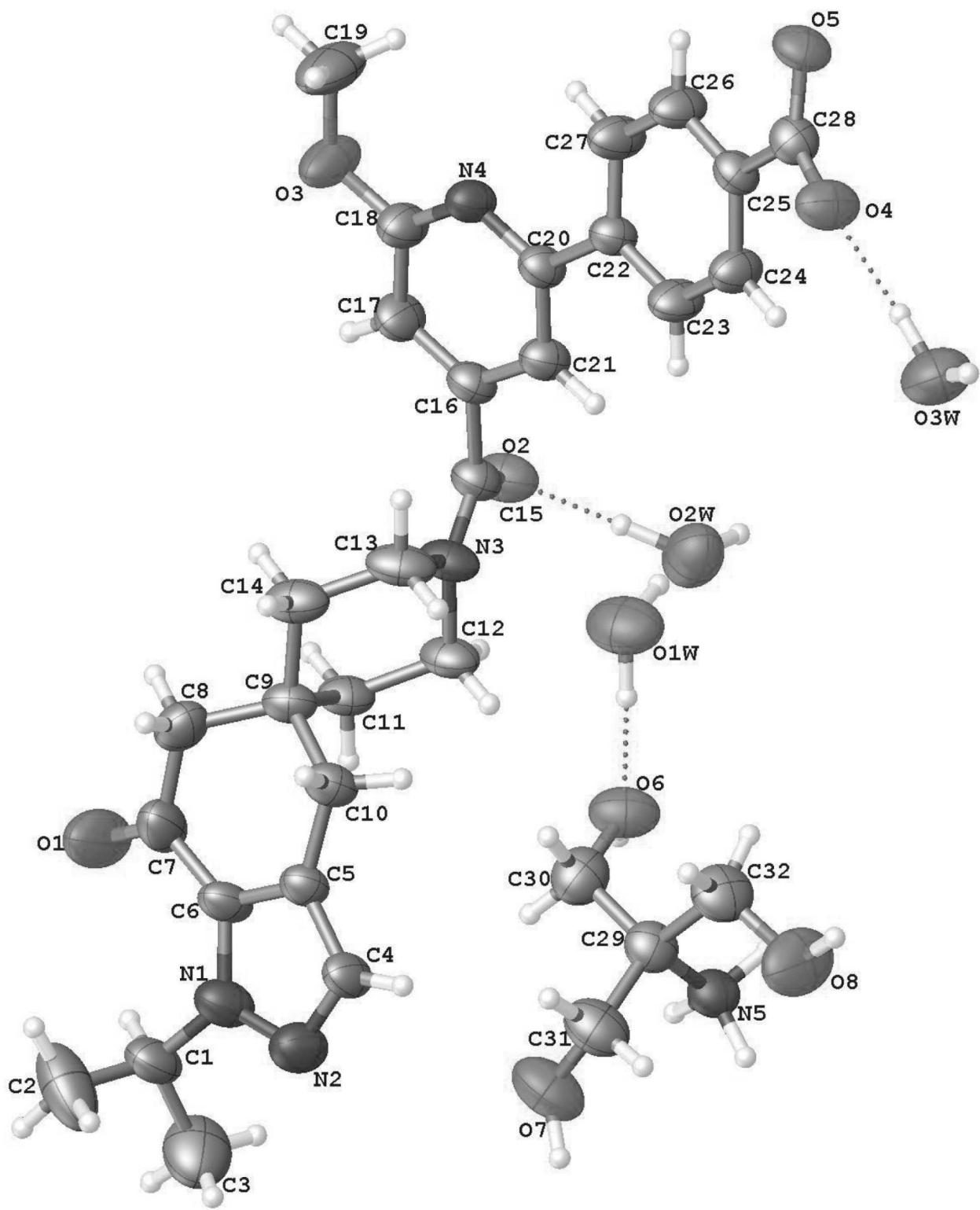
【圖 6】



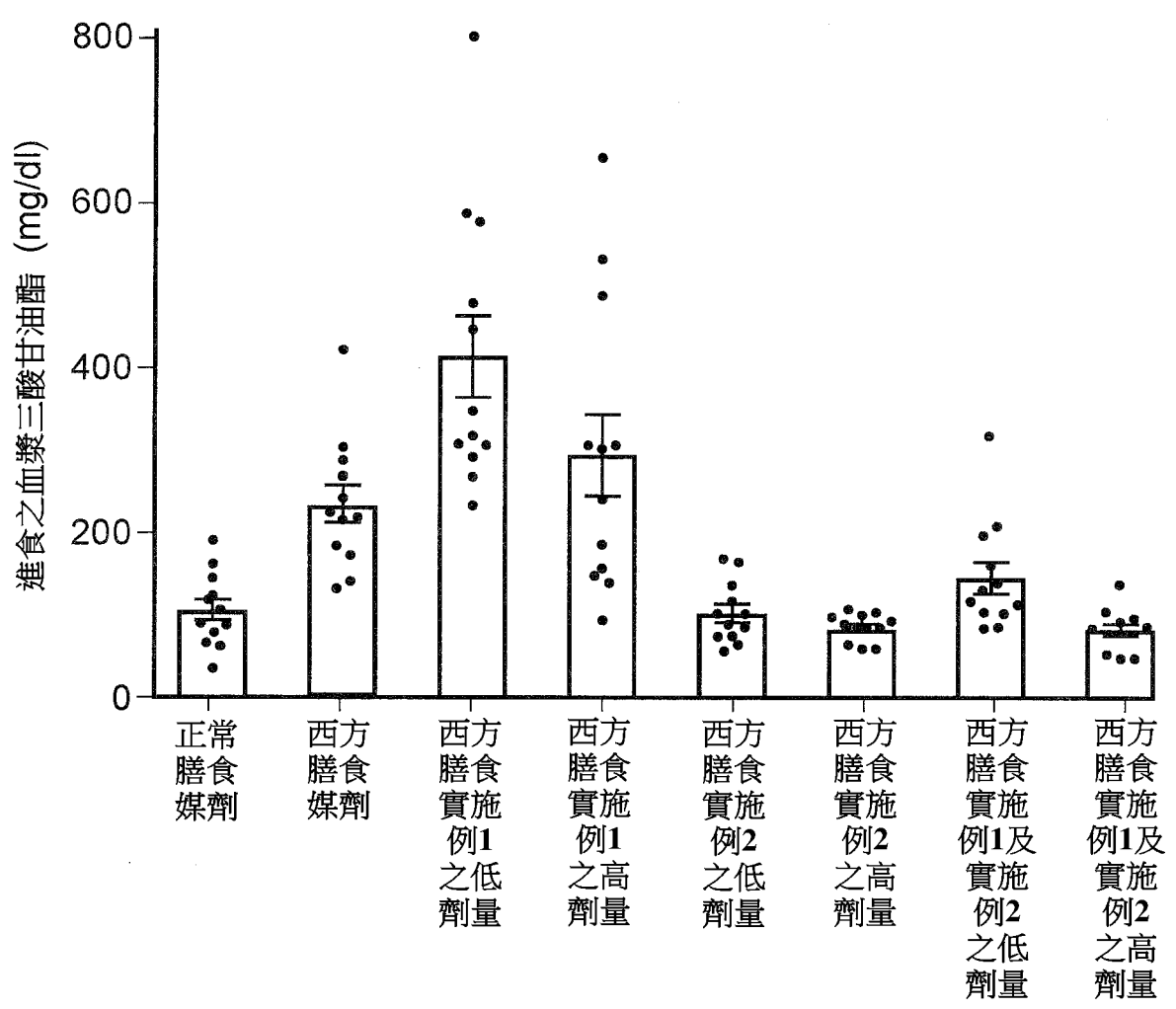
【圖 7】



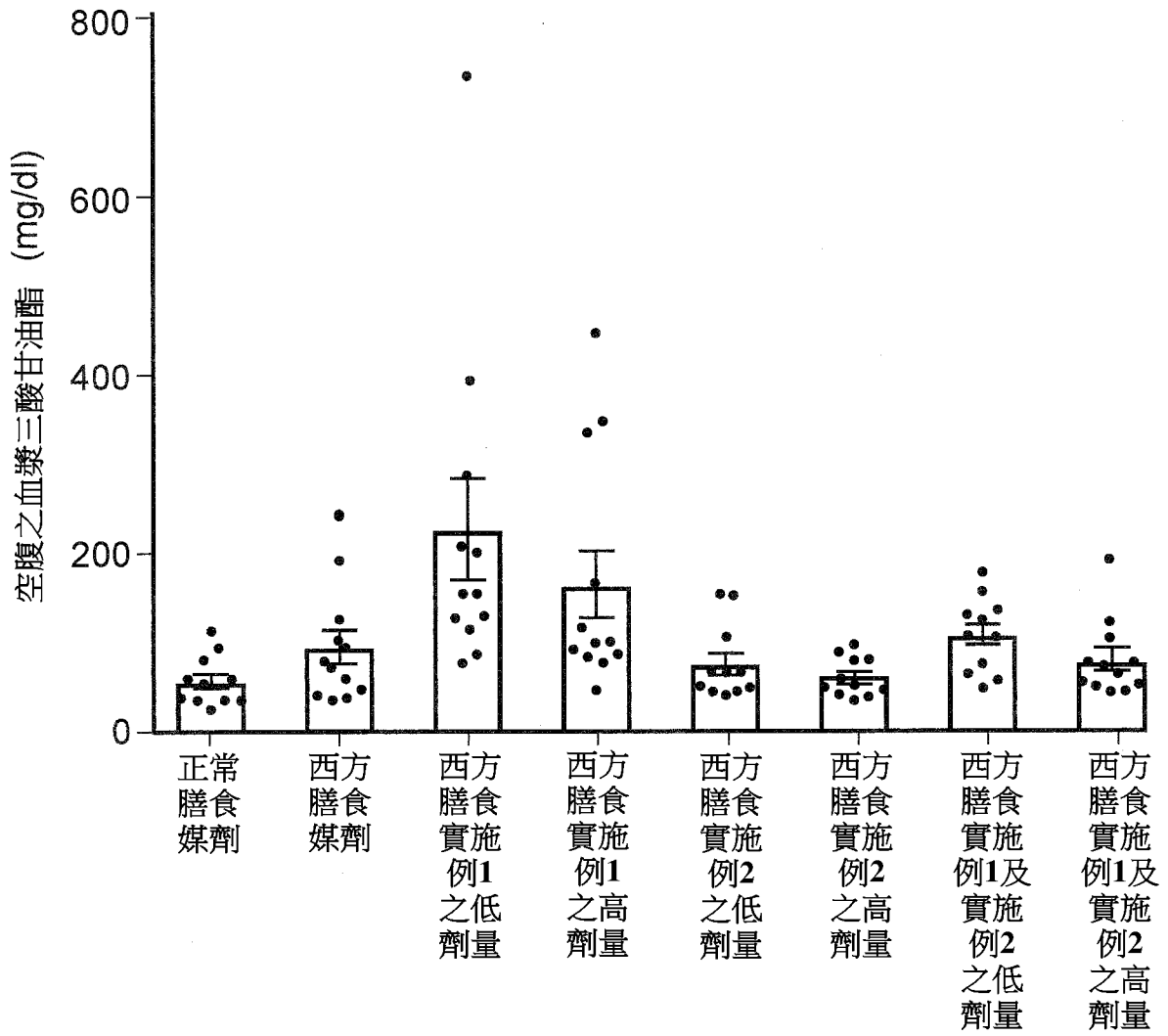
【圖 8】



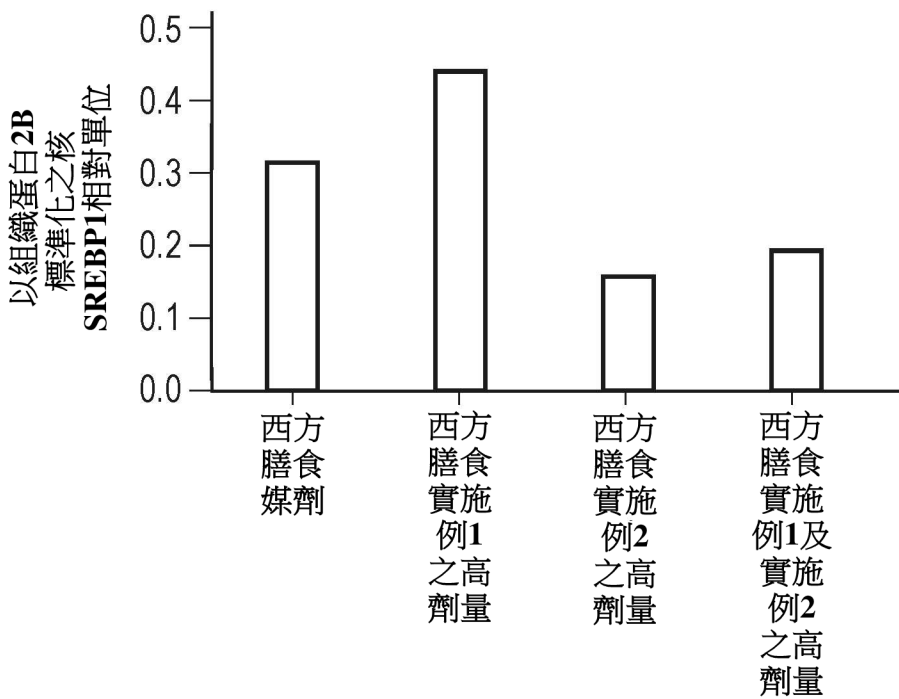
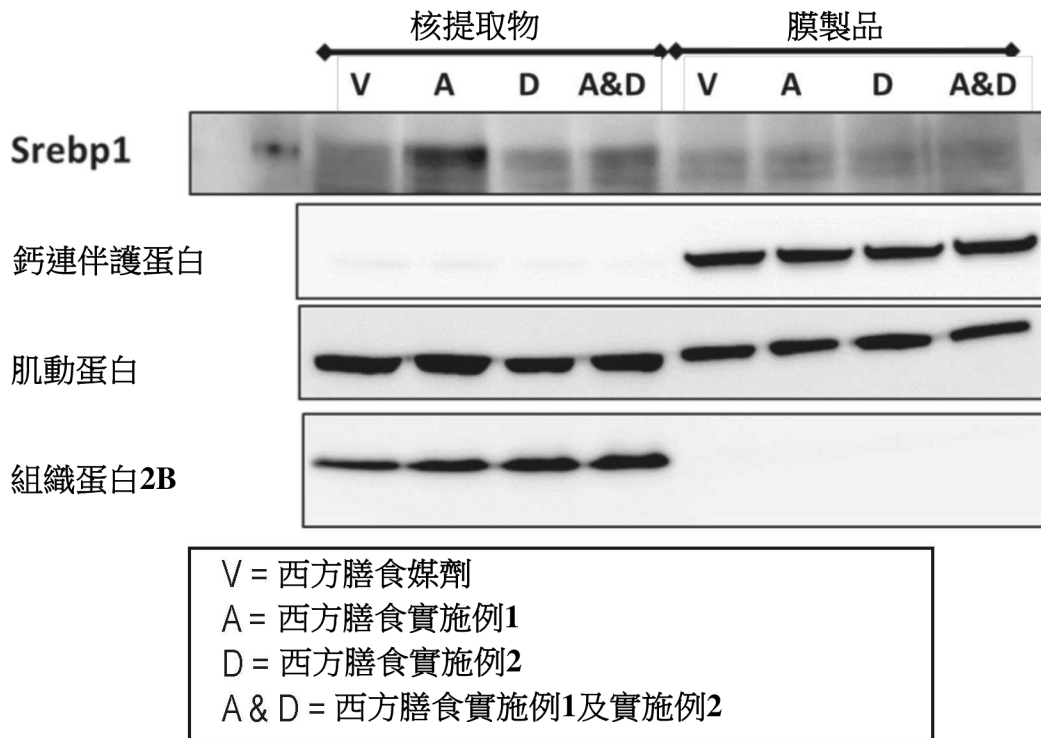
【圖 9】



【圖 10】



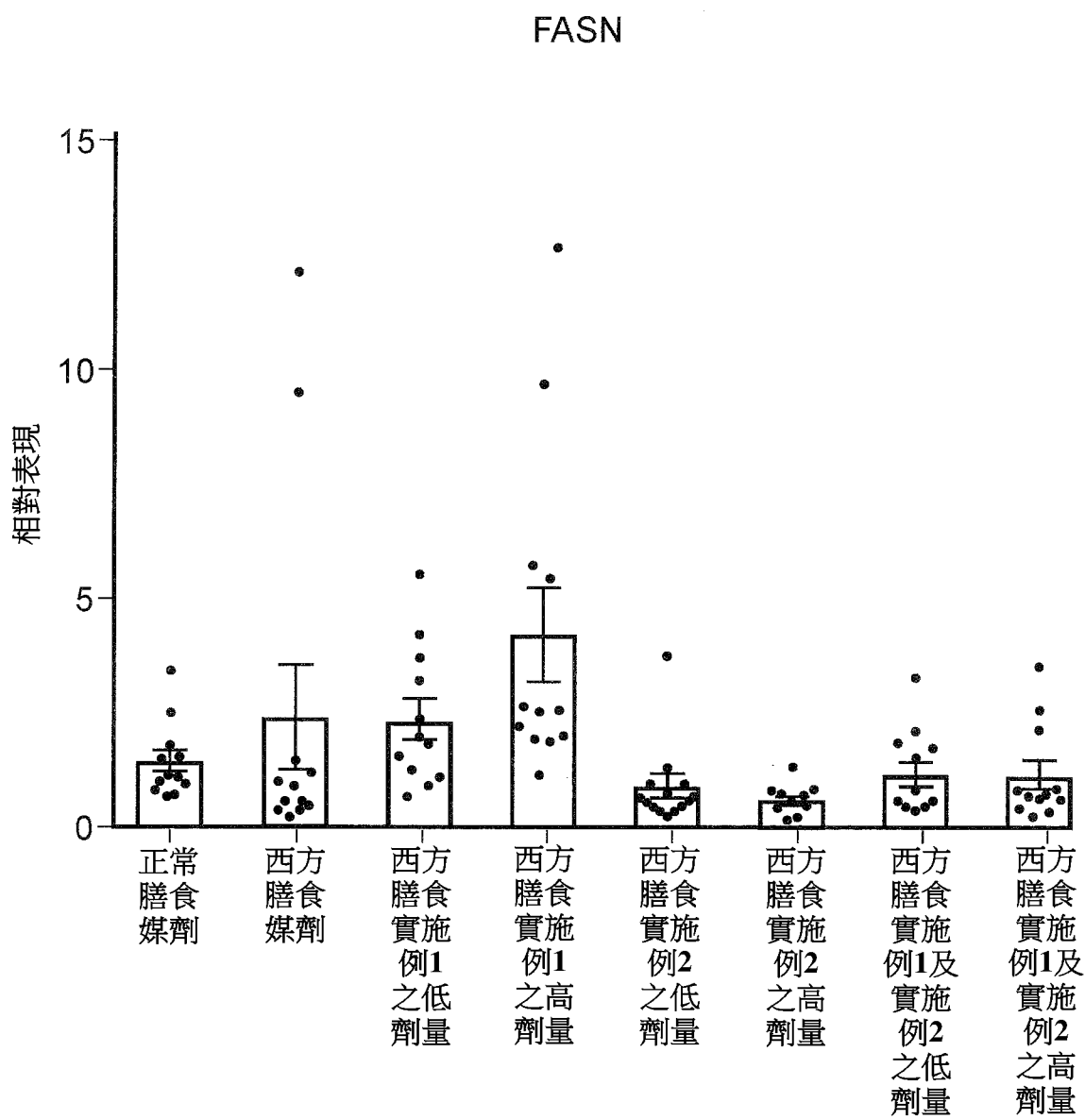
【圖 11】



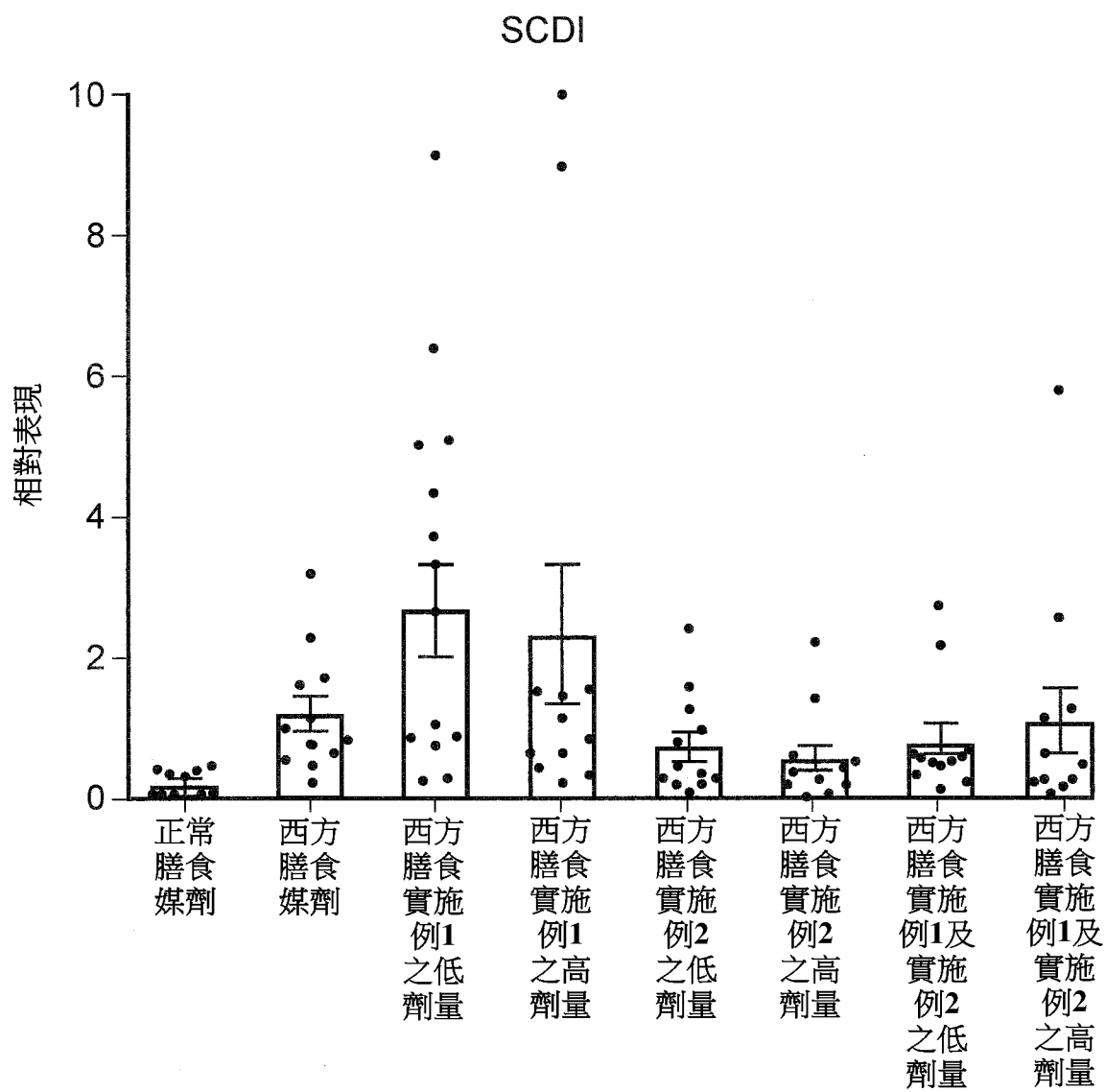
【圖 12】



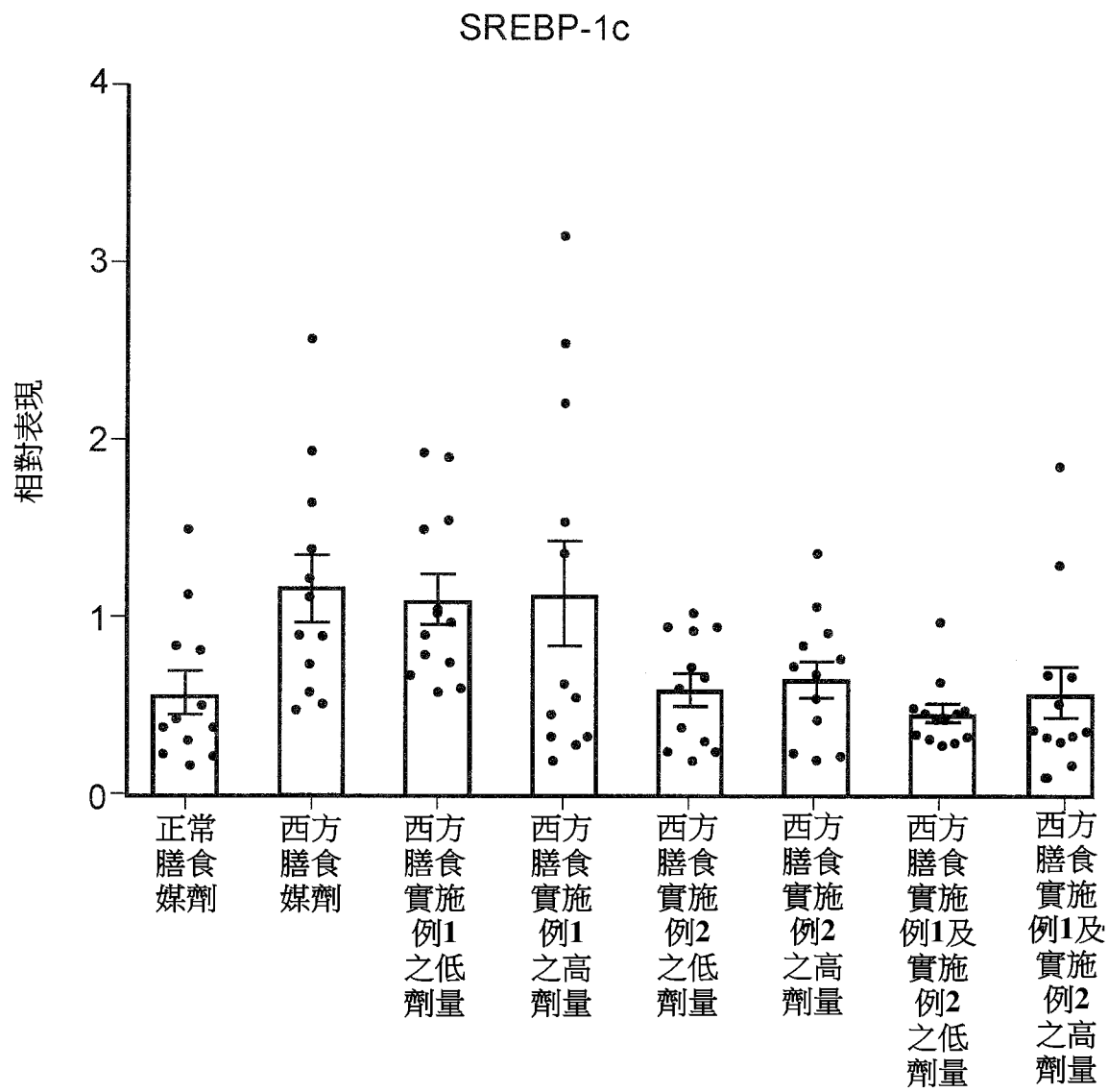
【圖 13】



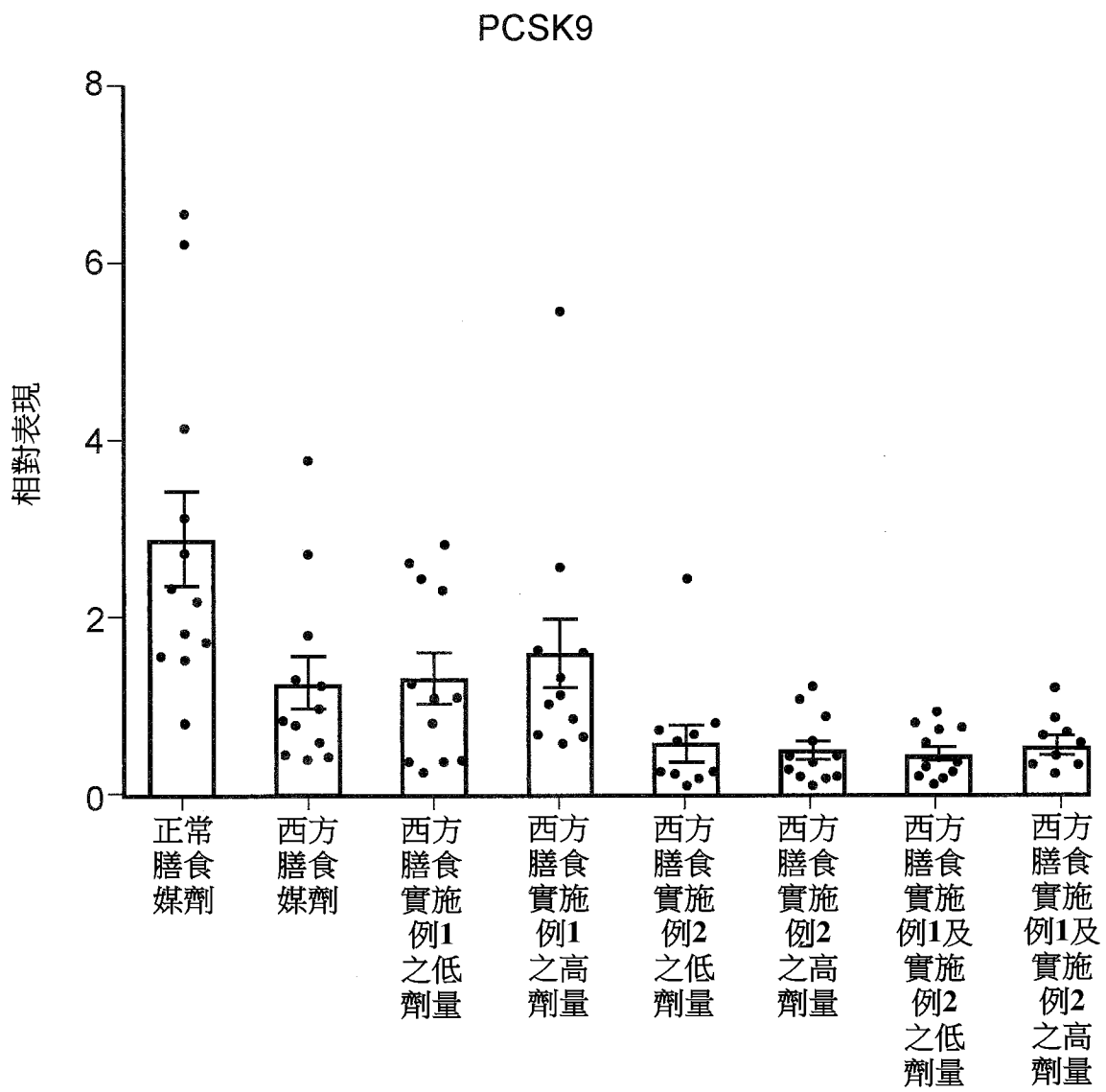
【圖 14】



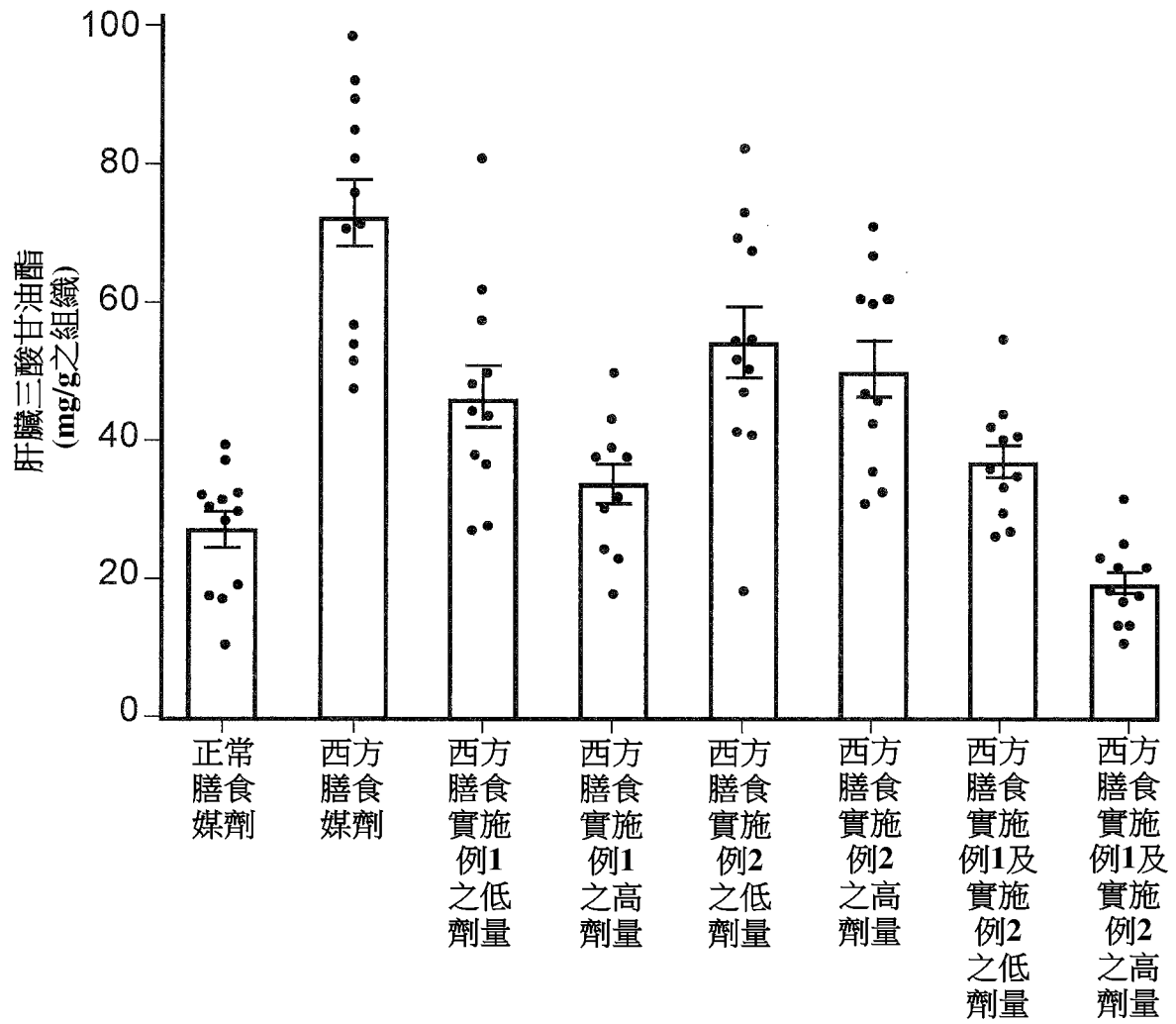
【圖 15】



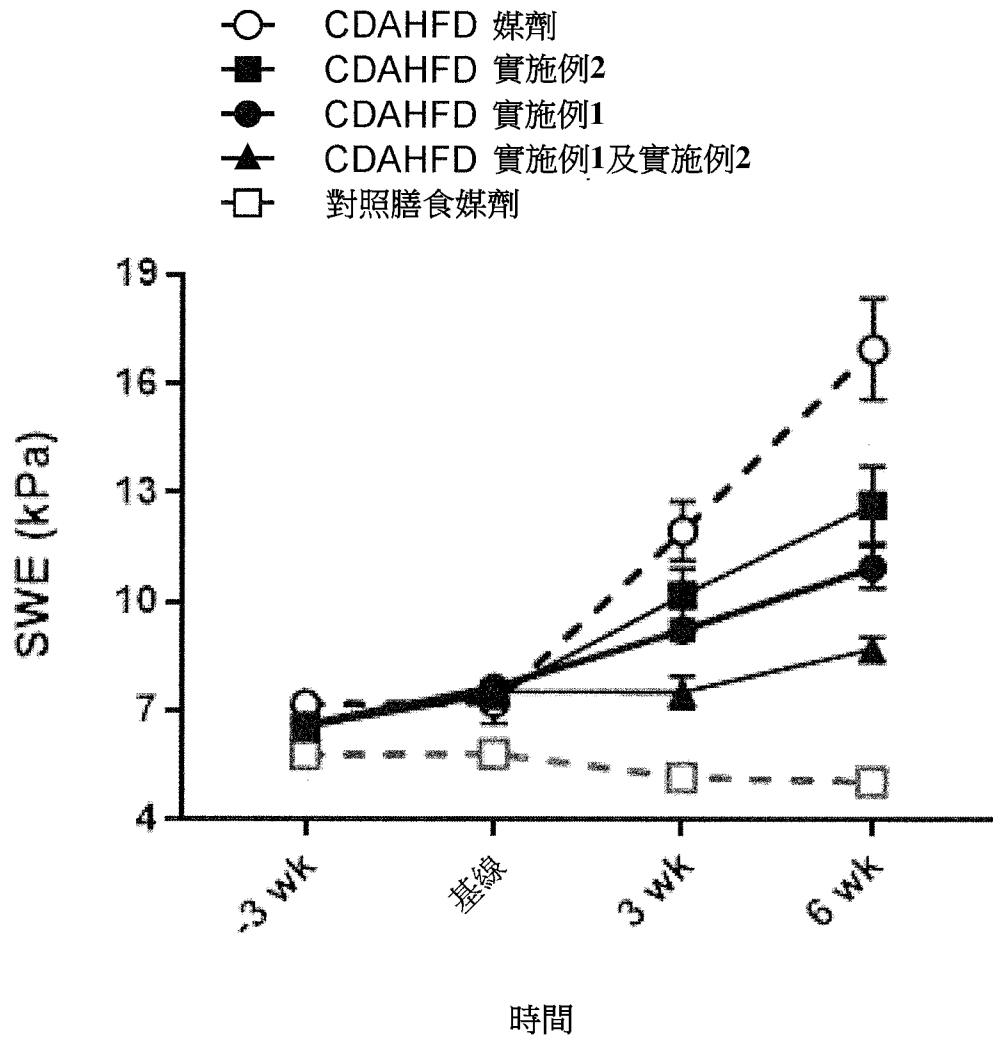
【圖 16】



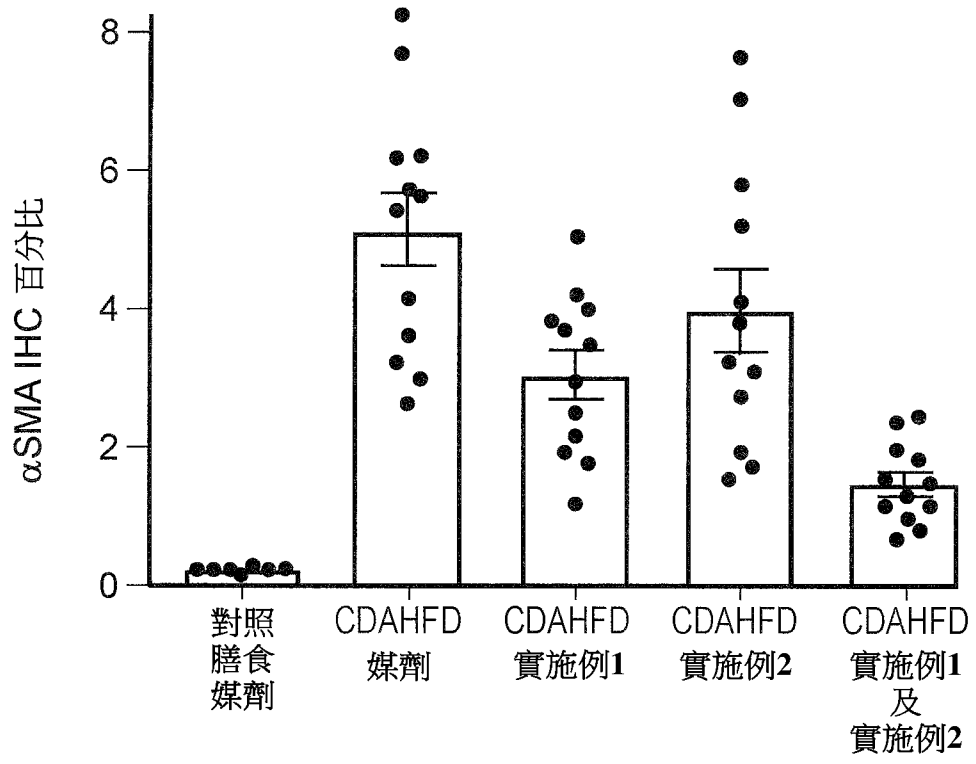
【圖 17】



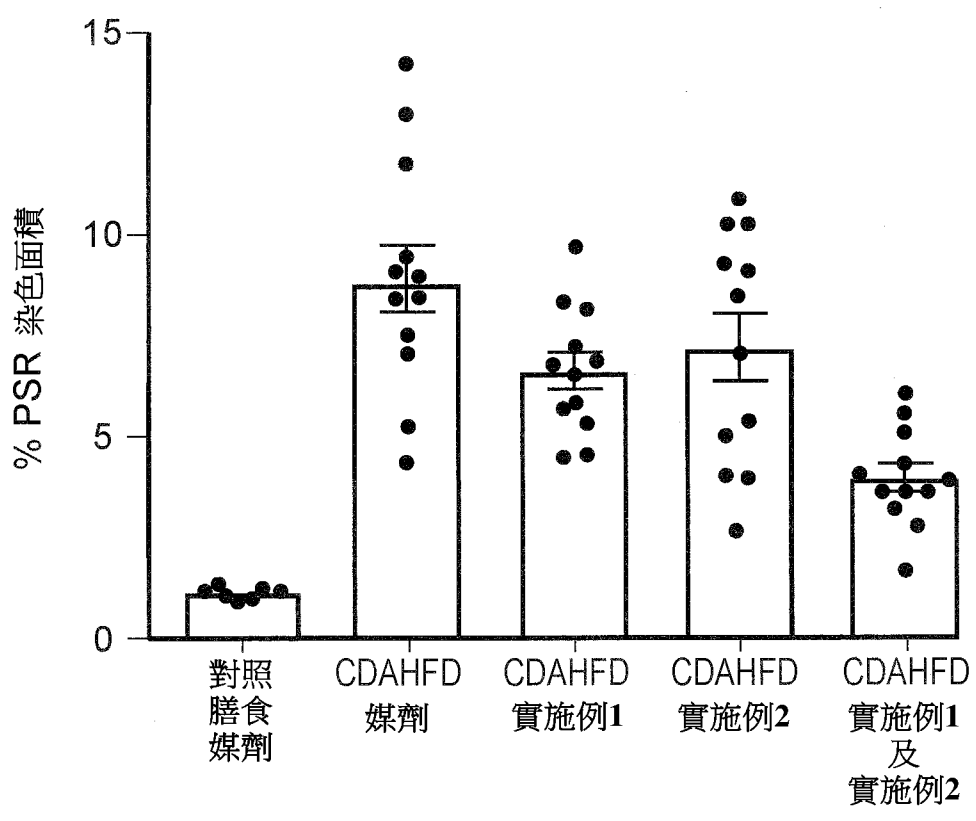
【圖 18】



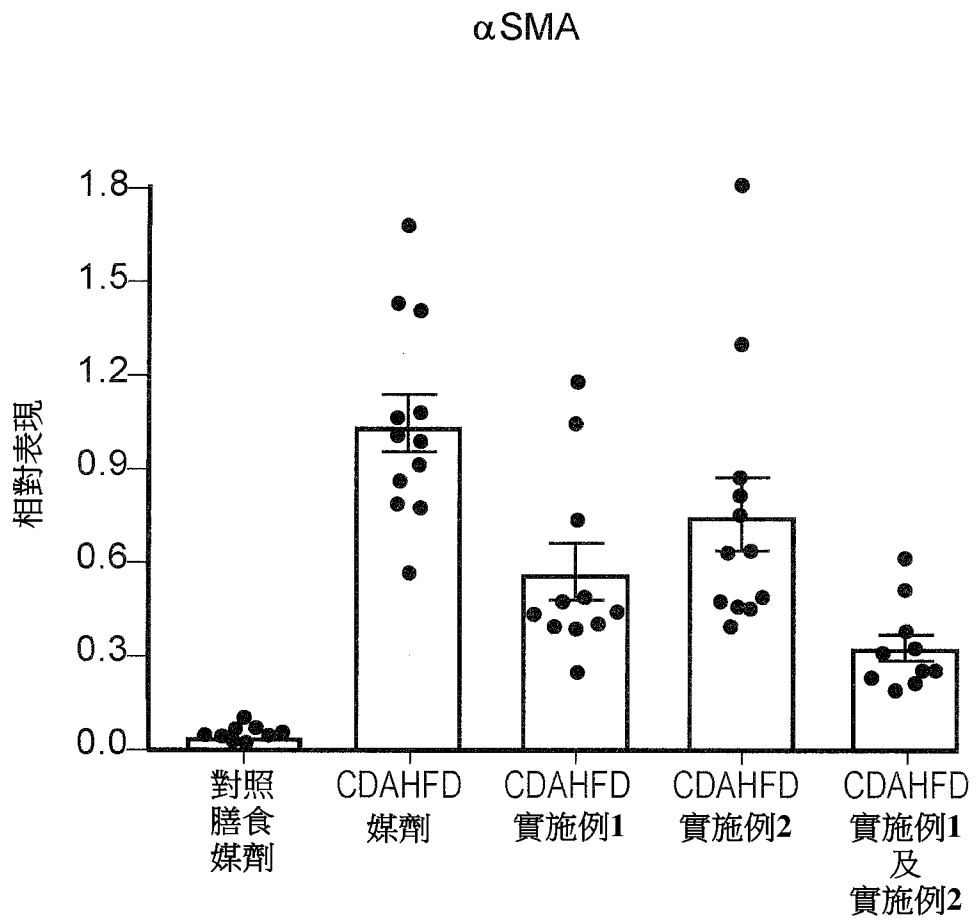
【圖 19】



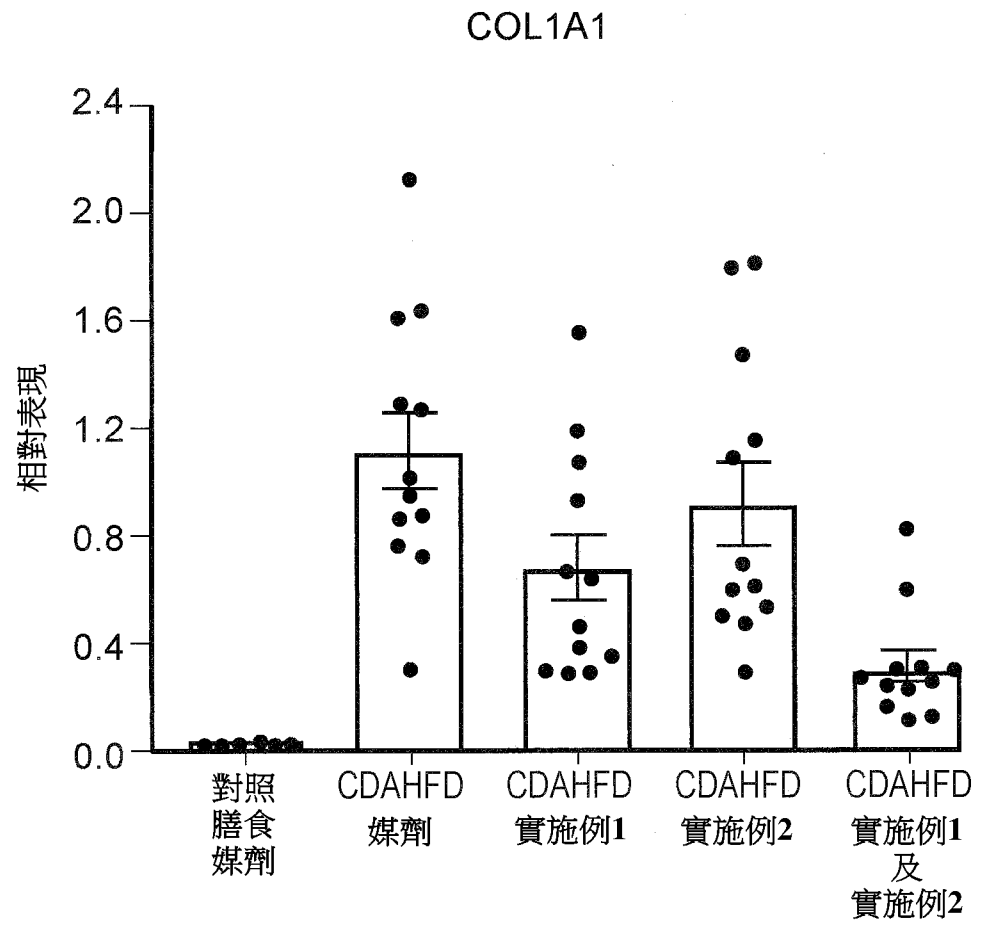
【圖 20】



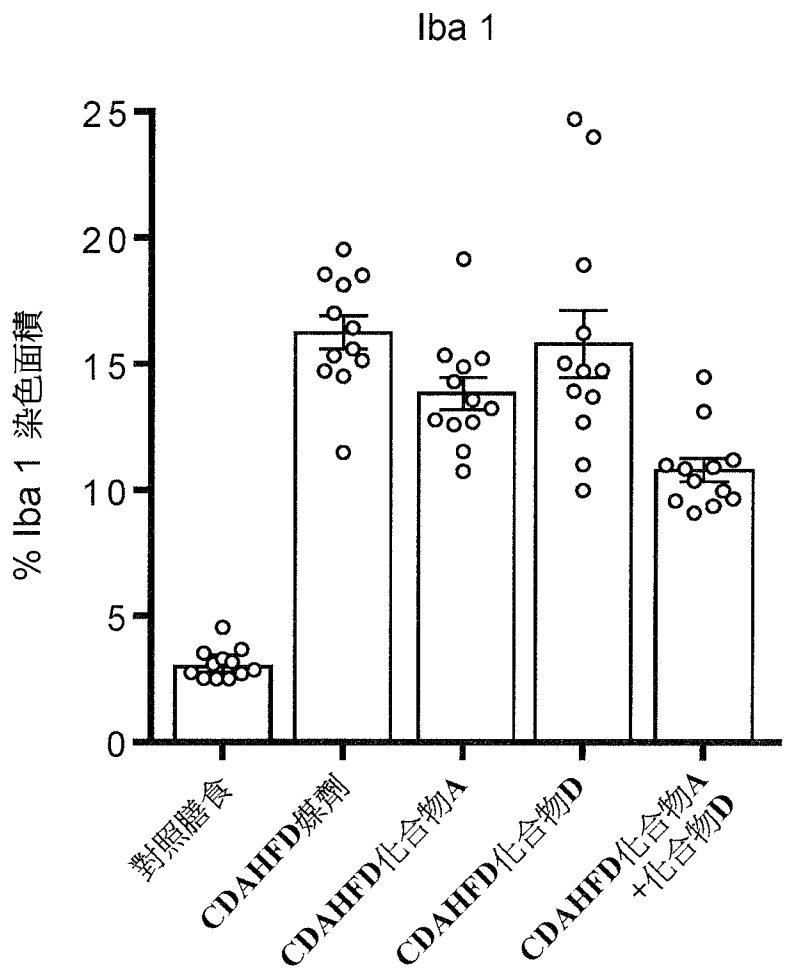
【圖 21】



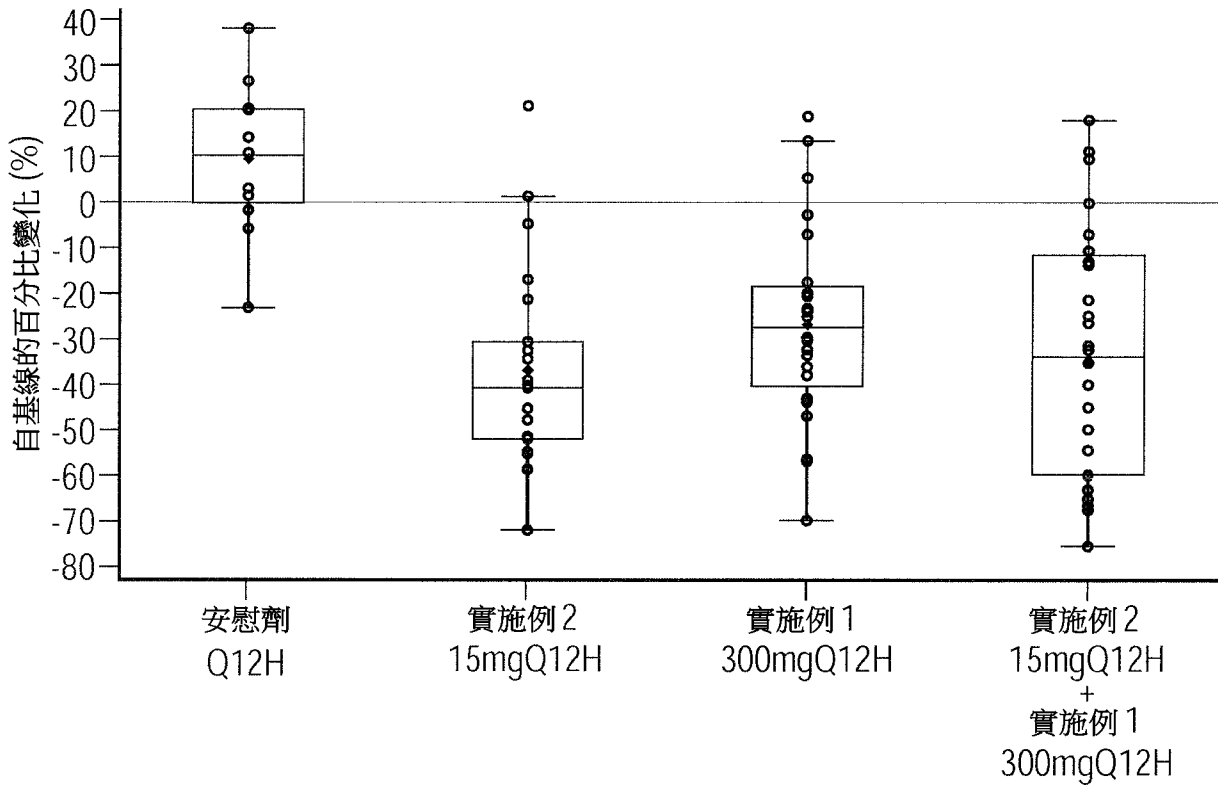
【圖 22】



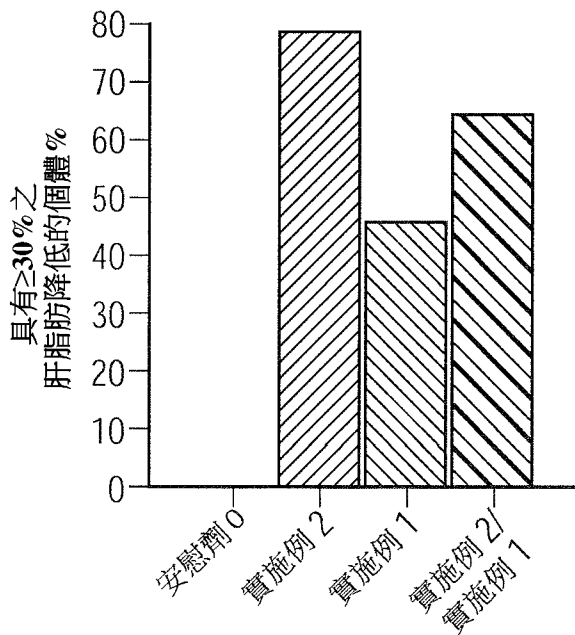
【圖 23】



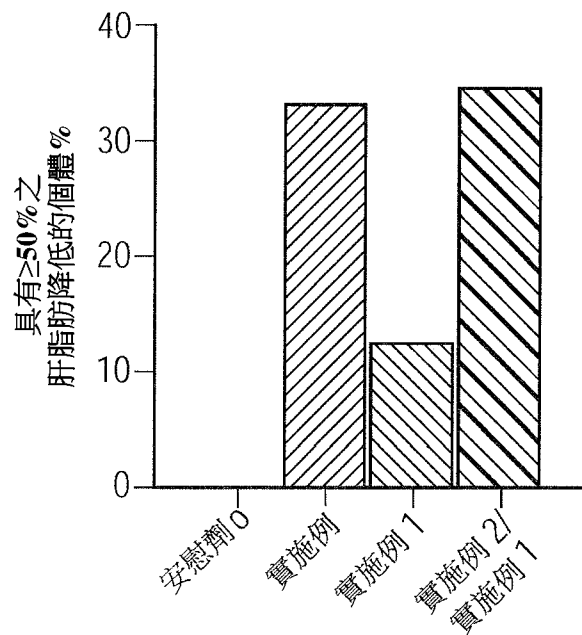
【圖 24】



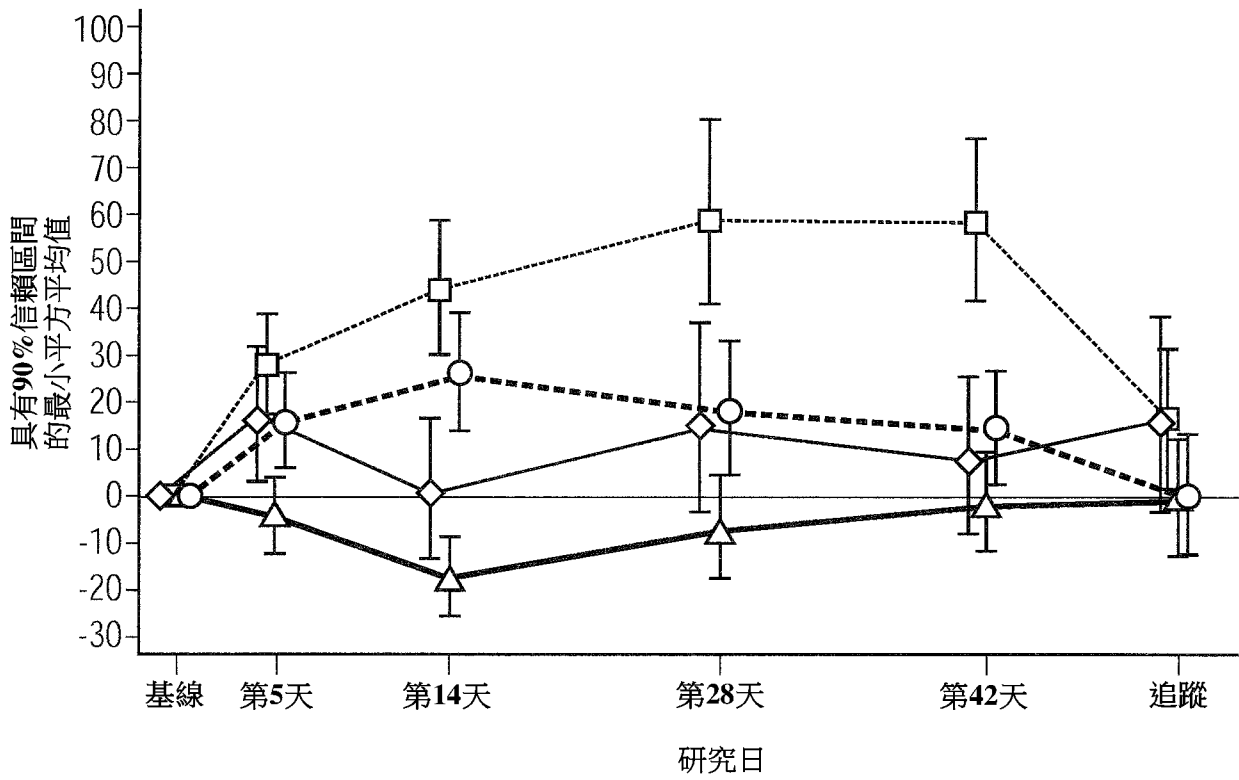
【圖 25a】



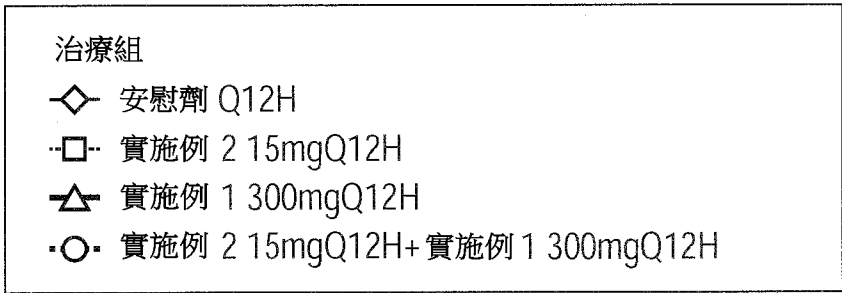
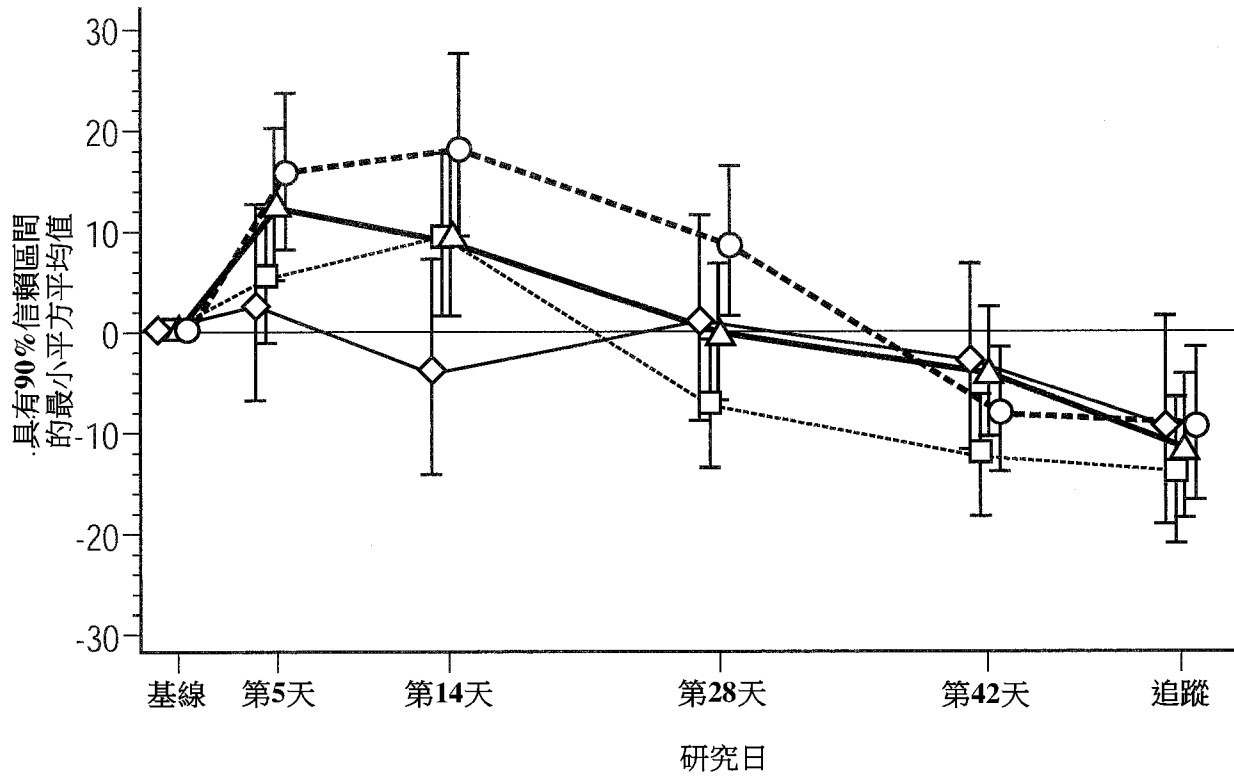
【圖 25b】



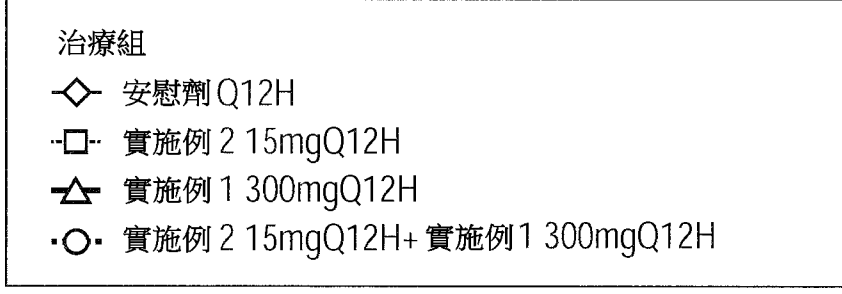
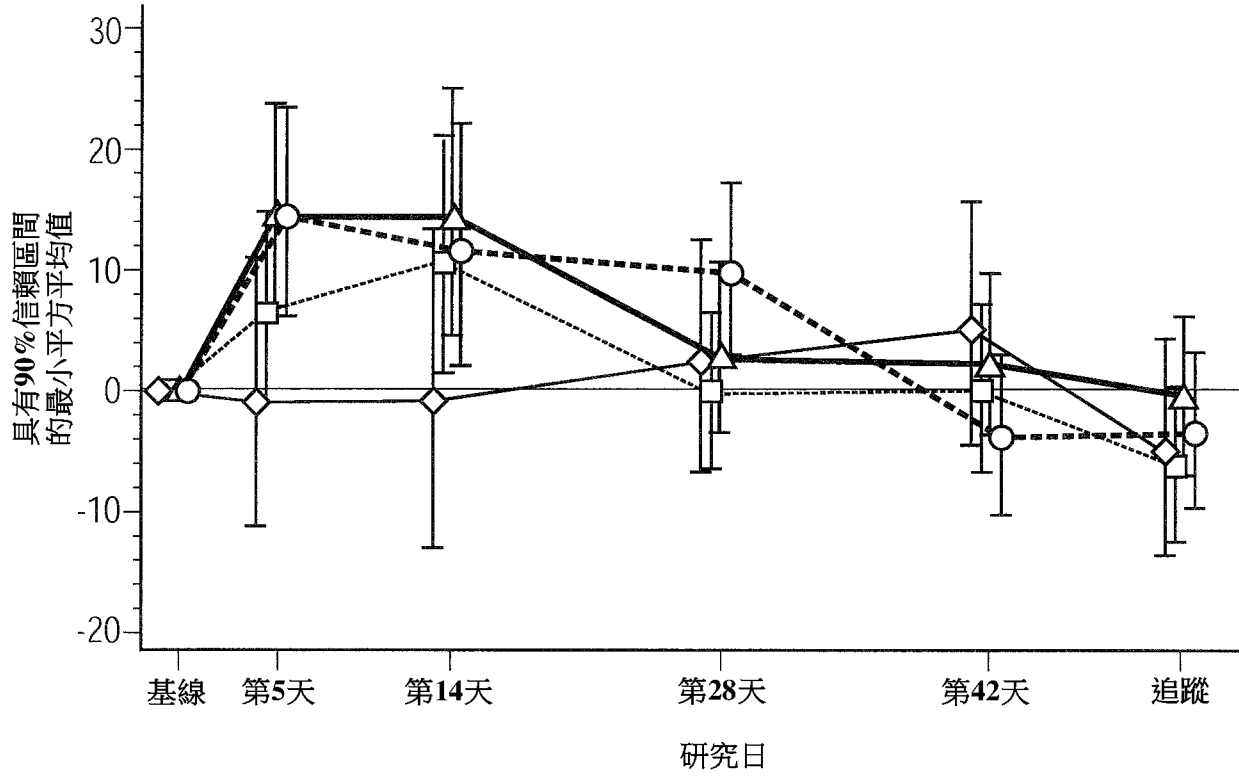
【圖 25c】



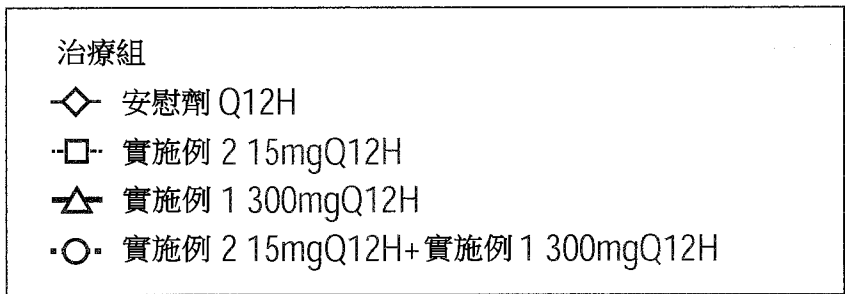
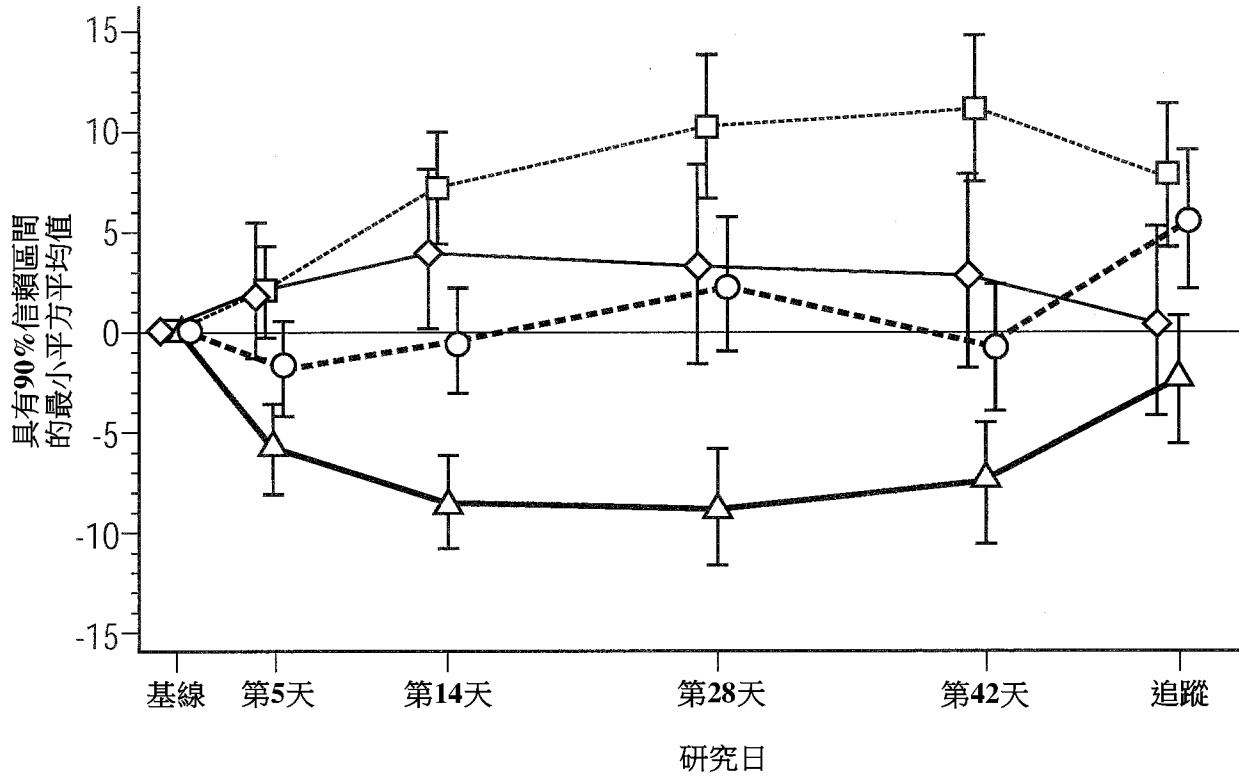
【圖 26】



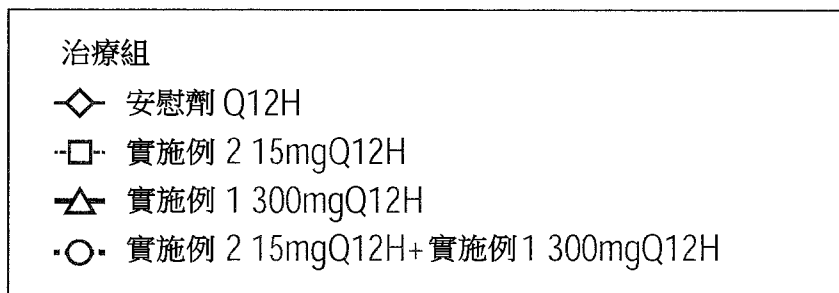
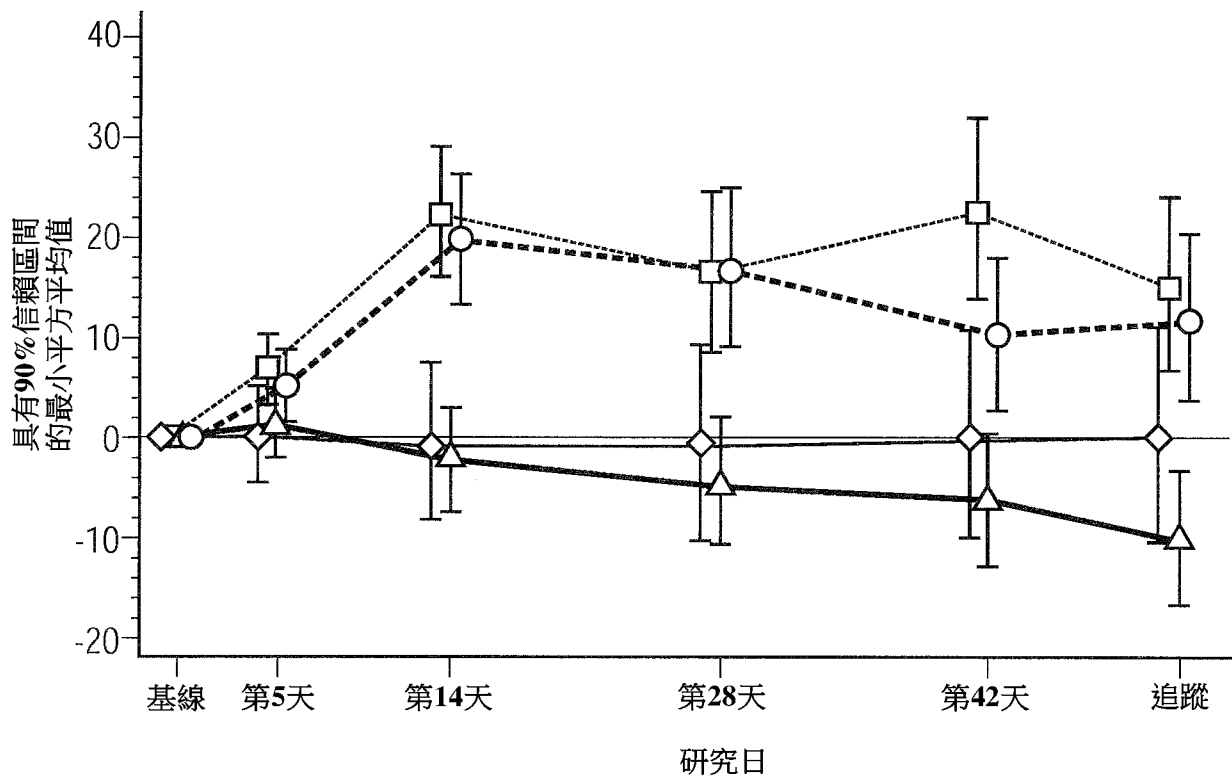
【圖 27a】



【圖 27b】



【圖 27c】



【圖 27d】