



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I586352 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：102120793

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K31/437 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

A61P17/06 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/22 美國

61/663,520

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

比利時

(72)發明人：凡 庫斯特 傑班 亞伯特 伊萊修爾斯 VAN'T KLOOSTER, GERBEN ALBERT
ELEUTHERIUS (NL)；布萊斯 瑞吉納德 克里斯多夫 薩維爾 BRYNS,
REGINALD CHRISTOPHE XAVIER (BE)；凡 羅貝伊 路克 朱利安 可瑞納
VAN ROMPAEY, LUC JULIAAN CORINA (BE)；拿幕 佛倫斯 希維 NAMOUR,
FLORENCE SYLVIE (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2010/141796A2

審查人員：陳瓚如

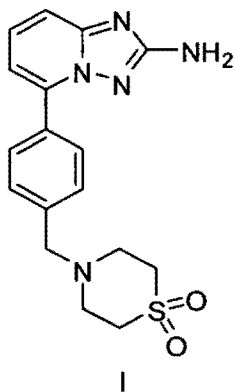
申請專利範圍項數：20 項 圖式數：6 共 93 頁

(54)名稱

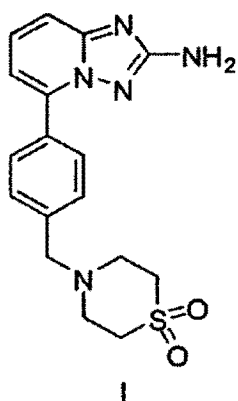
用於治療發炎之胺基三唑并吡啶及其醫藥組合物

AMINOTRIAZOLOPYRIDINE FOR USE IN THE TREATMENT OF INFLAMMATION, AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF

(57)摘要



本發明係關於式 I 化合物之新穎醫學用途，具體而言其用於治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與 IL6 或干擾素分泌過多相關之疾病。具體而言，該化合物抑制 JAK(酪胺酸激酶家族)，且更具體而言 JAK1。本發明亦提供包括該化合物之醫藥組合物、藉由投與該化合物來預防及/或治療涉及以下疾病之方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與 IL6 或干擾素分泌過多有關之疾病。



The present invention relates to the novel medical use of the compound according to Formula I, in particular in the treatment of inflammatory conditions, autoimmune diseases, proliferative diseases, allergy, transplant rejection, diseases involving impairment of cartilage turnover, congenital cartilage malformations, and/or diseases associated with hypersecretion of IL6 or interferons. In particular, the compound inhibits JAK a family of tyrosine kinases, and more particularly JAK1. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising the compound, methods for the prophylaxis and/or treatment of diseases involving inflammatory conditions, autoimmune diseases, proliferative diseases, allergy, transplant rejection, diseases involving impairment of cartilage turnover, congenital cartilage malformations, and/or diseases associated with hypersecretion of IL6 or interferons by administering the compound.

指定代表圖：

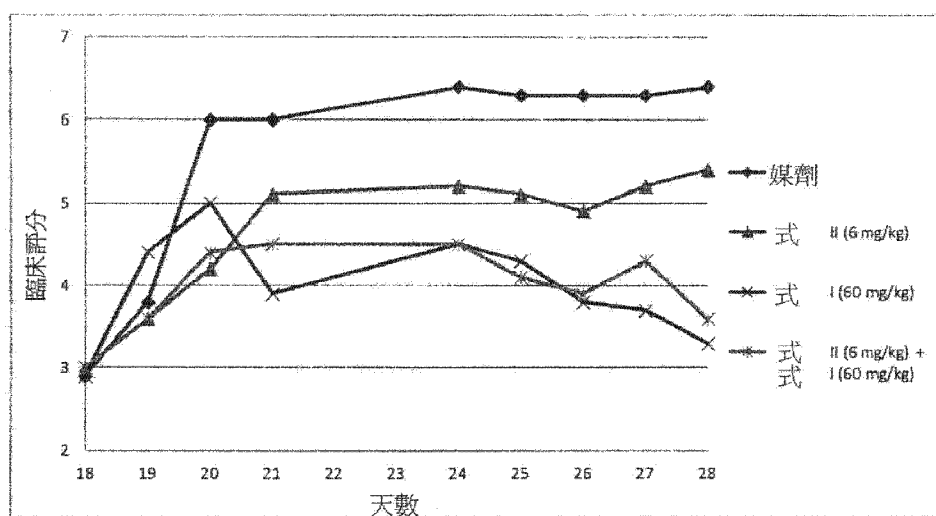
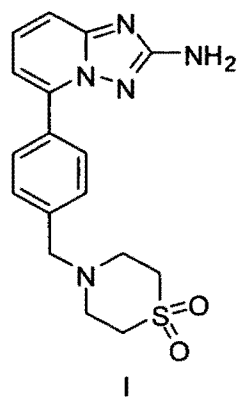


圖 1

特徵化學式：

I586352

TW I586352 B



發明摘要

※ 申請案號： | 0 2 1 2 0 7 9 3

※ 申請日： 102. 6. 11

A61K31/437 (2006.01)

※IPC 分類：A61P1/00 (2006.01)

A61P17/06 (2006.01)

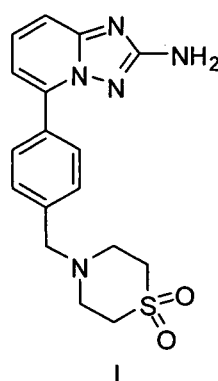
A61P19/02 (2006.01)

【發明名稱】

用於治療發炎之胺基三唑并吡啶及其醫藥組合物

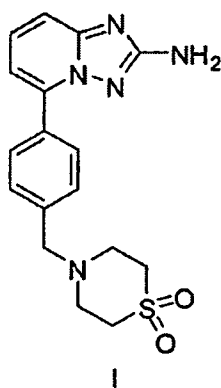
AMINOTRIAZOLOPYRIDINE FOR USE IN THE TREATMENT
OF INFLAMMATION, AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS THEREOF

【中文】



本發明係關於式I化合物之新穎醫學用途，具體而言其用於治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。具體而言，該化合物抑制JAK（酪胺酸激酶家族），且更具體而言JAK1。本發明亦提供包括該化合物之醫藥組合物、藉由投與該化合物來預防及/或治療涉及以下疾病之方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多有關之疾病。

【英文】



The present invention relates to the novel medical use of the compound according to Formula I, in particular in the treatment of inflammatory conditions, autoimmune diseases, proliferative diseases, allergy, transplant rejection, diseases involving impairment of cartilage turnover, congenital cartilage malformations, and/or diseases associated with hypersecretion of IL6 or interferons. In particular, the compound inhibits JAK a family of tyrosine kinases, and more particularly JAK1. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising the compound, methods for the prophylaxis and/or treatment of diseases involving inflammatory conditions, autoimmune diseases, proliferative diseases, allergy, transplant rejection, diseases involving impairment of cartilage turnover, congenital cartilage malformations, and/or diseases associated with hypersecretion of IL6 or interferons by administering the compound.

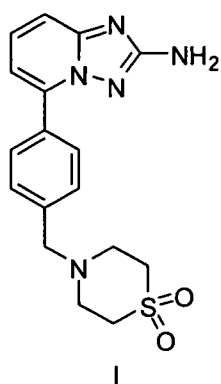
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於治療發炎之胺基三唑并吡啶及其醫藥組合物

AMINOTRIAZOLOPYRIDINE FOR USE IN THE TREATMENT
OF INFLAMMATION, AND PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS THEREOF

【技術領域】

本發明係關於本發明式I化合物之醫學用途。具體而言，本發明係關於本發明式I化合物在治療以下疾病中之用途：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。具體而言，該化合物抑制JAK (酪胺酸激酶家族)，且更具體而言JAK1。本發明亦提供包括該化合物之醫藥組合物及藉由投與本發明式I化合物來預防及/或治療包含以下疾病之方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。

Janus激酶(JAK)係將細胞介素信號自膜受體轉導至STAT轉錄因子之細胞質酪胺酸激酶。闡述四個JAK家族成員：JAK1、JAK2、JAK3及TYK2。在細胞介素結合至其受體後，JAK家族成員自磷酸化及/或彼此轉磷酸化、之後STAT發生磷酸化，隨後磷酸化STAT遷移至細胞核以調節轉錄。JAK-STAT細胞內信號轉導作用於干擾素、大多數介白素以及各種細胞介素及內分泌因子，例如EPO、TPO、GH、OSM、LIF、CNTF、GM-CSF及PRL (Vainchenker W.等人(2008))。

遺傳模型及小分子JAK抑制劑研究之組合揭示若干種JAK之治療

潛力。

JAK1係免疫-發炎性疾病領域之靶標。JAK1與其他JAK發生異源二聚化以轉導細胞介素引發之促發炎信號傳導。因此，令人感興趣的是，藉由抑制JAK1來治療免疫-發炎性疾病(具有使用JAK1信號傳導之與病理學相關之細胞介素，例如IL-6、IL-4、IL-5、IL-12、IL-13、IL-23或IFN γ)以及由JAK調介之信號轉導引發之其他疾病。

在JAK家族成員之作用中，存在一些重疊，此乃因大多數信號傳導路徑涉及一種以上的JAK，然而對於一些生長因子(例如紅血球生成素及促血小板生成素)僅涉及JAK2。

JAK3在經由傳遞由介白素(IL)-2產生之信號來阻斷免疫功能中起主要作用。

另一方面，TYK2似乎將與JAK2及JAK3組合作用以轉導諸如IL-12及IL-23等細胞介素之信號傳導。

已使用JAK家族成員中之每一者缺失之小鼠對JAK酶之作用進行了主要研究。由於細胞介素藉助JAK1之信號傳導存在缺陷，JAK1敲除的小鼠展現圍產期致死表型且亦具有缺陷性淋巴發育及功能。由於定向型紅系造血失敗，JAK2缺陷在第12天時導致胚胎致死性。JAK3缺陷型小鼠具有嚴重的合併之免疫缺陷(SCID)表型但並不具有非免疫性缺陷(Verstovsek, 2009, Hematology Am Soc Hematol Educ Program., 636-42)。

如使用泛JAK抑制劑已觀察到，非選擇性抑制可能與諸如以下等負效應相關：貧血、感染率增加、嗜中性球及淋巴細胞計數較少、血紅蛋白減少及膽固醇含量升高(Elie Dolgin, 2011, Nature Reviews Drug Discovery 10, 717-718)。

因此，研發出選擇性JAK抑制劑將有益於最小化該等負效應。

【先前技術】

軟骨退化係多種疾病之標誌，其中類風濕性關節炎及骨關節炎最顯著。類風濕性關節炎(RA)係一種慢性關節退化性疾病，其特徵在於關節結構發炎及受到破壞。若不對該疾病加以抑制，則其會導致實質失能及因喪失關節功能而引發之疼痛以及甚至過早死亡。因此，RA治療之目標不僅在於減緩疾病且在於達到好轉以終止關節破壞。除疾病結果之嚴重性外，RA之高患病率(全世界約0.8%的成人受侵襲)亦意味著高社會-經濟影響。(關於RA之綜述參見Smolen及Steiner (2003)；Lee及Weinblatt (2001)；Choy及Panayi (2001)；O'Dell (2004)及Firestein (2003))。

JAK1參與許多細胞介素及激素之細胞內信號轉導。可藉由JAK1抑制劑來改善與該等細胞介素及激素中之任一者相關之病況。因此，若干過敏、發炎及自體免疫病症可獲益於本發明所闡述化合物之治療，該等病症包含類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、幼年型特發性關節炎、骨關節炎、氣喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、組織纖維化、嗜酸性發炎、食道炎、發炎性腸病(例如克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎)、移植、移植物抗宿主疾病、牛皮癬、肌炎、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、幼年型特發性關節炎、多發性硬化(Kopf等人，2010)。

牛皮癬係可侵襲皮膚之疾病。然而，並未完全瞭解牛皮癬之原因，人們相信其係與細胞介素(具體而言TNF α)釋放相關之免疫調介相關疾病，其引起發炎及皮膚細胞之快速再現。此假設已經以下觀察結果證實：免疫抑制藥劑可清除牛皮癬斑塊(Zenz R、Eferl R、Kenner L等人(2005)「Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins」。Nature 437 (7057): 369-75)

牛皮癬亦可導致關節發炎，此稱為牛皮癬性關節炎。牛皮癬患

者總人數的10%-30%亦患有牛皮癬性關節炎(Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2004年11月18日)。「Guideline on Clinical Investigation of Medicinal Products indicated for the treatment of Psoriasis」)。牛皮癬因其慢性復發性質而難以治療。最近已證實抑制 JAK 可成功改良牛皮癬病狀。(Punwani 等人, (2012)「Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis」 J Am Acad Dermatol., 67, 4, 658-664)。

發炎性腸病(IBD)係一組結腸及小腸之發炎性病狀。IBD之主要類型係克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎。最近已經由全基因組關聯(genome-wide association, GWAS)研究發現, T細胞蛋白酪胺酸磷酸酶(TCPTP)係JAK/STAT及生長因子受體磷酸酶, 其已藉由GWAS與1型糖尿病、類風濕性關節炎及克羅恩氏病之發病機制相關聯(Zikherman等人, J Clin Invest. 2011 Dec;121(12):4618-21)。因此, 抑制JAK路徑可能提供治療IBD之方式。

人們已發現在包含骨髓增生性病徵之其他病狀中亦涉及JAK家族成員(O'Sullivan等人, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506), 其中已鑑別出JAK2中之突變。此表明JAK (尤其JAK2)之抑制劑亦可用於治療骨髓增生性病徵。此外, JAK家族(尤其JAK1、JAK2及JAK3)與癌症(尤其白血病, 例如急性骨髓樣白血病(O'Sullivan等人, 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506; Xiang等人, 2008, 「Identification of somatic *JAK1* mutations in patients with acute myeloid leukemia」 Blood First Edition Paper, 2007年12月26日在線預公開; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308)及急性淋巴細胞性白血病(Mullighan等人, 2009)、皮膚T細胞淋巴瘤(Zhang等人, 1996, PNAS, 93, 9148-9153)或實體腫瘤(例如子宮平滑肌肉瘤(Constantinescu等人, 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131)、前列腺癌(Tam等人,

2007, British Journal of cancer, 97, 378-383)及乳癌(Berishaj等人, 2007, Breast cancer Research 9: R32))相關。該等結果表明, JAK (尤其JAK1)之抑制劑亦可用於治療癌症(白血病及實體腫瘤(例如子宮平滑肌肉瘤、前列腺癌))。

此外, 卡斯爾曼病(Castleman's disease)、多發性骨髓瘤、系膜增生性腎小球腎炎、牛皮癬及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)可能係由於細胞介素IL-6分泌過多所致, 細胞介素IL-6之生物效應係由細胞內JAK-STAT信號傳導調介(Tetsuji Naka、Norihito Nishimoto及Tadamitsu Kishimoto, Arthritis Res 2002, 4(增刊3): S233-S242)。此結果顯示, JAK抑制劑亦可用於治療該等疾病。

當前療法並不令人滿意且因此業內仍需要鑑別其他可用於治療以下疾病之化合物: 發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病, 尤其類風濕性關節炎。

此外, 該等病狀係需要長期治療且重複攝取藥物之慢性病狀。長期治療可能對患者及醫師一樣均係沉重負擔, 此乃因患者可能無法耐受或變得無法耐受藥物, 且此外高劑量或高劑量頻率可能引起不適負效應及/或低患者順從性, 其中該患者可能偶然、有意或意外地錯過一次給藥。不遵從性對慢性疾病之影響有所不同, 且介於最低至極顯著範圍內。(Ingersoll等人, 2008 J Behav Med.; 31(3): 213-224)。

因此, 業內需要鑑別出更多化合物以增強醫師之手段, 及具有低頻率劑量方案之化合物以改良患者壽命。

為發現新藥品, 通常設定標準以鑑別出最適宜的候選藥物, 因此, 許多化合物在活體外模型中經快速評價, 且若其不滿足該等標準則同樣快速放棄。活體外研究通常具有高於活體內研究之通量且對決策作出過程有極大幫助。因此, 通常預期活體外模型可預測藥物之活

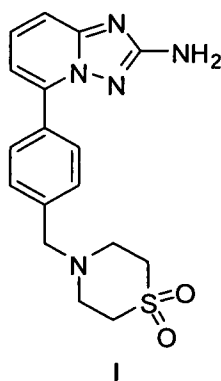
體內行為，且放棄表面上看似乎在活體外將不提供適宜特徵之化合物。在此背景下，所研究之式I化合物顯示不夠令人感興趣的活體外特徵，然而尤其在人類中之活體內研究揭露其出人意料的性質。

【發明內容】

本發明係基於以下發現：本發明式I化合物可用作藥劑。在具體態樣中，本發明式I化合物係JAK、且更具體而言JAK1之抑制劑。

本發明亦提供產生本發明式I化合物之方法、包括本發明式I化合物之醫藥組合物及藉由投與本發明式I化合物來預防及/或治療以下疾病之方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。

因此，在本發明之第一態樣中，提供本發明之化合物用於藥品中，該化合物具有式I：



令人驚奇的是，本發明式I化合物在人類活體內展現與其他動物物種顯著不同之特徵，此與活體外預測相反。實際上，已在人類活體內證實，本發明式I化合物之表觀最終半衰期明顯係其他動物物種中的至少3倍長。此導致該化合物在人類中累積從而使治療效應維持較長時間段，由此允許每天一次至每週一次投藥。因此，本發明式I化合物可提供包含低頻率劑量方案及/或增加患者順從性在內之優點。具體而言，若患者錯過一次給藥，則可降低不遵從性之影響。

在具體態樣中，提供本發明式I化合物用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎。

在又一態樣中，本發明提供包括本發明式I化合物及醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑之醫藥組合物。在具體態樣中，醫藥組合物可另外包括適於與本發明式I化合物組合使用之其他治療活性成份。在更具體態樣中，又一治療活性成份係用於治療關節炎之化合物。在最具體態樣中，又一治療活性成份係用於治療類風濕性關節炎之化合物。

此外，可用於本文所揭示之醫藥組合物及治療方法中之本發明式I化合物在製備及使用時皆為醫藥上可接受的。

在本發明之又一態樣中，本發明提供治療易患或患有選自彼等本文所列示者(且尤其以下)之病狀之哺乳動物(尤其人類)的方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，更尤其類風濕性關節炎，該方法包括投與治療有效量之如本文所闡述之醫藥組合物或本發明式I化合物。

本發明亦提供包括本發明式I化合物及適宜醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑之醫藥組合物用於藥品中。在具體態樣中，醫藥組合物係用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎。

在其他態樣中，本發明提供合成本發明式I化合物之方法，其中代表性合成方案及路徑將稍後揭示於本文中。

藉由考慮隨後之詳細說明，彼等熟習此項技術者將明瞭其他目的及優點。

【圖式簡單說明】

圖1：顯示在經本文所揭示之化合物治療後大鼠CIA臨床評分。

圖2：顯示在經本文所揭示之化合物治療後大鼠CIA模型中踝直徑的演化。

圖3：顯示式II化合物之活體外代謝特徵。

圖4：顯示投與式II化合物時所量測之式I:式II之暴露比率(以AUC表示)。

圖5：顯示在投與式II化合物後所揭示化合物之暴露量之值，以IC₅₀值的倍數表示。

圖6：顯示在投與式II化合物後式I及式II化合物在24 h時段內暴露量的合併值，以IC₅₀值的倍數表示。

【實施方式】**定義**

下列術語意欲具有下文所呈現關於其之含義且可用於理解本發明之說明及既定範疇。

當闡述本發明(其可包含化合物、含有該等化合物之醫藥組合物及使用該等化合物及組合物之方法)時，除非另有說明，否則下列術語(若存在)具有下列含義。亦應理解，當於本文中闡述時，任何下文所定義之部分皆可經各種取代基取代，且各別定義意欲將該等經取代部分包含於其下述範疇內。除非另有說明，否則術語「經取代」欲如下文所述來定義。應進一步理解，在本文中使用時認為術語「基團(group)」與「基團(radical)」可互換使用。

本文可使用之冠詞「一(a及an)」係指一個或一個以上(即至少一個)的該冠詞之文法受詞。舉例而言，「一類似物」意指一個類似物或一個以上之類似物。

如本文中所使用之術語「JAK」涉及Janus激酶(JAK)家族，其係

將細胞介素信號自膜受體轉導至STAT轉錄因子之細胞質酪胺酸激酶。闡述以下4個JAK家族成員：JAK1、JAK2、JAK3及TYK2，且術語JAK可如上下文所指示係指全部所有JAK家族成員或JAK家族成員中之一或多者。

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

「醫藥上可接受之鹽」係指醫藥上可接受且具有母體化合物之期望藥理學活性之式I化合物的鹽。具體而言，該等鹽係無毒的，可為無機或有機酸加成鹽及鹼加成鹽。特定而言，該等鹽包含：(1)酸加成鹽，由無機酸形成，該等無機酸係(例如)鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及諸如此類；或由有機酸形成，(例如)乙酸、丙酸、己酸、環戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、蘋果酸、馬來酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、3-(4-羥基苯甲醯基)苯甲酸、肉桂酸、苯乙醇酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羥基乙烷磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟腦磺酸、4-甲基雙環[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸，葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、第三丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、麩胺酸、羥基萘甲酸、水楊酸、硬脂酸、黏康酸(muconic acid)及諸如此類；或(2)當存在於母體化合物中之酸性質子經金屬離子(例如鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)替代時或與有機鹼(例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡萄糖胺及諸如此類)配位時形成之鹽。鹽進一步包含(僅舉例而言)鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鎂鹽、銨鹽、四烷基銨鹽及諸如此類；且當化合物含有鹼性官能基時，為無毒性有機或無機酸之鹽，例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、酒石酸鹽、甲磺酸鹽、乙酸鹽、馬來

酸鹽、草酸鹽及諸如此類。術語「醫藥上可接受之陽離子」係指可接受之酸性官能基之陽離子抗衡離子。該等陽離子例示為鈉、鉀、鈣、鎂、銨、四烷基銨陽離子及諸如此類。

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

「溶劑合物」係指通常藉由溶劑分解反應與溶劑結合之化合物形式。此物理結合包含氫鍵結。習用溶劑包含水、乙醇、乙酸及諸如此類。式I化合物可以(例如)結晶形式製備且可呈溶合或水合形式。適宜溶劑合物包含醫藥上可接受之溶劑合物(例如水合物)，且進一步包含化學計量溶劑合物及非化學計量溶劑合物二者。在某些情形下，例如當一或多個溶劑分子納入結晶固體之晶格中時，溶劑合物將能夠解離。「溶劑合物」涵蓋溶液相及可解離溶劑合物二者。代表性溶劑合物包含水合物、乙醇合物及甲醇合物。

「個體」包含人類。術語「人類」、「患者」及「個體」在本文中可互換使用。

「治療有效量」意指當投與個體以治療疾病時化合物足以實現此疾病治療之量。「治療有效量」可端視該化合物、疾病及其嚴重程度以及欲治療個體之年齡、體重等而變化。

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

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

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

如本文所使用，術語「發炎性病狀」係指包含以下之病狀之群：類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型特發性關節炎、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘、鼻炎)、發炎性腸病(例如克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎)、內毒素引發之疾病狀態(例如搭橋手術後併發症或促成(例如)慢性心力衰竭之慢性內毒素狀態)及涉及軟骨之相關疾病(例如關節之相關疾病)。具體而言，該術語係指類風濕性關節炎、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘)及發炎性腸病。

如本文所使用，術語「自體免疫疾病」係指包含以下之疾病之群：阻塞性氣道疾病(包含例如以下等病狀：COPD、氣喘(例如內源性氣喘、外源性氣喘、粉塵性氣喘或嬰兒型氣喘)、尤其慢性或頑固性氣喘(例如遲發性氣喘及氣道高反應性)、枝氣管炎(包含枝氣管炎氣喘)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、皮膚性紅斑狼瘡(CLE)、多發性硬化、I型糖尿病及其相關併發症、異位性濕疹(異位性皮炎)、接觸性皮炎及其他濕疹性皮炎、發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)、動脈粥樣硬化及肌肉萎縮性脊髓側索硬化。具體而言，該術語係指COPD、氣喘、I型糖尿病及發炎性腸病。

如本文所使用，術語「增生性疾病」係指諸如以下等病狀：癌症(例如子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、骨髓增生性病症(例如真性紅血球增多症、原發性血小板增多症及骨髓纖維化)、白血病(例如急性骨

髓樣白血病及急性淋巴細胞性白血病)、多發性骨髓瘤、牛皮癬、再狹窄、硬化性皮炎或纖維化。具體而言，該術語係指癌症、白血病、多發性骨髓瘤及牛皮癬。

如本文所使用，術語「癌症」係指皮膚或身體器官(例如但不限於乳房、前列腺、肺、腎臟、胰臟、胃或腸)中細胞之惡性或良性贅生物。癌症易於滲入鄰近組織且擴散(轉移)至遠隔器官，例如骨、肝臟、肺或腦。如本文所使用，術語癌症包含轉移性腫瘤細胞類型(例如但不限於黑色素瘤、淋巴瘤、白血病、纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及肥胖細胞瘤)及組織癌瘤類型(例如但不限於結腸直腸癌、前列腺癌、小細胞肺癌及非小細胞肺癌、乳癌、胰臟癌、膀胱癌、腎癌、胃癌、膠質母細胞瘤、原發性肝癌、卵巢癌、前列腺癌及子宮平滑肌肉瘤)二者。

如本文所使用，術語「白血病」係指血液及血液形成器官之瘤形成疾病。該等疾病可造成骨髓及免疫系統功能障礙，此致使宿主極易受感染及出血影響。具體而言，術語白血病係指急性骨髓樣白血病(AML)及急性淋巴細胞性白血病(ALL)。

如本文所使用，術語「移植排斥」係指(例如)胰島、幹細胞、骨髓、皮膚、肌肉、角膜組織、神經元組織、心臟、肺、組合之心臟-肺、腎臟、肝臟、腸、胰臟、氣管或食道之細胞、組織或實體器官同種-或異種移植物的急性或慢性排斥或移植物抗宿主疾病。

如本文所使用，術語「涉及軟骨代謝損傷之疾病」包含諸如以下等病狀：骨關節炎、牛皮癬性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、痛風性關節炎、敗血性或感染性關節炎、反應性關節炎、反射性交感神經營養障礙、痛性營養障礙、提策(Tietze)症候群或肋軟骨炎、纖維肌痛、骨軟骨炎、神經原性或神經病性關節炎、關節病、關節炎之地方性形式(例如地方性變形性骨關節炎)、Mseleni病及Handigodu病；

由纖維肌痛、全身性紅斑狼瘡、硬皮病及關節黏連性脊椎炎造成之退化。

如本文所使用，術語「先天軟骨畸形」包含諸如以下等病狀：遺傳性軟骨溶解、軟骨發育不全及假軟骨發育不全、尤其(但不限於)小耳畸形、無耳畸形、幹骺端軟骨發育不全及相關病症。

如本文所使用，術語「與IL6分泌過多相關之疾病」包含諸如以下等病狀：卡斯爾曼病、多發性骨髓瘤、牛皮癬、卡波西氏肉瘤及/或系膜增生性腎小球腎炎。

如本文所使用，術語「與干擾素分泌過多相關之疾病」包含諸如以下等病狀：全身性及皮膚性紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、牛皮癬、類風濕性關節炎。

「本發明化合物」及等效表述意欲涵蓋如前文所闡述之式I或式II化合物(如上下文所指示)，若上下文允許，則該表述包含醫藥上可接受之鹽及溶劑合物(例如水合物)及醫藥上可接受之鹽之溶劑合物。相似地，當提及中間體時，不論其本身是否提出申請，若上下文允許，則其皆意欲涵蓋其鹽及溶劑合物。

本發明化合物之其他衍生物以其酸及酸衍生物形式皆具有活性，但酸敏形式在哺乳動物生物體中通常提供溶解度、組織相容性或延遲釋放優點(參見Bundgard, H., Design of Prodrugs, 第7-9頁，第21-24頁，Elsevier, Amsterdam 1985)。

如本文所使用，術語「同位素變體」係指於構成化合物之一或多個原子處以非天然比例含有同位素之該化合物。舉例而言，化合物之「同位素變體」可含有一或多個非放射性同位素，例如氘(^2H 或D)、碳-13(^{13}C)、氮-15(^{15}N)或諸如此類。應瞭解，在進行該同位素取代之化合物中，下列原子(若存在)可改變以使(例如)任一氫可為 $^2\text{H}/\text{D}$ 、任一碳可為 ^{13}C 或任一氮可為 ^{15}N ，且熟習此項技術者可決定該

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

本文所提供化合物之所有同位素變體，不管是放射性還是非放射性，皆意欲涵蓋於本發明範疇內。

「互變異構物」係指具有具體化合物結構之相互轉換形式且在氫原子及電子置換方面不同之化合物。因此，兩種結構可經由 π 電子及原子(通常為H)移動來達到平衡。舉例而言，烯醇及酮係互變異構物，因為其可藉由使用酸或鹼處理快速地發生互變。互變異構現象之另一實例係苯基硝基甲烷之酸式及硝基形式，其同樣係藉由使用酸或鹼處理形成。

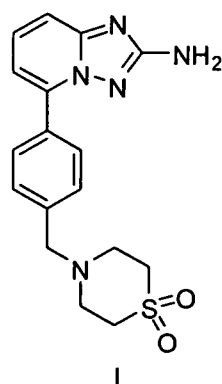
互變異構形式可能與達成目標化合物之最佳化學反應性及生物活性相關。

本發明

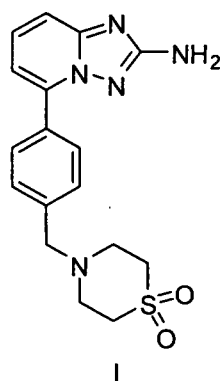
本發明係基於以下發現：本發明式I化合物可用作藥劑。在具體態樣中，本發明式I化合物係JAK、且更具體而言JAK1之抑制劑。

本發明亦提供產生本發明式I化合物之方法、包括本發明式I化合物之醫藥組合物及藉由投與本發明式I化合物來預防及/或治療以下疾病之方法：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。

因此，在本發明之第一實施例中提供本發明式I化合物用於藥品中，該化合物具有式I：



在本發明之另一實施例中提供為JAK抑制劑之本發明化合物用於藥品中，該化合物具有式I：



令人驚奇的是，本發明式I化合物在人類活體內展現與其他動物物種顯著不同之特徵，此與活體外預測相反。實際上，已在人類活體內證實，本發明式I化合物之表觀最終半衰期明顯係其他動物物種的至少3倍。此導致該化合物在人類中累積從而使治療效應維持較長時間段，由此允許每天一次至每週一次投藥。因此，本發明式I化合物可提供包含低頻率劑量方案及/或增加患者順從性在內之優點。具體而言，若患者錯過一次給藥，則可降低不遵從性之影響。

在一實施例中，本發明式I化合物並非同位素變體。

在一態樣中，本發明式I化合物以游離鹼形式存在。

在一態樣中，本發明式I化合物係醫藥上可接受之鹽。

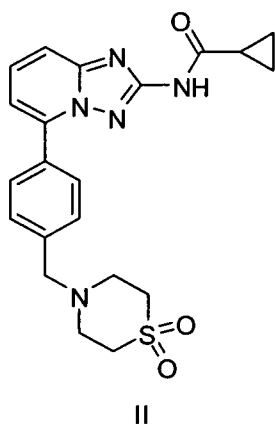
在一態樣中，本發明式I化合物係本發明式I化合物之溶劑合物。

在一態樣中，本發明式I化合物係本發明式I化合物之醫藥上可接受之鹽的溶劑合物。

本發明式I化合物係JAK抑制劑。具體而言，本發明式I化合物係JAK1之有效抑制劑，然而其可抑制JAK2、JAK3及TYK2且具有較低效能。

在又一態樣中，本發明提供包括本發明式I化合物及醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑之醫藥組合物。

在又一實施例中，醫藥組合物進一步包括另一治療劑。在具體態樣中，另一化合物係用於治療關節炎之化合物。在更具體態樣中，另一化合物係用於治療類風濕性關節炎之化合物。在最具體實施例中，又一治療劑係本發明式II化合物：



醫藥組合物

在用作醫藥時，本發明式I化合物通常係以醫藥組合物形式投與。該等組合物可以醫藥業內熟知之方式製備且包括至少一種本發明式I之活性化合物。通常，本發明式I化合物係以醫藥有效量投與。本發明式I化合物之實際投與量通常將由醫師根據包含以下在內之相關情況來確定：欲治療之病狀、所選投與途徑、實際投與之本發明式I化合物、個體患者之年齡、體重及反應、患者症狀之嚴重程度及諸如此類。

本發明之醫藥組合物可藉由包含經口、直腸、經皮、皮下、關節內、靜脈內、肌內及鼻內在內之多種途徑投與。端視既定遞送途徑，將本發明式I化合物較佳調配為可注射或口服組合物或調配為皆

- 用於經皮投與之洗液或貼片。
- 用於經口投與之組合物可採取散裝液體溶液或懸浮液或散裝粉末形式。然而，更通常地，該等組合物係以單位劑型呈現以有利於精確投藥。術語「單位劑型」係指適於作為單一劑量用於人類個體及其他哺乳動物之物理離散單位，各單位含有經計算可產生期望治療效應之預定量的活性材料以及適宜醫藥賦形劑、媒劑或載劑。典型單位劑型包含液體組合物之預填充、預量測安瓿或唧筒或在固體組合物之情形下包含丸劑、錠劑、膠囊或諸如此類。在該等組合物中，本發明式I化合物通常係次要組份(約0.1重量%至約50重量%或較佳約1重量%至約40重量%)，且剩餘部分係有利於形成期望劑型之各種媒劑或載劑及處理助劑。

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

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

通常將經皮組合物調配為局部軟膏或乳霜，其含有通常介於約0.01重量%至約20重量%、較佳約0.1重量%至約20重量%、較佳約0.1重量%至約10重量%且更佳約0.5重量%至約15重量%之間之量的活性成份。當調配為軟膏時，活性成份通常將與石蠟或水可混溶軟膏基質

組合。另一選擇為，可使用(例如)水包油乳霜基質將活性成份調配成乳霜。該等經皮調配物已為業內所熟知且通常包含其他成份以增強活性成份或調配物之真皮滲透性或穩定性。所有該等已知經皮調配物及成份皆包含於本發明範疇內。

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

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

本發明式I化合物亦可以持續釋放形式或自持續釋放藥物遞送系統投與。代表性持續釋放材料之說明可參見 Remington's Pharmaceutical Sciences。

下列調配物實例闡釋可根據本發明製備之代表性醫藥組合物。然而，本發明並不限於下列醫藥組合物。

調配物1-錠劑

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

調配物2-膠囊

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

調配物3-液體

可將本發明式I化合物(125 mg)與蔗糖(1.75 g)及黃原膠(4 mg)混合且可摻和所得混合物、使其通過10號網目美國篩，且然後與先前製

備之微晶纖維素及羧甲基纖維素鈉(11:89, 50 mg)存於水中之溶液混合。可用水稀釋苯甲酸鈉(10 mg)、矯味劑及著色劑且邊攪拌邊添加。然後邊攪拌邊添加足量水。然後可進一步添加足量水以產生5 mL之總體積。

調配物4-錠劑

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

調配物5-注射劑

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

調配物6-局部製劑

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

治療方法

在一實施例中，本發明提供包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於藥品中。在具體實施例中，本發明提供包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎。

在另一實施例中，本發明提供包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於製造用來預防及/或治療以下疾病之藥劑：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之

疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，且尤其類風濕性關節炎。

在一實施例中，本發明提供包括本發明式I化合物及另一治療劑之醫藥組合物。在具體實施例中，另一治療劑係關節炎治療劑。在更具體實施例中，另一治療劑係類風濕性關節炎治療劑。在最具體實施例中，另一治療劑係式II化合物。

在其他治療方法態樣中，本發明提供預防及/或治療易患或患有發炎性病狀之哺乳動物之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的本發明式I化合物或一或多種醫藥組合物。在特定實施例中，發炎性病狀係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘)及發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防發炎性病狀。在特定實施例中，發炎性病狀係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘)及發炎性腸病。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物用於製造，其用來治療或預防發炎性病狀之藥劑。在特定實施例中，發炎性病狀係選自類風濕性關節炎、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘)及發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。

在治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有過敏反應之哺乳動物之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，本發明提供治療或預防過敏性氣道疾病、鼻竇炎、濕疹及/或蕁麻疹、食物過敏或昆蟲毒素過敏之方法。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防過敏反應。在特定實施例中，本發明提供治療或預防過敏性氣道疾病、鼻竇炎、濕疹及/或蕁麻疹、食物過敏或昆蟲毒素過敏之方法。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於製造用來治療或預防過敏反應之藥劑。在特定實施例中，本發明提供治療或預防過敏性氣道疾病、鼻竇炎、濕疹及/或蕁麻疹、食物過敏或昆蟲毒素過敏之方法。

在其他治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有自體免疫疾病之哺乳動物之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，自體免疫疾病係選自類風濕性關節炎、COPD、氣喘、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、幼年型特發性關節炎及發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。在更特定實施例中，自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防自體免疫疾病。在特定實施例中，自體免疫疾病係選自類風濕性關節炎、COPD、氣喘、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、幼年型特發性關節炎及發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。在更特定實施例中，自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍

性結腸炎)。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於製造用來治療或預防自體免疫疾病之藥劑。在特定實施例中，自體免疫疾病係選自類風濕性關節炎、COPD、氣喘、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、牛皮癬性關節炎、關節黏連性脊椎炎、幼年型特發性關節炎及發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。在更特定實施例中，自體免疫疾病係全身性紅斑狼瘡。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎。在又一更特定實施例中，自體免疫疾病係發炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)。

在其他治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有增生性疾病之哺乳動物之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，增生性疾病係癌症(例如實體腫瘤，例如子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、皮膚T細胞淋巴瘤、乳癌、白血病(例如AML、ALL或CLL)、多發性骨髓瘤及/或牛皮癬。在更特定實施例中，增生性疾病係牛皮癬。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防增生性疾病。在特定實施例中，增生性疾病係癌症(例如實體腫瘤，例如子宮平滑肌肉瘤或前列腺癌)、皮膚T細胞淋巴瘤、乳癌、白血病(例如AML、ALL或CLL)、多發性骨髓瘤及/或牛皮癬。在更特定實施例中，增生性疾病係牛皮癬。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於製造用來治療或預防增生性疾病之藥劑。在特定實施例中，增生性疾病係癌症(例如實體腫瘤，例如子宮平滑

肌肉瘤或前列腺癌)、皮膚T細胞淋巴瘤、乳癌、白血病(例如AML、ALL或CLL)、多發性骨髓瘤及/或牛皮癬。在更特定實施例中，增生性疾病係牛皮癬。

在其他治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有移植排斥之哺乳動物之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，本發明提供治療或預防器官移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防移植排斥。在特定實施例中，本發明提供治療或預防器官移植排斥之方法。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於製造用來治療或預防移植排斥之藥劑。在特定實施例中，本發明提供治療或預防器官移植排斥之方法。

在治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有涉及軟骨代謝損傷之疾病之哺乳動物的方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防涉及軟骨代謝損傷之疾病。

本發明亦提供治療或預防先天性軟骨畸形之方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防先天性軟骨畸形。

在其他治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有與IL6分泌過多相關之疾病之哺乳動物的方法，該等方法包括投與治癒

有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，與IL6分泌過多相關之疾病係選自卡斯爾曼病及系膜增生性腎小球腎炎。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防與IL6分泌過多相關之疾病。在特定實施例中，與IL6分泌過多相關之疾病係選自卡斯爾曼病及系膜增生性腎小球腎炎。

在其他治療方法態樣中，本發明提供治療或預防易患或患有與干擾素分泌過多相關之疾病之哺乳動物的方法，該等方法包括投與治療有效量之本文所闡述用於治療或預防該病狀的一或多種醫藥組合物或本發明式I化合物。在特定實施例中，與干擾素分泌過多相關之疾病係選自全身性及皮膚性紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、休格倫氏症候群、牛皮癬及類風濕性關節炎。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物，其用於治療或預防與干擾素分泌過多相關之疾病。在特定實施例中，與干擾素分泌過多相關之疾病係選自全身性及皮膚性紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、皮肌炎、休格倫氏症候群、牛皮癬及類風濕性關節炎。

本發明方法之具體方案包括向患有涉及發炎之疾病、尤其類風濕性關節炎、骨關節炎、過敏性氣道疾病(例如氣喘)及/或發炎性腸病之個體投與治療有效量之本發明式I化合物足夠時間段以減輕個體之發炎程度，且較佳終止造成該發炎之過程。該方法之特定實施例包括向患有或易患類風濕性關節炎之個體患者投與治療有效量之本發明式I化合物足夠時間段以分別減輕或防止該患者關節中之發炎，且較佳地終止造成該發炎之過程。

本發明方法之另一具體方案包括向患有特徵在於軟骨或關節降

解之疾病或病狀(例如類風濕性關節炎及/或骨關節炎)的個體投與治療有效量之本發明式I化合物足夠時間段以減輕且較佳終止造成該降解之自身延續性過程。該方法之具體實施例包括向患有或易患骨關節炎之個體患者投與治療有效量之本發明式I化合物足夠時間段以分別減輕或防止該患者關節中之軟骨降解，且較佳終止造成該降解之自身延續性過程。在具體實施例中，該本發明式I化合物可展現軟骨合成代謝及/或抗分解代謝性質。

在一態樣中，本發明提供本發明式I化合物，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎，其中該化合物係以一至四(1-4)次常規劑量/天、且尤其一至三(1-3)次常規劑量/天、通常一至二(1-2)次常規劑量/天、且最通常一(1)次常規劑量/天來投與。

在另一態樣中，本發明提供本發明式I化合物，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎，其中該化合物係以兩週時段內一至十三(1-13)次常規劑量來投與。在特定實施例中，式I化合物係以兩週時段內一至十二(1-12)次、一至十(1-10)次或二至七(2-7)次常規劑量來投與。在特定實施例中，本發明式I化合物係基於每週一次投與。

在又一態樣中，本發明提供本發明式II化合物，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎，其中該化合物係以兩週時段內一至十三(1-13)次常規劑量來投與。在特定實施例中，式II化合物

係以兩週時段內一至十二(1-12)次、一至十(1-10)次或二至七(2-7)次常規劑量來投與。在特定實施例中，本發明式II化合物係基於每週一次投與。

在又一態樣中，本發明提供本發明式I化合物與本發明式II化合物之組合，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎，其中該化合物係以每天一至四(1-4)次常規劑量，且尤其每天一至三(1-3)次常規劑量，通常每天一至二(1-2)次常規劑量，且最通常每天一(1)次常規劑量來投與。

在又一態樣中，本發明提供本發明式I化合物與本發明式II化合物之組合，其用於預防及/或治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病，尤其類風濕性關節炎，其中該化合物係以兩週時段內一至十三(1-13)次常規劑量來投與。在特定實施例中，本發明式I化合物與本發明式II化合物之組合係以兩週時段內一至十二(1-12)次、一至十(1-10)次或二至七(2-7)次常規劑量來投與。在特定實施例中，本發明式I化合物與本發明式II化合物之組合係基於每週一次來投與。

注射劑量值介於約0.1 mg/kg/h至至少10 mg/kg/h之間，其皆係在約1 h至約120 h及尤其24 h至96 h內投與。亦可投與約0.1 mg/kg至約10 mg/kg或更高劑量之預裝載濃注，以達成適當穩態值。預計40 kg至80 kg人類患者之最大總劑量不超過約1 g/天。

為預防及/或治療長期病狀(例如退化性病狀)，治療方案通常延長至數月或數年，因此經口投藥對患者具有較佳便利性及耐受性。經口投藥時，代表性療程為每天一至四(1-4)次常規劑量，尤其每天一至

三(1-3)次常規劑量，通常每天一至二(1-2)次常規劑量，且最通常每天一(1)次常規劑量。另一選擇為，對於長效性藥物，經口投藥時，代表性療程為每隔一週一次、每週一次及每天一次。具體而言，劑量療程可係每1-14天一次，更尤其1-10天、甚至更尤其1-7天且最尤其1-3天一次。

使用該等投藥模式，各劑量提供約1-約1000 mg/kg本發明式I化合物，其中具體劑量各自提供約10-約500 mg且尤其約30-約250 mg/kg本發明式I化合物。

使用該等投藥模式，各劑量提供約1-約1000 mg/kg本發明化合物，其中具體劑量各自提供約10-約500 mg且尤其約30-約250 mg/kg本發明化合物。

通常選擇經皮投配以提供相似於或低於使用注射投配達成之血液含量。

當用於防止病狀發作時，通常可根據建議且在醫師監督下、以上文所闡述之劑量值向具有罹患該病狀風險之患者投與本發明式I化合物。具有罹患具體病狀風險之患者通常包含彼等具有該病狀之家族病史者或彼等已藉由基因測試或篩選確定尤其易於罹患該病狀者。

本發明式I化合物可作為單一活性藥劑投與或其可與其他治療劑組合投與，該等其他治療劑包含展現相同或相似治療活性之本發明其他化合物及已確定可安全且有效地進行該組合投與之其他化合物。在特定實施例中，兩種(或更多種)藥劑之共投與可顯著降低每種藥劑之欲使用劑量，由此減輕所見副效應。

在一實施例中，投與本發明式I化合物或包括本發明式I化合物之醫藥組合物作為藥劑。在特定實施例中，該醫藥組合物另外包括又一活性成份。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療

及/或預防涉及發炎之疾病；具體藥劑包含(但不限於)免疫調節劑(例如硫唑嘌呤(azathioprine))、皮質類固醇(例如潑尼松龍(prednisolone)或地塞米松(dexamethasone))、環磷醯胺、環孢素A、他克莫司(tacrolimus)、麥考酚酸嗎乙酯(Mycophenolate Mofetil)、莫羅單抗-CD3(muromonab-CD3, OKT3, 例如Orthocolone®)、ATG、阿司匹林(aspirin)、乙醯胺基酚、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)及匹洛西卡(piroxicam)。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防關節炎(例如類風濕性關節炎)；具體藥劑包含(但不限於)鎮痛藥、非類固醇消炎藥(NSAIDS)、類固醇、合成DMARDS(例如(但不限於)胺甲蝶呤(methotrexate)、來氟米特(leflunomide)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、金諾芬(auranofin)、金硫丁二鈉(sodium aurothiomalate)、青黴胺(penicillamine)、氫喹、羥基氫喹(hydroxychloroquine)、硫唑嘌呤、托法替尼(tofacitinib)、白瑞西替尼(baricitinib)、福他替尼(fostamatinib)及環孢素)及生物DMARDS(例如(但不限於)英夫利昔單抗(Infliximab)、依那西普(Etanercept)、阿達木單抗(Adalimumab)、利妥昔單抗(Rituximab)及阿巴他塞(Abatacept))。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防增生性病徵；具體藥劑包含(但不限於)：胺甲蝶呤、甲醯四氫葉酸(leukovorin)、多柔比星(adriamycin)、潑尼松(prednisone)、博萊黴素(bleomycin)、環磷醯胺、5-氟尿嘧啶、紫杉醇(paclitaxel)、多西他賽(docetaxel)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、多柔比星、他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、阿那曲唑(anastrozole)、戈舍瑞林(goserelin)、抗HER2單株抗體(例如Herceptin™)、卡培他濱(capecitabine)、鹽酸雷洛昔芬(raloxifene

hydrochloride)、EGFR抑制劑(例如Iressa[®]、Tarceva[™]、Erbix[™])、VEGF抑制劑(例如Avastin[™])、蛋白酶體抑制劑(例如Velcade[™])、Glivec[®]或hsp90抑制劑(例如17-AAG)。此外，可將本發明式I化合物與其他療法(包含(但不限於)放射療法或外科手術)組合投與。在特定實施例中，增生性病徵係選自癌症、骨髓增生病或白血病。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防自體免疫疾病；具體藥劑包含(但不限於)：糖皮質素、細胞生長抑制劑(例如嘌呤類似物)、烷基化藥劑(例如氮芥(環磷醯胺)、亞硝基脲、本發明之鉑化合物及其他)、抗代謝藥物(例如胺甲蝶呤、硫唑嘌呤及巯基嘌呤)、細胞毒性抗生素(例如放線菌素D蒽環類(dactinomycin anthracyclines)、絲裂黴素C(mitomycin C)、博萊黴素及光輝黴素(mithramycin))、抗體(例如抗CD20、抗CD25或抗CD3(OTK3)單株抗體，Atgam[®]及Thymoglobuline[®])、環孢素、他克莫司、雷帕黴素(rapamycin)(西羅莫斯(sirolimus))、干擾素(例如IFN- β)、TNF結合蛋白(例如英夫利昔單抗、依那昔普或阿達木單抗)、麥考酚酯(mycophenolate)、芬戈莫德(Fingolimod)及多球殼菌素(Myriocin)。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防移植排斥；具體藥劑包含(但不限於)：鈣調磷酸酶抑制劑(例如環孢素或他克莫司(FK506))、mTOR抑制劑(例如西羅莫斯、依維莫斯(everolimus))、抗增生藥物(例如硫唑嘌呤、麥考酚酸(mycophenolic acid))、皮質類固醇(例如潑尼松龍、氫化可體松(hydrocortisone))、抗體(例如單株抗IL-2R α 受體抗體、巴利昔單抗(basiliximab)、達克珠單抗(daclizumab))、多株抗T細胞抗體(例如抗胸腺細胞球蛋白(ATG)、抗淋巴細胞球蛋白(ALG))。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療

及/或預防氣喘及/或鼻炎及/或COPD，具體藥劑包含(但不限於)： β 2-腎上腺受體激動劑(例如沙丁胺醇(salbutamol)、左旋沙丁胺醇(levsalbutamol)、特布他林(terbutaline)及比托特羅(bitolterol))、腎上腺素(吸入式或錠劑)、抗膽鹼藥(例如異丙托溴銨)、糖皮質素(口服或吸入)、長效 β 2-激動劑(例如沙莫特羅(salmeterol)、福莫特羅(formoterol)、班布特羅(bambuterol)及持續釋放口服沙丁胺醇(albuterol))、吸入式類固醇及長效枝氣管擴張劑之組合(例如氟替卡松(fluticasone)/沙莫特羅、布地奈德(budesonide)/福莫特羅)、白三烯拮抗劑及合成抑制劑(例如孟魯斯特(montelukast)、紮魯斯特(zafirlukast)及齊留通(zileuton))、調介劑釋放抑制劑(例如色甘酸鹽及酮替芬(ketotifen))、IgE反應之生物調節劑(例如奧馬珠單抗(omalizumab))、抗組胺藥(例如西替利嗪(cetirizine)、桂利嗪(cinnarizine)、非索非那定(fexofenadine))及血管收縮劑(例如氧甲唑啉(oxymethazoline)、塞洛唑啉(xylomethazoline)、那法唑啉(nafazoline)及曲馬唑啉(tramazoline))。

此外，可組合投與本發明式I化合物與應急療法用於氣喘及/或COPD，該等療法包含氧或氫氧混合劑(heliox)投與、霧化沙丁胺醇或特布他林(視情況與抗膽鹼藥(例如異丙托銨)組合)、全身性類固醇(口服或靜脈內，例如潑尼松、潑尼松龍、甲潑尼龍(methylprednisolone)、地塞米松或氫化可體松)、靜脈內沙丁胺醇、非特異性 β -激動劑(注射或吸入，例如腎上腺素、異他林、異丙基腎上腺素、間羟異丙基腎上腺素)、抗膽鹼藥(靜脈內或霧化，例如格隆溴銨(glycopyrrolate)、阿托品(atropine)、異丙托銨)、甲基黃嘌呤(茶鹼、胺茶鹼、苄胺茶鹼)、具有枝氣管擴張效應之吸入麻醉劑(例如異氟烷、氟烷、恩氟烷)、氯胺酮及靜脈內硫酸鎂。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療

及/或預防發炎性腸病(IBD)，具體藥劑包含(但不限於)：改質疾病之合成糖皮質素(例如潑尼松、布地奈德)、免疫調節劑(例如胺甲蝶呤、來氟米特、柳氮磺吡啶、美沙拉秦(mesalazine)、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤及環孢素)及生物疾病改質、免疫調節劑(英夫利昔單抗、阿達木單抗、利妥昔單抗及阿巴他賽)。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防SLE，具體藥劑包含(但不限於)：改質疾病之抗風濕藥(DMARD)，例如抗瘡疾藥(例如氯奎寧(plaquenil)、羥氯喹)、免疫抑制劑(例如胺甲蝶呤及硫唑嘌呤)、環磷醯胺及麥考酚酸；免疫抑制藥及鎮痛藥，例如非類固醇消炎藥、鴉片劑(例如右旋丙氧芬(dextropropoxyphene)及複方可待因及撲熱息痛(co-codamol))、類鴉片(例如氫可酮(hydrocodone)、羥可酮(oxycodone)、美施康定(MS Contin)或美沙酮(methadone))及芬太尼(fentanyl, duragesic)經皮貼片。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防牛皮癬，具體藥劑包含(但不限於)：局部治療劑，例如含有以下物質之沐浴液、濕潤劑、醫用乳霜及軟膏：煤焦油、二羥基恩酚(dithranol) (地蒽酚(anthralin))、皮質類固醇(如去羥米松(desoximetasone) (Topicort™))、乙酸氟輕鬆(fluocinonide)、維生素D3類似物(例如卡泊三醇(calcipotriol))、Argan oil and 類視色素(阿維A酯(etretinate)、阿維A酸(acitretin)、他紮羅汀(tazarotene))；全身性治療劑，例如胺甲蝶呤、環孢素、類視色素、硫鳥嘌呤、羥基脲、柳氮磺吡啶、麥考酚酸嗎乙酯、硫唑嘌呤、他克莫司、富馬酸酯或生物製劑，例如Amevive™、Enbrel™、Humira™、Remicade™、Raptiva™及優特克單抗(ustekinumab，IL-12及IL-23阻斷劑)。此外，可將本發明式I化合物與其他療法組合投與，該等療法包含(但不限於)：光療法

或光化學療法(例如補骨脂素及紫外線A光療法(PUVA))。

在一實施例中，將本發明式I化合物與另一治療劑共投與以治療及/或預防過敏反應，具體藥劑包含(但不限於)：抗組胺藥(例如西替利嗪、苯海拉明(diphenhydramine)、非索非那定、左西替立嗪(levocetirizine))、糖皮質素(例如潑尼松、倍他米松(betamethasone)、倍氯米松(beclomethasone)、地塞米松)、腎上腺素、茶鹼或抗白三烯素(例如孟魯斯特或紮魯斯特)、抗膽鹼藥及去充血劑。

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

在一實施例中，本發明提供包括本發明式I化合物之醫藥組合物及式II化合物，其中本發明式I化合物/式II化合物之比率係1/5至1/20。在具體實施例中，該比率係1/5至1/10。

一般合成程序

概述

本發明式I化合物可使用下列一般方法及程序自容易獲得之起始材料來製備。應瞭解，其中給出典型或較佳製程條件(即反應溫度、時間、反應物之莫耳比、溶劑、壓力等)；除非另有說明，否則亦可使用其他製程條件。最佳反應條件可隨所使用之具體反應物或溶劑變化，但熟習此項技術者可藉由常規優化程序來確定該等條件。

此外，如熟習此項技術者將明瞭，可能需要習用保護基團來防止某些官能基發生不期望反應。用於具體官能基之適宜保護基團以及用於保護及去保護之適宜條件之選擇已為業內所熟知。例如，在T. W. Greene及P. G. M. Wuts之Protecting Groups in Organic Synthesis，第二版，Wiley, New York, 1991及本文所列舉之參考文獻中闡述多種

保護基團及其引入及去除。

詳細呈現下列方法以製備如上文所定義之本發明式I化合物及比較實例。本發明式I化合物可由熟習有機合成技術者自己知或市售起始材料及反應物製備。

除非另有說明，否則所有試劑皆係商業級且未經進一步純化即以接受狀態使用。使用市售無水溶劑在惰性氣氛下實施反應。除非另有說明，否則在所有其他情形下皆使用試劑級溶劑。在矽膠60 (35-70 μm)上實施管柱層析。使用預塗覆之矽膠F-254板(厚度為0.25 mm)實施薄層層析。在Bruker DPX 400 NMR光譜儀(400 MHz)上記錄 ^1H NMR光譜。 ^1H NMR光譜之化學位移(δ)係相對於作為內標之四甲基矽烷(δ 0.00)或適當殘餘溶劑峰(即 CHCl_3 (δ 7.27))以百萬份數(ppm)來報告。多重性以單峰(s)、二重峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)、多重峰(m)及寬峰(br)給出。偶合常數(J)係以Hz給出。在Micromass平臺LC/MS光譜儀上獲得電噴霧MS光譜。LCMS分析所使用之管柱：Hichrom，Kromasil Eternity，2.5 μm C_{18} ，150 $\times$ 4.6 mm，Waters Xbridge 5 μm C_{18} (2)，250 $\times$ 4.6 mm (參考編號為86003117)；Waters Xterra MS 5 μm C_{18} ，100 $\times$ 4.6 mm (Plus guard柱) (參考編號為186000486)；Gemini-NX 3 μm C_{18} 100 $\times$ 3.0 mm (參考編號為00D-4453-Y0)；Phenomenex Luna 5 μm C_{18} (2)，100 $\times$ 4.6 mm。(Plus guard柱) (參考編號為00D-4252-E0)；Kinetix fused core 2.7 μm C_{18} 100 $\times$ 4.6 mm (參考編號為00D-4462-E0)；Supelco，Ascentis® Express C_{18} (參考編號為53829-U)；或Hichrom Halo C_{18} ，2.7 μm C_{18} ，150 $\times$ 4.6 mm (參考編號為92814-702)。在偶合至HPLC Waters 2795 (配備有UV檢測器Waters 2996)之Waters Micromass ZQ上記錄LC-MS。亦在偶合至UV檢測器Agilent G1315A之HPLC Agilent 1100上運行LC。製備型HPLC：Waters XBridge Prep C_{18} 5 μm ODB 19 mm ID $\times$ 100 mm L(部件號

186002978)。所有方法皆使用MeCN/H₂O梯度。H₂O含有0.1% TFA或0.1% NH₃。

實驗部分中所使用之縮寫的列表：

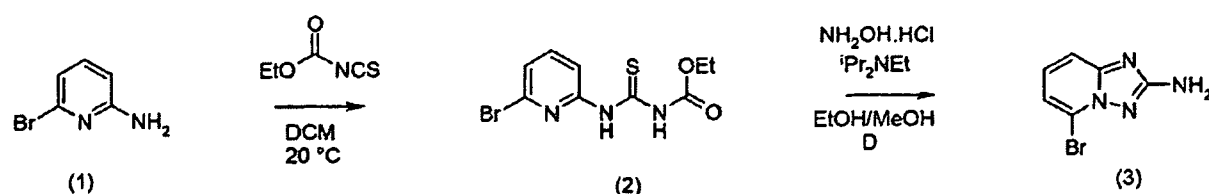
AUC	曲線下面積	mL	毫升
APC	腺瘤性結腸息肉病	μL	微升
DCM	二氯甲烷	g	克
DiPEA	N,N-二異丙基乙胺	mg	毫克
MeCN	乙腈	PdCl ₂ dppf	[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈣(II)
DMF	N,N-二甲基甲醯胺	MMP	基質金屬蛋白酶
Cat.	催化量	RNA	核糖核酸
TFA	三氟乙酸	APMA	乙酸4-胺基苯基汞
THF	四氫呋喃	FBS	胎牛血清
NMR	核磁共振	cDNA	複製去氧核糖核酸
DMSO	二甲基亞砷	h	小時
LC-MS	液相層析-質譜	FITC	異硫氰酸螢光素
ppm	百萬份數	mmol	毫莫耳
EtOAc	乙酸乙酯	QD	每天一次(一次/天投配)
Rt	滯留時間	BID	每天兩次(兩次/天)
s	單峰	Rel.	相對
br s	寬單峰	HPLC	高壓液相層析
m	多重峰		
min	分鐘		

本發明化合物之合成製備

實例1. 化合物之合成

1.1. 途徑1

1.1.1. 5-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(中間體3)之合成



1.1.1.1. 1-(6-溴-吡啶-2-基)-3-乙氧羰基-硫脲(2)

經15 min向冷卻至5℃之2-氨基-6-溴吡啶(1) (253.8 g, 1.467 mol)存於DCM (2.5 L)中之溶液逐滴添加異硫氰酸乙氧基羰基酯(173.0 mL, 1.467 mol)。然後使反應混合物升溫至室溫(20℃)且攪拌16 h。在真空中蒸發藉由過濾收集之固體，用汽油(3×600 mL)徹底洗滌且空氣乾燥以提供(2)。硫脲未經任何純化即以原樣用於下一步驟中。

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 12.03 (1H, br s, NH), 8.81 (1H, d, J 7.8 Hz, H-3), 8.15 (1H, br s, NH), 7.60 (1H, t, J 8.0 Hz, H-4), 7.32 (1H, dd, J 7.7及0.6 Hz, H-5), 4.31 (2H, q, J 7.1 Hz, CH_2), 1.35 (3H, t, J 7.1 Hz, CH_3)。

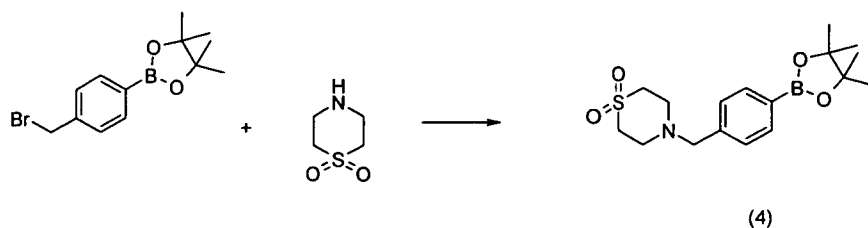
1.1.1.2. 5-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(3)

向羥基胺鹽酸鹽(101.8 g, 1.465 mol)存於EtOH/MeOH (1:1, 900 mL)中之懸浮液添加 N,N -二異丙基乙胺(145.3 mL, 0.879 mol)且在室溫下(20℃)將混合物攪拌1 h。然後添加1-(6-溴-吡啶-2-基)-3-乙氧羰基-硫脲(2) (89.0 g, 0.293 mol)且將混合物緩慢加熱至回流(注意：需要漂白氯器來驟冷所形成之 H_2S)。在回流下保持3 h後，冷卻混合物且過濾以收集所沈澱固體。藉由在真空中蒸發濾液、添加 H_2O (250 mL)並過濾來收集其他產物。相繼用 H_2O (250 mL)、EtOH/MeOH (1:1, 250 mL)及 Et_2O (250 mL)洗滌合併之固體，然後在真空中乾燥以提供固體狀三唑并吡啶衍生物(3)。該化合物未經任何純化即以原樣用於下一步驟中。

^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.43-7.34 (2H, m, 2 × 芳香族-H), 7.24 (1H, dd, J 6.8及1.8 Hz, 芳香族-H), 6.30 (2H, br, NH_2); m/z 5

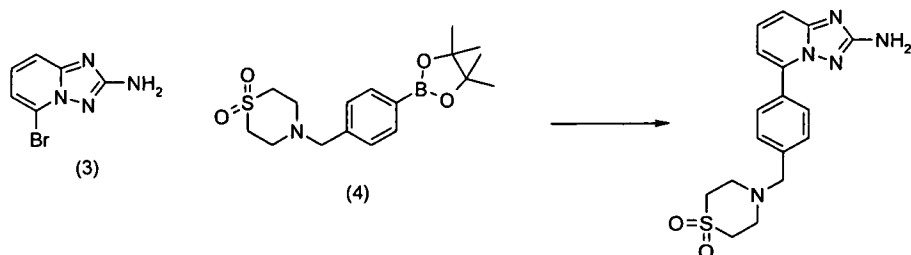
213/215 (1:1, M+H⁺, 100%)。

1.1.2. 4-[4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼啉-2-基)-苄基]-硫嗎啉-1,1-二氧化物(中間體4)之合成



在N₂下將2-(4-溴甲基-苯基)-4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼啉(1當量)及DIPEA (2當量)溶解於DCM/MeOH (5:1 v:v)中且逐份添加硫嗎啉1,1-二氧化物(2當量)。在室溫下將所得溶液攪拌16 h。此後反應完成。蒸發溶劑。用EtOAc及水萃取化合物，用鹽水洗滌且經無水MgSO₄乾燥。過濾且蒸發有機層。未經進一步純化即分離出最終化合物。

1.1.3. 5-[4-(1,1-二側氧基硫嗎啉-4-基甲基)-苯基]-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(式I)之合成



將4-[4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼啉-2-基)-苄基]-硫嗎啉-1,1-二氧化物(1.1當量)添加至5-溴-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺之溶液(4:1)中。將K₂CO₃ (2當量)及PdCl₂dppf (0.03當量)添加至該溶液中。然後在油浴下在90℃下在N₂下將所得混合物加熱16 h。添加水且用乙酸乙酯萃取溶液。經無水MgSO₄乾燥有機層且在真空中蒸發。藉由急驟層析純化後獲得最終化合物。

¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94-7.92 (d, 2H), 7.52-7.48 (m, 3H), 7.37-7.34 (m, 1H), 7.02-7.00 (m, 1H), 6.00 (d, 2H), 3.76 (d, 2H), 3.15-3.13

(m, 4H), 2.93-2.91 (m, 4H)。

m/z 358.2 ($M+H^+$, 100%)。

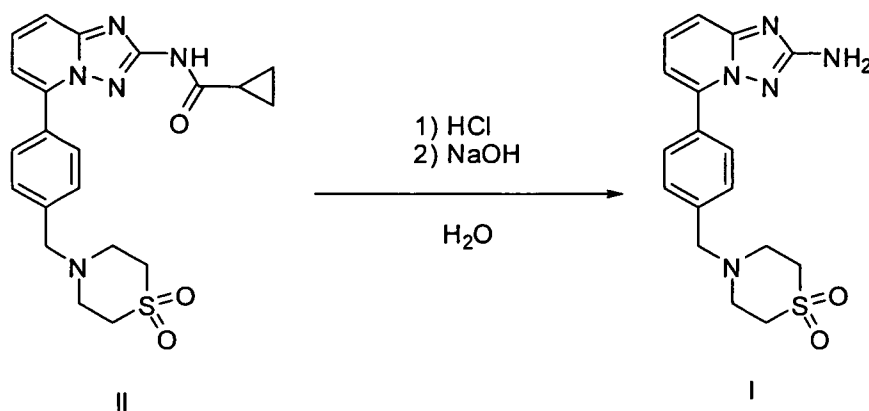
1.2. 途徑2

1.2.1. 環丙烷甲酸{5-[4-(1,1-二側氧基-硫嗎啉-4-基甲基)-苯基]-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基}-醯胺(式II)

式II化合物可根據WO 2010/149769中所闡述之程序來合成。

1.2.2. 5-[4-(1,1-二側氧基硫嗎啉-4-基甲基)-苯基]-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-2-基胺(式I)之合成

式I化合物亦可藉由水解式II化合物來產生：



將30%鹽酸水溶液(12.06 kg; 3.9相對體積)添加至式II化合物(3.45 kg; 1.0當量)存於去礦物質水(10.0 kg; 3.0相對體積)中之漿液。隨後，用去礦物質水(3.4 kg; 1.0相對體積)實施線沖洗。將反應混合物於80°C±5°C下加熱14.5 h。反應完成後(轉化率 ≥ 99%)，將反應混合物冷卻至20°C±5°C。用去礦物質水(6.8 kg; 2.0相對體積)稀釋反應混合物且以使反應器內容物之溫度保持在35°C以下之速率投配33%氫氧化鈉水溶液(9.52 kg; 3.7相對體積)。需要額外量的33%氫氧化鈉水溶液(2.55 kg; 1.0相對體積)以使pH ≥ 10。過濾產物，用去礦物質水(1.5相對體積)洗滌兩次且在真空下乾燥1 h，由此產生粗式I化合物。

將粗式I化合物(5.70 kg)於去礦物質水(23.0 kg; 8.5相對體積)中再製成漿液。添加30%鹽酸水溶液(1.65 kg; 0.7相對體積)及去礦物質水

(4.3 kg; 1.6相對體積)且在 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下將反應混合物攪拌45 min。因式I化合物未完全溶解，故在 $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下將反應混合物攪拌1 h。過濾反應混合物且用去礦物質水(2.0 kg; 0.75相對體積)洗滌殘餘物。將33%氫氧化鈉水溶液(1.12 kg; 0.6相對體積)添加至濾液中。需要額外量的33%氫氧化鈉水溶液(1.01 kg)以使 $\text{pH} \geq 10$ 。在 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下將所得反應混合物攪拌約3 h。過濾產物，用去礦物質水(4.1 kg; 1.5相對體積)洗滌兩次，且用甲基第三丁基醚(MTBE; 3.0 kg; 1.5相對體積)洗滌兩次，並在真空下在濾器上乾燥15.5 h。進一步在 $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下在真空爐中將產物乾燥202 h，由此提供期望式I化合物。

生物學實例

實例2. 活體外分析

2.1. JAK1抑制分析

2.1.1. polyGT受質之JAK1分析

自Invitrogen購得重組人類JAK1催化結構域(胺基酸866-1154；目錄編號為PV4774)。在聚丙烯96-孔板(Greiner，V形底)中在總體積為25 μL 且有或沒有5 μL 測試化合物或媒劑(DMSO，1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(15 mM Hepes pH 7.5、0.01% Tween20、10 mM MgCl_2 、2 μM 非放射性ATP、0.25 μCi ^{33}P - γ -ATP(Perkin Elmer，目錄編號為NEG602K001MC)，最終濃度)中，將25 ng JAK1與6.25 μg polyGT受質(Sigma，目錄編號為P0275)一起培育。在 30°C 下保持75 min後，藉由添加25 μL /孔150 mM磷酸終止反應。使用細胞收穫器(Perkin Elmer)將所有終止之激酶反應物轉移至預洗滌(75 mM磷酸)之96孔過濾板(Perkin Elmer，目錄編號為6005177)上。使用300 μL /孔之75 mM磷酸溶液將板洗滌6次並將板底部密封。添加40 μL /孔之Microscint-20，將板頂部密封並使用Topcount (Perkin Elmer)讀取。由在媒劑存在下獲得之每分鐘計數(cpm)減去在陽性對照抑制劑(10 μM

- 星形孢菌素)存在下獲得之cpm，計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力：

抑制百分比=((含有本發明測試化合物之試樣測定之cpm - 含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm)/(在媒劑存在下測定之cpm - 含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm))* 100。

製備化合物之連續劑量稀釋液，以便在JAK1分析中測試劑量反應效應並計算化合物之IC₅₀。在20 μM之濃度下、隨後以1/3連續稀釋，在8個濃度點(20 μM- 6.67 μM- 2.22 μM- 740 nM- 247 nM- 82 nM- 27 nM- 9 nM)下測試化合物，其中DMSO之最終濃度為1%。當化合物效能增加時，製備更高稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 μM、1 μM)。

根據上文所闡述之分析法測定式I化合物針對JAK1之活性，由此返回460.1 nM、586 nM、494.3 nM、758.2 nM及432.7 nM (平均值為546.26 nM)之IC₅₀值。

2.1.2. JAK1 Ulight-JAK1肽分析

自Invitrogen購得重組人類JAK1 (催化結構域，胺基酸866-1154；目錄編號為PV4774)。在白色384 Opti板(Perkin Elmer，目錄編號為6007290)中在總體積為20 μL且有或沒有4 μL測試化合物或媒劑(DMSO，1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(15 mM MOPS pH 6.8、0.01% Brij-35、5 mM MgCl₂、2 mM DTT、7 μM ATP)中將1 ng JAK1與20 nM Ulight-JAK1 (tyr1023)肽(Perkin Elmer，目錄編號為TRF0121)一起培育。在室溫下保持60 min之後，藉由添加20 μL/孔之檢測混合物(1×檢測緩衝液(Perkin Elmer，目錄編號為CR97-100C)、0.5 nM鎘-抗磷酸酪胺酸(PT66) (Perkin Elmer，目錄編號為AD0068)、10 mM EDTA)來終止反應。使用Envision (在320 nm下激發且在615 nm下量測發射，Perkin Elmer)實施讀取。藉由使用在媒劑存在下獲得

之相對螢光單位(RFU)減去在陽性對照抑制劑(10 μ M星形孢菌素)存在下獲得之RFU來計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力：

抑制百分比=((使用含有本發明測試化合物之試樣測定之RFU - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之RFU)/(在媒劑存在下測定之RFU- 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之RFU))* 100。

製備化合物之劑量稀釋系列以能夠在JAK1分析中測試劑量反應效應並計算化合物之IC₅₀。在20 μ M之濃度下、隨後以1/5連續稀釋在10個濃度點下以常規方式測試化合物，其中DMSO之最終濃度為1%。當化合物效能增加時，製備更多稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 μ M、1 μ M)。數據表示為分析之平均IC₅₀ $\pm$ 平均值之標準誤差。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對JAK1之活性，由此返回346.8 nM、714.3 nM、166.6 nM、103.3 nM、187.2 nM、582.3 nM、295.3 nM、241.7 nM、159.2 nM、355.3 nM及221.6 nM (平均值 = 307 nM)之IC₅₀值。

2.1.3. JAK1 Ki測定分析

對於Ki測定而言，將不同量之化合物與酶混合且隨後隨著ATP濃度變化發生酶反應。藉助Km對化合物濃度之雙倒數繪圖(Lineweaver-Burk曲線)來測定Ki。在分析中使用1 ng JAK1 (Invitrogen, PV4774)。受質為20 nM Ulight-JAK-1 (Tyr1023)肽(Perkin Elmer, TRF0121)。使用不同濃度之ATP及化合物在15 mM MOPS pH 6.8、0.01% Brij-35、2 mM DTT、5 mM MgCl₂中實施反應。使用如1.1.2中所闡述之鎔標記之抗磷酸酪胺酸抗體PT66 (Perkin Elmer, AD0068)量測磷酸化受質。在envision (Perkin Elmer，在320 nm下激發且在615 nm及665 nm下發射)上實施讀取。

2.2. JAK2抑制分析

2.2.1. *polyGT*受質之JAK2分析

自Invitrogen購得重組人類JAK2催化結構域(胺基酸808-1132；目錄編號為PV4210)。在聚丙烯96-孔板(Greiner，V形底)中在總體積為25 μ L且有或沒有5 μ L測試化合物或媒劑(DMSO，1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(10 mM MOPS pH 7.5、0.5 mM EDTA、0.01% Brij-35、1mM DTT、15 mM MgAc、1 μ M非放射性ATP、0.25 μ Ci ^{33} P- γ -ATP (Perkin Elmer，目錄編號為NEG602K001MC)，最終濃度)中，將0.05 mU JAK2與2.5 μ g *polyGT*受質(Sigma，目錄編號為P0275)一起培育。在30°C下保持90 min後，藉由添加25 μ L/孔150 mM磷酸終止反應。使用細胞收穫器(Perkin Elmer)將所有終止之激酶反應物轉移至預洗滌(75 mM磷酸)之96孔過濾板(Perkin Elmer，目錄編號為6005177)上。使用300 μ L/孔之75 mM磷酸溶液將板洗滌6次並將板底部密封。添加40 μ L/孔之Microscint-20，將板頂部密封並使用Topcount (Perkin Elmer)實施讀取。藉由使用在媒劑存在下獲得之每分鐘計數(cpm)減去在陽性對照抑制劑(10 μ M星形孢菌素)存在下獲得之cpm來計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力：

抑制百分比=((使用含有本發明測試化合物之試樣測定之cpm - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm)/(在媒劑存在下測定之cpm - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm))* 100。

製備化合物之劑量稀釋系列以在JAK2分析中測試劑量反應效應並計算各化合物之IC₅₀。在20 μ M之濃度下、隨後以1/3連續稀釋在8個濃度點(20 μ M- 6.67 μ M- 2.22 μ M- 740 nM- 247 nM- 82 nM- 27 nM- 9 nM)下測試化合物，其中DMSO之最終濃度為1%。當化合物系列之效能增加時，製備更多稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 μ M、1 μ M)。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對JAK1之活性，由此返

回566.9 nM、365.5 nM、256.4 nM、915.1 nM及1017 nM (平均值爲624 nM)之IC₅₀值。

2.2.2. JAK2 Ulight-JAK1肽分析

自Invitrogen購得重組人類JAK2 (催化結構域, 胺基酸866-1154; 目錄編號爲PV4210)。在白色384 Opti板(Perkin Elmer, 目錄編號爲6007290)中在總體積爲20 µL且有或沒有4 µL測試化合物或媒劑(DMSO, 1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(25 mM HEPES pH 7.0、0.01% Triton X-100、7.5 mM MgCl₂、2 mM DTT、7.5 µM ATP)中將0.0125 mU JAK2與25 nM Ulight-JAK1(tyr1023)肽(Perkin Elmer, 目錄編號爲TRF0121)一起培育。在室溫下保持60 min之後, 藉由添加20 µL/孔之檢測混合物(1 ×檢測緩衝液(Perkin Elmer, 目錄編號爲CR97-100C)、0.5 nM鎘-抗磷酸酪胺酸(PT66) (Perkin Elmer, 目錄編號爲AD0068)、10 mM EDTA)來終止反應。使用Envision (在320 nm下激發且在615 nm下量測發射, Perkin Elmer)實施讀取。藉由使用在媒劑存在下獲得之相對螢光單位(RFU)減去在陽性對照抑制劑(10 µM星形孢菌素)存在下獲得之RFU來計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力:

抑制百分比=((使用含有本發明測試化合物之試樣測定之RFU - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之RFU)/(在媒劑存在下測定之RFU- 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之RFU))* 100。

製備化合物之劑量稀釋系列以能夠在JAK2分析中測試劑量反應效應並計算化合物之IC₅₀。在20 µM之濃度下、隨後以1/5連續稀釋在10個濃度點下測試化合物, 其中DMSO之最終濃度爲1%。當化合物效能增加時, 製備更多稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 µM、1 µM)。數據表示爲分析之平均IC₅₀ ± 平均值之標準誤差。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對JAK2之活性, 由此返

回 1031 nM、351.2 nM、137.5 nM、367.2 nM、310.2 nM、729.2 nM、151.7 nM、203.0 nM、168.0 nM及517.0 nM (平均值 = 397 nM) 之IC₅₀值。

2.2.3. JAK2 Kd/Ki測定分析

2.2.3.1. JAK2 Ki測定分析

對於Ki測定而言，將不同量之化合物與酶混合且隨後隨著ATP濃度變化發生酶反應。藉助Km對化合物濃度之雙倒數繪圖(Lineweaver-Burk曲線)來測定Ki。在分析中使用0.0125 mU JAK1 (Invitrogen, PV4210)。受質為25 nM Ulight-JAK-1 (Tyr1023)肽(Perkin Elmer, TRF0121)。使用不同濃度之ATP及化合物在25 mM HEPES pH 7.0、0.01% Triton X-100、7.5 mM MgCl₂、2 mM DTT中實施反應。使用如1.2.2中所闡述之鎘標記之抗磷酸酪胺酸抗體PT66 (Perkin Elmer, AD0068)量測磷酸化受質。在envision (Perkin Elmer，在320 nm下激發且在615 nm及665 nm下發射)上實施讀取。

2.2.3.2. JAK2 Kd測定分析

使用最終濃度為2.5 nM之JAK2 (Invitrogen, PV4210)。使用25 nM 激酶示蹤劑236 (Invitrogen, PV5592)及2 nM鎘-抗GST (Invitrogen, PV5594)在不同化合物濃度下於50 mM Hepes pH 7.5、0.01% Brij-35、10 mM MgCl₂、1 mM EGTA中實施結合實驗。根據製造商之程序來檢測示蹤劑。

2.2.4. JAK3抑制分析

自Carna Biosciences購得重組人類JAK3催化結構域(胺基酸795-1124；目錄編號為08-046)。在聚丙稀96-孔板(Greiner，V形底)中在總體積為25 μ L且有或沒有5 μ L測試化合物或媒劑(DMSO，1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(25 mM Tris pH 7.5、0.5 mM EGTA、10 mM MgCl₂、2.5 mM DTT、0.5 mM Na₃VO₄、5 mM b-甘油磷酸酯、0.01%

Triton X-100、1 μ M 非放射性 ATP、0.25 μ Ci ^{33} P- γ -ATP (Perkin Elmer, 目錄編號為NEG602K001MC), 最終濃度)中, 將0.5 ng JAK3 蛋白與2.5 μ g polyGT受質(Sigma, 目錄編號為P0275)一起培育。在30°C下保持45 min後, 藉由添加25 μ L/孔150 mM磷酸終止反應。使用細胞收穫器(Perkin Elmer)將所有終止之激酶反應物轉移至預洗滌(75 mM磷酸)之96孔過濾板(Perkin Elmer, 目錄編號為6005177)上。使用300 μ L/孔之75 mM磷酸溶液將板洗滌6次並將板底部密封。添加40 μ L/孔之Microscint-20, 將板頂部密封並使用Topcount (Perkin Elmer)實施讀取。藉由使用在媒劑存在下獲得之每分鐘計數(cpm)減去在陽性對照抑制劑(10 μ M星形孢菌素)存在下獲得之cpm來計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力:

抑制百分比=((使用含有本發明測試化合物之試樣測定之cpm - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm)/(在媒劑存在下測定之cpm - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm))* 100。

製備化合物之劑量稀釋系列以能夠在JAK3分析中測試劑量反應效應並計算化合物之 IC_{50} 。在20 μ M之濃度下、隨後以1/5連續稀釋在10個濃度點下測試化合物, 其中DMSO之最終濃度為1%。當化合物增加時, 製備更多稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 μ M、1 μ M)。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對JAK3之活性, 由此返回2497 nM、>4000 nM、>4000 nM、>3333 nM、>3333 nM、3939 nM、>4000 nM、>4000 nM、>4000 nM、3201 nM及3368 nM (平均值= 3606 nM)之 IC_{50} 值。

2.2.5. JAK3 K_i 測定分析

對於 K_i 測定而言, 將不同量之化合物與酶混合且隨後隨著ATP濃度變化發生酶反應。藉助 K_m 對化合物濃度之雙倒數繪圖(Lineweaver-Burk 曲線)來測定 K_i 。使用最終濃度為20 ng/ml之JAK3 (Carna

Biosciences, 08-046)。受質為Poly(Glu,Tyr)鈉鹽(4:1) (MW 20 000- 50 000, Sigma, P0275)。使用不同濃度之ATP及化合物在25 mM Tris pH 7.5、0.01% Triton X-100、0.5 mM EGTA、2.5 mM DTT、0.5 mM Na_3VO_4 、5 mM b-甘油磷酸酯、10 mM MgCl_2 中實施反應並藉由添加150 mM磷酸終止反應。藉由將試樣裝載於過濾板(使用收穫器, Perkin Elmer)上且隨後進行洗滌來量測納入受質polyGT中之磷酸鹽。在向過濾板(Perkin Elmer)中添加閃爍液體之後, 在Topcount閃爍計數器中量測納入polyGT中之 ^{33}P 。

2.3. TYK2抑制分析

自Carna biosciences購得重組人類TYK2催化結構域(胺基酸871-1187; 目錄編號為08-147)。在聚丙烯96-孔板(Greiner, V形底)中在總體積為25 μL 且有或沒有5 μL 測試化合物或媒劑(DMSO, 1%最終濃度)之激酶反應緩衝液(25 mM Hepes pH 7.2、50 mM NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM MnCl_2 、10 mM MgCl_2 、0.1% Brij-35、0.1 μM 非放射性ATP、0.125 μCi ^{33}P - γ -ATP (Perkin Elmer, 目錄編號為NEG602K001MC), 最終濃度)中, 將4 ng TYK2與12.5 μg polyGT受質(Sigma, 目錄編號為P0275)一起培育。在30°C下保持90 min後, 藉由添加25 μL /孔150 mM磷酸終止反應。使用細胞收穫器(Perkin Elmer)將所有終止之激酶反應物轉移至預洗滌(75 mM磷酸)之96孔過濾板(Perkin Elmer, 目錄編號為6005177)上。使用300 μL /孔之75 mM磷酸溶液將板洗滌6次並將板底部密封。添加40 μL /孔之Microscint-20, 將板頂部密封並使用Topcount (Perkin Elmer)實施讀取。藉由使用在媒劑存在下獲得之每分鐘計數(cpm)減去在陽性對照抑制劑(10 μM 星形孢菌素)存在下獲得之cpm來計算激酶活性。如下測定測試化合物抑制此活性之能力:

抑制百分比=((使用含有本發明測試化合物之試樣測定之cpm s

使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm)/(在媒劑存在下測定之cpm - 使用含有陽性對照抑制劑之試樣測定之cpm))* 100。

製備化合物之劑量稀釋系列以在TYK2分析中測試劑量反應效應並計算各化合物之IC₅₀。在20 μM之濃度下、隨後以1/3連續稀釋在8個濃度點(20 μM- 6.67 μM- 2.22 μM- 740 nM- 247 nM- 82 nM- 27 nM- 9 nM)下測試各化合物，其中DMSO之最終濃度為1%。當化合物系列之效能增加時，製備更多稀釋度及/或降低最大濃度(例如5 μM、1 μM)。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對TYK2之活性，由此返回>3333 nM、>3333 nM、>3333 nM、1973 nM、2121 nM、3852 nM、3819 nM及2207 nM (平均值>2996 nM)之IC₅₀值。

2.3.1. TYK2 K_d/K_i測定分析

2.3.1.1. TYK2 K_i測定分析

對於K_i測定而言，將不同量之化合物與酶混合且隨後隨著ATP濃度變化發生酶反應。藉助K_m對化合物濃度之雙倒數繪圖(Lineweaver-Burk曲線)來測定K_i。使用最終濃度為160 ng/ml之TYK2 (Carna Biosciences, 08-147)。受質為Poly(Glu,Tyr)鈉鹽(4:1) (MW 20 000-50 000, Sigma, P0275)。使用不同濃度之ATP及化合物在25 mM Hepes pH 7.2、50 mM NaCl、0.5 mM EDTA、1 mM DTT、5 mM MnCl₂、10 mM MgCl₂、0.1% Brij-35中實施反應並藉由添加150 mM磷酸終止反應。藉由將試樣裝載於過濾板(使用收穫器, Perkin Elmer)上且隨後進行洗滌來量測納入受質polyGT中之磷酸鹽。在向過濾板(Perkin Elmer)中添加閃爍液體之後，在Topcount閃爍計數器中量測納入polyGT中之³³P。

2.3.1.2. TYK2 K_d測定分析

使用最終濃度為50 nM之TYK2 (Carna Biosciences, 08-147)。使

- 用 15 nM 激酶示蹤劑 236 (Invitrogen, PV5592) 及 10 nM 鎘 - 抗 GST (Invitrogen, PV5594) 在不同化合物濃度下於 50 mM Hepes pH 7.5、0.01% Brij-35、10 mM MgCl₂、1 mM EGTA 中實施結合實驗。根據製造商之程序來檢測示蹤劑。

實例3. 細胞分析：

3.1. JAK-STAT 信號傳導分析：

將 HeLa 細胞維持於含有 10% 熱滅活胎牛血清、100 U/mL 青黴素 (penicillin) 及 100 µg/mL 鏈黴素 (streptomycin) 之達爾伯克氏改良伊格爾培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 中。在 70% 鋪滿下將 HeLa 細胞用於轉染。在 96-孔板模式中，使用 0.32 µL/孔之 Jet-PEI (Polyplus) 作為轉染試劑以 40 ng pSTAT1(2)-螢光素酶報告子 (Panomics)、8 ng LacZ 報告子 (作為內部對照報告子) 及 52 ng pBSK 對 87 µL 細胞培養基中之 20,000 個細胞實施瞬時轉染。在 37°C、5% CO₂ 下培育過夜後，去除轉染培養基。添加 81 µL DMEM + 1.5% 熱滅活胎牛血清。經 60 min 添加 9 µL 10× 濃度之化合物，且然後添加 10 µL 最終濃度為 33 ng/mL 之人類 OSM (Peprotech)。

自 20 µM 開始、之後以 1/3 連續稀釋、總共 8 個劑量 (20 µM- 6.6 µM- 2.2 µM- 740 nM- 250 nM- 82 nM- 27 nM- 9 nM) 以一式兩份測試化合物，其中 DMSO 之最終濃度為 0.2%。

在 37°C、5% CO₂ 下培育過夜後，藉由添加 100 µL 溶解緩衝液/孔 (PBS、0.9 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、10% 海藻糖、0.05% Tergitol NP9、0.3% BSA) 來裂解細胞。

藉由經 20 min 添加 180 µL β-Gal 溶液 (30 µL ONPG 4 mg/mL + 150 µL β-半乳糖苷酶緩衝液 (0.06 M Na₂HPO₄、0.04 M NaH₂PO₄、1 mM MgCl₂)) 使用 40 µL 細胞溶解物來讀取 β-半乳糖苷酶活性。藉由添加 50 µL 1 M Na₂CO₃ 來終止反應。在 405 nm 下讀取吸光度。

如製造商(Perkin Elmer)所闡述，使用40 μ L細胞溶解物加上40 μ L Steadylite®在Envision (Perkin Elmer)上量測螢光素酶活性。

使用沒有OSM之情況作為陽性對照(100%抑制)。使用0.5% DMSO作為陰性對照(0%抑制)。使用陽性及陰性對照計算 z' 及「抑制百分數」(PIN)值。

抑制百分比=((在媒劑存在下測定之螢光度 - 使用含有本發明測試化合物之試樣測定之螢光度)/(在媒劑存在下測定之螢光度 - 使用無觸發劑之試樣測定之螢光度))* 100。

繪製劑量反應中所測試化合物的PIN值並推導出 EC_{50} 值。

根據上文所闡述之分析測定式I化合物針對JAK-STAT之活性，由此返回無活性、>6670 nM、>6670 nM、8943 nM (平均值>7427 nM)之 IC_{50} 值。

3.2. OSM/IL-1 β 信號傳導分析

顯示OSM及IL-1 β 協同上調人類軟骨肉瘤細胞系SW1353中之MMP13含量。在96孔板中以15,000個細胞/孔將細胞接種於含有10% (v/v) FBS及1%青黴素/鏈黴素(InVitrogen)之120 μ L體積的DMEM (Invitrogen)中，且在37°C、5% CO₂下進行培育。在含有2% DMSO之M199培養基中將細胞與15 μ L化合物一起預培育1 h，然後使用15 μ L OSM及IL-1 β 進行觸發以達到25 ng/mL OSM及1 ng/mL IL-1 β ，且在觸發後48 h時於條件培養基中量測MMP13含量。使用抗體捕獲活性分析量測MMP13活性。出於此目的，使用35 μ L 1.5 μ g/mL之抗人類MMP13抗體(R&D Systems, MAB511)溶液塗覆384孔板(NUNC, 460518, MaxiSorb black)且在4°C下保持24 h。在使用PBS + 0.05% Tween將孔洗滌2次後，使用存於PBS中之100 μ L 5%脫脂奶粉(Santa Cruz, sc-2325, Blotto)阻斷剩餘結合位點，且在4°C下保持24 h。其後，使用PBS + 0.05% Tween將孔洗滌2次，且添加存於100倍稀釋的

阻斷緩衝液中之35 μ L 1/10稀釋的含有MMP13之培養物上清液並在室溫下培育4 h。然後用PBS + 0.05% Tween將孔洗滌兩次，隨後藉由添加35 μ L 1.5 mM乙酸4-胺基苯基汞(APMA) (Sigma, A9563)溶液且在37°C下培育1 h來活化MMP13。再次用PBS + 0.05% Tween洗滌各孔且添加35 μ L MMP13受質(Biomol, P-126, OmniMMP螢光受質)。在37°C下培育24 h後，在Perkin Elmer Wallac EnVision 2102多標記讀取器(激發波長：320 nm，發射波長：405 nm)中量測經轉化受質之螢光度。

抑制百分比=((在媒劑存在下測定之螢光度 - 使用含有本發明測試化合物之試樣測定之螢光度)/(在媒劑存在下測定之螢光度 - 使用無觸發劑之試樣測定之螢光度))* 100。

3.3. PBL增生分析

使用IL-2刺激人類外周血液淋巴細胞(PBL)並使用BrdU納入分析來量測增生。首先使用PHA將PBL刺激72 h以誘導IL-2受體，然後禁食24 h以終止細胞增生，之後再實施72 h IL-2刺激(包含24 hr之BrdU標記)。在添加IL-2之前，將細胞與測試化合物一起預培育1 hr。在含有10% (v/v) FBS之RPMI 1640中培養細胞。

3.4. 人類全血分析(hWBA)

3.4.1. 方案1

3.4.1.1. IL-6刺激方案

使用人類全血實施流式細胞術分析以確立JAK1高於JAK2之離體化合物選擇性。因此，自給出知情同意之人類志願者採集血液。然後將血液在37°C下在輕微搖動下平衡30 min，然後在埃彭道夫管(Eppendorf tube)中等分。添加不同濃度之化合物並在37°C下在輕微搖動下培育30 min，且隨後在37°C下在輕微搖動下使用介白素6 (IL-6) (對於JAK1依賴性路徑刺激而言)或GM-CSF (對於JAK2依賴性路徑刺激而言)刺激20 min。然後使用FACS分析評估磷酸-STAT1及磷酸S

STAT5。

3.4.1.1.1. 磷酸-STAT1分析

3.4.1.1.1.1. 試劑之製備

使用蒸餾水將5×裂解/固定緩衝液(BD PhosFlow，目錄編號為558049)稀釋5倍並在37°C下預熱。丟棄剩餘的經稀釋裂解/固定緩衝液。

將10 µg rhIL-6 (R&D Systems，目錄編號為206-IL)溶解於1 ml PBS 0.1% BSA中以獲得10 µg/ml儲備溶液。將儲備溶液等分並儲存於-80°C下。

在DMSO中製備化合物之3倍稀釋系列(10 mM儲備溶液)。經對照處理之試樣接受DMSO而非化合物。將所有試樣與最終濃度為1%之DMSO一起培育。

3.4.1.1.1.2. 將血液與化合物一起培育並使用IL-6進行刺激

在肝素化管中收集人類血液。將血液分成148.5 µL之等分試樣。然後，向每一血液等分試樣中添加1.5 µL測試化合物稀釋液且將血液試樣在37°C下在輕微搖動下培育30 min。將1.5微升10倍稀釋的IL-6儲備溶液添加至血液試樣(最終濃度為10 ng/mL)中且將試樣在37°C下在輕微搖動下培育20 min。

3.4.1.1.1.3. 白血細胞製備

在刺激時段結束時，向血液試樣中立即添加3 ml 1×預熱裂解/固定緩衝液，短暫渦旋並在37°C下在水浴中培育15 min以裂解紅血細胞並固定白血球。

在4°C下在400×g下將試管離心5 min。用3 mL冷1× PBS洗滌細胞沈澱物，且離心後將細胞沈澱物再懸浮於100 µL冰冷1× PBS中並添加900 µL冰冷100%甲醇。然後將細胞在4°C下培育30 min以進行滲透化。

然後使用含有3% BSA之1× PBS洗滌滲透化細胞並最終再懸浮於含有3% BSA之80 μ L 1× PBX中。

3.4.1.1.1.4. 用抗磷酸-STAT1及抗CD4抗體進行細胞標記

添加且混合20 μ L PE小鼠抗STAT1 (pY701)或PE小鼠IgG2aκ同型對照抗體(BD Biosciences, 目錄編號分別為612564及559319)及FITC結合之抗CD4抗體或FITC結合之同型對照抗體, 然後在4°C下在黑暗中培育30 min。

然後使用1× PBS將細胞洗滌一次並在FACSCanto II流式細胞儀(BD Biosciences)上進行分析。

3.4.1.1.1.5. FACSCanto II上之螢光分析

對50,000個總事件進行計數且於淋巴球門中對CD4⁺細胞進行選通之後量測磷酸-STAT1陽性細胞。使用FACSDiva軟體分析數據, 且基於CD4⁺細胞上磷酸-STAT1之陽性細胞之百分比來計算IL-6刺激之抑制百分比。

3.4.1.1.2. 磷酸-STAT5分析

3.4.1.1.2.1. 試劑之製備

使用蒸餾水將5×裂解/固定緩衝液(BD PhosFlow, 目錄編號為558049)稀釋5倍並在37°C下預熱。丟棄剩餘的經稀釋裂解/固定緩衝液。

將10 μ g rhGM-CSF (AbCys S.A., 目錄編號為P300-03)溶解於100 μ L PBS 0.1% BSA中以獲得100 μ g/ml儲備溶液。將儲備溶液於-80°C下儲存並等分。

在DMSO中製備化合物之3倍稀釋系列(10 mM儲備溶液)。經對照處理之試樣接受DMSO而並不接受測試化合物。將所有試樣與最終濃度為1%之DMSO一起培育。

3.4.1.1.2.2. 將血液與化合物一起培育並使用GM-CSF進行刺激

5

在肝素化管中收集人類血液。將血液分成148.5 μL 之等分試樣。然後，向每一等分試樣中添加1.5 μL 測試化合物稀釋液且將血液試樣在37°C下在輕微搖動下培育30 min。將5,000倍稀釋的GM-CSF儲備溶液(1.5 μL)添加至血液試樣(最終濃度為20 pg/mL)中且將試樣在37°C下在輕微搖動下培育20 min。

3.4.1.1.2.3. 白血細胞製備

在刺激時段結束時，向血液試樣中立即添加3 ml 1×預熱裂解/固定緩衝液，短暫渦旋並在37°C下在水浴中培育15 min以裂解紅血細胞並固定白血球。

在4°C下在400×g下將試管離心5 min。用3 mL冷1× PBS洗滌細胞沈澱物，且離心後將細胞沈澱物再懸浮於100 μL 冰冷1× PBS中並添加900 μL 冰冷100%甲醇。然後將細胞在4°C下培育30 min以進行滲透化。

3.4.1.1.2.4. 用抗磷酸-STAT5及抗CD33抗體進行細胞標記

添加20 μL PE小鼠抗STAT5 (pY694)或PE小鼠IgG1 κ 同型對照抗體(BD Biosciences，目錄編號分別為612567及554680)及APC小鼠抗CD33抗體(BD Biosciences編號為345800)或APC小鼠IgG1同型對照抗體(BD Biosciences編號為345818)，混合，然後在4°C下在黑暗中培育30 min。

然後使用1× PBS將細胞洗滌一次並在FACSCanto II流式細胞儀(BD Biosciences)上進行分析。

3.4.1.1.2.5. FACSCanto II上之螢光分析

對50,000個總事件進行計數且對CD33⁺細胞進行選通之後量測磷酸-STAT5陽性細胞。使用FACSDiva軟體分析數據，且對應於基於CD33⁺細胞上之磷酸-STAT5之陽性細胞之百分比計算之GM-CSF刺激之抑制百分比。

3.4.2. 方案2

3.4.2.1. 刺激方案

使用人類全血實施流式細胞術分析以確立JAK1高於JAK2之離體化合物選擇性。因此，自給出知情同意之人類志願者採集血液。然後將血液在37°C下在輕微搖動下平衡30 min，然後在埃彭道夫管中等分。添加不同濃度之化合物並在37°C下在輕微搖動下培育30 min，且隨後在37°C下在輕微搖動下使用介白素6 (IL-6) (對於JAK1依賴性路徑刺激而言)、介白素 α (IFN α) (對於JAK1/TYK2路徑刺激而言)、介白素2 (IL-2) (對於JAK1/JAK3路徑刺激而言)或GM-CSF (對於JAK2依賴性路徑刺激而言)刺激20 min。然後使用FACS分析來評估磷酸-STAT1 (對於IL-6-及IFN α -刺激之細胞)及磷酸-STAT5 (對於IL-2-及GM-CSF-刺激之細胞)含量。

3.4.2.2. 磷酸-STAT1分析

3.4.2.2.1. 試劑之製備

使用蒸餾水將5 $\times$ 裂解/固定緩衝液(BD PhosFlow，目錄編號為558049)稀釋5倍並在37°C下預熱。丟棄剩餘的經稀釋裂解/固定緩衝液。

將10 μ g rhIL-6 (R&D Systems，目錄編號為206-IL)溶解於1 ml PBS + 0.1% BSA中以獲得10 μ g/ml儲備溶液。將儲備溶液等分並儲存於-80°C下。

將10 μ g rhIL-2 (R&D Systems，目錄編號為202-IL)溶解於1 ml PBS + 0.1% BSA中以獲得10 μ g/ml儲備溶液。將儲備溶液等分並儲存於-80°C下。

將5 μ g rhGM-CSF (AbCys S.A.，目錄編號為P300-03)溶解於12.5 mL PBS + 0.1% BSA中以獲得400 μ g/ml儲備溶液。將儲備溶液於-80°C下儲存並等分。

在DMSO中製備化合物之3倍稀釋系列(10 mM儲備溶液)。經對照處理之試樣接受DMSO而非化合物。將所有試樣與最終濃度為1%之DMSO一起培育。

3.4.2.2.2. 將血液與化合物一起培育並使用觸發劑進行刺激

在肝素化管中收集人類血液。將血液分成148.5 μ L之等分試樣。然後，向每一血液等分試樣中添加1.5 μ L測試化合物稀釋液且將血液試樣在37°C下在輕微搖動下培育30 min。將1.5微升10倍稀釋的IL-6儲備溶液、1.5 μ L uIFN α (PBL Biomedical, 目錄編號為11200-1)儲備溶液、1.5 μ L 25倍稀釋的IL-2儲備溶液或1.5 μ L 200倍稀釋的GM-CSF儲備溶液添加至血液試樣中且將試樣在37°C下在輕微搖動下培育20 min。

3.4.2.2.3. 白血細胞製備

在刺激時段結束時，向血液試樣中立即添加3 ml 1 $\times$ 預熱裂解/固定緩衝液，短暫渦旋並在37°C下在水浴中培育15 min以裂解紅血細胞並固定白血球。

在4°C下在400 $\times$ g下將試管離心5 min。用3 mL冷1 $\times$ PBS洗滌細胞沈澱物，且離心後將細胞沈澱物再懸浮於100 μ L冰冷1 $\times$ PBS中並添加900 μ L冰冷100%甲醇。然後將細胞在4°C下培育30 min以進行滲透化。

然後使用含有3% BSA之1 $\times$ PBS洗滌滲透化細胞並最終再懸浮於含有3% BSA之80 μ L 1 $\times$ PBX中。

3.4.2.2.4. 細胞標記

將20 μ L PE小鼠抗STAT1 (pY701)或PE小鼠IgG2 α κ同型對照抗體(BD Biosciences, 目錄編號分別為612564及559319)及APC結合之抗CD4抗體或APC結合之同型對照抗體(BD Biosciences, 目錄編號分別為555349及555751)添加至IL-6-及IFN α -刺激之試管中且混合，然後在

4°C 下在黑暗中培育 20 min。

將 20 μ L PE 小鼠抗 STAT5 (pY694) 或 PE 小鼠 IgG1 κ 同型對照抗體 (BD Biosciences, 目錄編號分別為 612567 及 554680) 及 APC 結合之抗 CD4 抗體或 APC 結合之同型對照抗體 (BD Biosciences, 目錄編號分別為 555349 及 555751) 添加至 IL-2 刺激之試管中, 混合, 然後在 4°C 下在黑暗中培育 20 min。

將 20 μ L PE 小鼠抗 STAT5 (pY694) 或 PE 小鼠 IgG1 κ 同型對照抗體 (BD Biosciences, 目錄編號分別為 612567 及 554680) 及 APC 小鼠抗 CD33 抗體 (BD Biosciences 編號為 345800) 或 APC 小鼠 IgG1 同型對照抗體 (BD Biosciences 編號為 345818) 添加至 GM-CSF 刺激之試管中, 混合, 然後在 4°C 下在黑暗中培育 20 min。

然後使用 1 $\times$ PBS 將細胞洗滌一次並在 FACSCanto II 流式細胞儀 (BD Biosciences) 上進行分析。

3.4.2.2.5. *FACSCanto II* 上之螢光分析

對 50,000 個總事件進行計數且於針對 IL-6- 及 IFN α - 刺激之細胞之淋巴球門中對 CD4+ 細胞進行選通之後量測磷酸-STAT1 陽性細胞。於針對 IL-2 刺激之細胞之淋巴球門中對 CD4+ 細胞進行選通之後量測磷酸-STAT5 陽性細胞。對 CD33+ 細胞進行選通後量測磷酸-STAT5 陽性細胞。使用 FACSDiva 軟體分析數據, 且基於 CD4+ 細胞上磷酸-STAT1 之陽性細胞之百分比來計算 IL-6 或 IFN α 刺激之抑制百分比。對於 IL-2 刺激之細胞, 使用 FACSDiva 軟體分析數據, 且基於 CD4+ 細胞上磷酸-STAT1 之陽性細胞之百分比來計算 IL-2 刺激之抑制百分比。對於 GM-CSF 刺激之細胞, 基於 CD33+ 細胞上磷酸-STAT5 之陽性細胞之百分比來計算 GM-CSF 刺激之抑制百分比。

3.4.3. 結果

當提交該等方案時, 針對 6 種不同供體, 式 I 化合物返回對於 IL-6

誘導之STAT1磷酸化之平均 IC_{50} 為11.9 μM 。對於IFN α 誘導之STAT1磷酸化，6種不同供體之平均 IC_{50} 經評估為15.4 μM 。對於IL-2誘導之STAT5磷酸化，5種不同供體之平均 IC_{50} 經評估為19.6 μM 。對於GM-CSF誘導之STAT5磷酸化，7種不同供體之平均 IC_{50} 經評估為100 μM 以上。

實例4. 活體內模型

4.1. CIA模型1

4.1.1. 材料

自Difco購得完全弗羅因德氏(Freund's)佐劑(CFA)及不完全弗羅因德氏佐劑(IFA)。分別自Chondrex (Isle d'Abeau, 法國)、Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, 法國)、Whyett (25 mg可注射唧筒, 法國)、Whyett (25 mg可注射唧筒, 法國)、Acros Organics (Palo Alto, CA)獲得II型牛膠原(CII)、脂多糖(LPS)及Enbrel®。所使用之所有其他試劑皆係試劑級且所有溶劑皆係分析級。

4.1.2. 動物

自Harlan實驗室(Melderslo, Netherlands)獲得黑暗刺豚大鼠(Dark Agouti rat, 雄性, 7-8週齡)。將大鼠保持在12 hr光照/黑暗循環中(0700-1900)。將溫度維持在22°C下, 且隨意提供食物及水。

4.1.3. 膠原誘導之關節炎(CIA)

在實驗前一天, 使用0.05 M乙酸製備CII溶液(2 mg/mL)並儲存於4°C下。在即將免疫前, 在冰水浴中藉由均質器將等體積之佐劑(IFA)及CII混合於預冷卻之玻璃瓶中。若未形成乳液, 則可能需要額外佐劑及延長均質化。在第1天在各大鼠之尾巴根部經皮內注射0.2 mL乳液, 在第9天實施第二次加強皮內注射(存於0.1 mL CFA鹽水中之2 mg/mL之CII溶液)。此免疫方法係根據已公開之方法(Sims等人, 2004; Jou等人, 2005)改良。

4.1.4. 研究設計

在大鼠CIA模型中測試該等化合物之治療效應。將大鼠隨機分成數個相同組且各組含有10只大鼠。在第1天對所有大鼠實施免疫且在第9天實施加強免疫。自第16天至第30天持續進行治療性投藥。使用媒劑(MC 0.5%)處理陰性對照組且使用Enbrel® (10 mg/kg, 3×週, 皮下)處理陽性對照組。通常以3種劑量(例如6 mg/kg、10 mg/kg、60 mg/kg, q.d., p.o)測試目標化合物。

4.1.5. 關節炎之臨床評價

根據Khachigian 2006, Lin等人2007及Nishida等人2004)之方法對關節炎進行評分。使用關節炎評分對四個爪各自之腫脹分級如下：0-無症狀；1-一類關節(例如踝或腕)輕微、但明顯充血且腫脹、或限於個別足趾之顯著充血及腫脹(不管受侵襲足趾之數量為多少)；2-兩類或更多類關節中度充血及腫脹；3-整個爪(包含足趾)嚴重充血及腫脹；4-肢體中多處關節出現最大發炎(每個動物之最大累積臨床關節炎評分為16) (Nishida等人, 2004)。

為允許對多個研究進行統合分析(meta-analysis), 如下所述將臨床評分值進行正規化：

臨床評分之AUC (AUC評分)：計算每一個別大鼠自第1天至第14天之曲線下面積(AUC)。將每一動物之AUC除以針對研究中之媒劑(自其獲得該動物之數據)獲得之平均AUC並乘以100 (即將AUC表示為平均媒劑AUC/研究之百分比)。

第1天至第14天之臨床評分增加(終點評分)：將每一動物之臨床評分差除以針對研究中之媒劑(自其獲得該動物之數據)獲得之平均臨床評分差並乘以100 (即將臨床評分差表示為媒劑之平均臨床評分差/研究之百分比)。

4.1.6. 關節炎發作後體重之變化(%)

S

臨床上，體重減輕與關節炎相關(Shelton等人，2005；Argiles等人，1998；Rall, 2004；Walsmith等人，2004)。因此，關節炎發作後之體重變化可用作評估大鼠模型中治療效應之非特異性終點。關節炎發作後之體重變化(%)計算如下：

$$\begin{aligned} \text{小鼠：} & \frac{\text{體重}_{(\text{第6週})} - \text{體重}_{(\text{第5週})}}{\text{體重}_{(\text{第5週})}} \times 100\% \\ \text{大鼠：} & \frac{\text{體重}_{(\text{第4週})} - \text{體重}_{(\text{第3週})}}{\text{體重}_{(\text{第3週})}} \times 100\% \end{aligned}$$

4.1.7. 放射學

採集每一個別動物之後爪的X射線照片。為每張照片指定隨機盲識別號碼，且由兩個獨立的評分員使用放射性拉爾森(Larsen)評分系統對骨侵蝕之嚴重性如下進行分級：0-正常，具有完整骨輪廓及正常關節間隙；1-輕微異常，其中任一個或兩個外蹠骨顯示輕微骨侵蝕；2-明顯早期異常，其中任何三至五個外蹠骨顯示骨侵蝕；3-中度破壞性異常，其中所有外蹠骨以及任一個或兩個內蹠骨顯示明顯骨侵蝕；4-嚴重破壞性異常，其中所有蹠骨皆顯示明顯骨侵蝕且至少一個內蹠骨關節完全被侵蝕，僅部分保留某些骨關節之輪廓；5-殘廢性異常，無骨輪廓。此評分系統係根據 Salvemini 等人，2001；Bush 等人，2002；Sims 等人，2004；Jou 等人，2005 進行改良。

4.1.8. 組織學

在放射性分析後，於10%磷酸鹽緩衝之福馬林(pH 7.4)中固定小鼠後爪，使用精細組織學之快速骨脫鈣劑進行脫鈣(Laboratories Eurobio)並埋置於石蠟中。為確保深入評估關節炎關節，切割至少四組連續切片(5 μm厚)且每一系列連續切片之間間隔100 μm。使用蘇木精(hematoxylin)及曙紅(eosin) (H&E)將切片染色。使用雙盲方案對滑囊發炎及骨及軟骨損傷實施組織學檢查。在各爪中，使用四點量表評價四個參數。該等參數係細胞浸潤、血管翳嚴重性、軟骨侵蝕及骨侵

蝕。如下所述進行評分：1-正常、2-輕微、3-中度、4-顯著。將該四個評分加在一起且表示為另一評分，即「RA總分」。

4.1.9. 跟骨(腳後跟骨)之顯微電腦斷層掃描(μ CT)分析：

在RA中所觀察到之骨降解尤其出現在皮質骨上且可藉由 μ CT分析來揭露(Sims NA等人，Arthritis Rheum. 50 (2004) 2338-2346: Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis；Oste L等人，ECTC Montreal 2007: A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry)。在對跟骨進行掃描及3D體積重建後，根據電腦分析每個載玻片中以垂直於骨縱軸之方式分離之離散物體數量，來量測骨降解。骨降解愈多，所量測到之離散物體愈多。分析沿著跟骨均勻分佈之1000個切片(間隙為約10.8 μ m)。

4.1.10. 穩態PK

在第7或11天時，在眼眶後靜脈竇處使用肝素鈣作為抗凝血劑，在下列時間點收集血液試樣：投配前、1、3及6 hr。將全血試樣離心且將所得血漿試樣儲存於-20℃下以備分析用。藉由LC-MS/MS方法測定各測試化合物之血漿濃度，其中以正電噴霧模式操作質譜儀。使用Winnonlin® (Pharsight®, United States)計算藥物代謝動力學參數，且假設投配前之血漿含量等於24 h時之血漿含量。

4.1.11. 結果

如圖1及表I中所顯示，式I化合物在60 mg/kg之劑量下展現正規化臨床評分值(根據AUC或第1天至第14天之差計算)之統計上顯著改良。

表I：在經本文所揭示之化合物治療後大鼠CIA臨床評分

天	18	19	20	21	24	25	26	27	28
媒劑	2.9	3.8	6.0	6.0	6.4	6.3	6.3	6.3	6.4

式II (6 mg/kg)	3.0	3.6	4.2	5.1	5.2	5.1	4.9	5.2	5.4
式I (60 mg/kg)	2.9	4.4	5.0	3.9	4.5	4.3	3.8	3.7	3.3
式II (6 mg/kg) + 式I (60 mg/kg)	3.0	3.6	4.4	4.5	4.5	4.1	3.9	4.3	3.6

4.2. CIA模型2

4.2.1. 動物

自Charles River Laboratories公司(Wilmington, MA)獲得在關節炎第0天稱重為165-194克(平均約為178 g)之雌性路易士大鼠(Lewis rat, n = 76, 參考編號為393739)。藉由描述組及動物編號之尾巴根部之不同數字來鑑別動物。

收到時，動物以4只/籠圈養於鞋盒式聚碳酸酯籠中且使其適應8天，然後用II型膠原進行免疫。未給予同時服用之藥劑。

在適應及研究時段期間，將動物圈養於溫度介於19°F-25°F之間且相對濕度為30%-70%之實驗室環境中。自動定時器提供12 h光照及12 h黑暗環境。允許動物隨意獲取食物及水。

4.2.2. 膠原誘導之關節炎(CIA)

4.2.2.1. 準備

用異氟烷麻醉已適應的雌性路易士大鼠且在第-9天及第-3天在尾巴根部及背部2個位點處經皮下/皮內(SC/ID)注射300 µL含有2 mg/mL II型牛膠原(Elastin Products, Owensville, Missouri)之不完全弗羅因德氏佐劑(Difco, Detroit, MI)。

藉由在0.01 N乙酸中製備4 mg/mL溶液來製備膠原。藉由人工混合乳化等體積之膠原及不完全弗羅因德氏佐劑直至此材料之珠粒當置於水中時保持其形狀為止。每一動物每次接受300 µL混合物，在背部上分為3個皮下位點。

4.2.2.2. 研究

在研究第1天，關節炎發生發作且將動物隨機分配至治療組中。

隨機化後，用方案編號、組編號及動物編號標記所有籠。在踝關節腫脹已明顯確立且有兩側疾病之良好證據後，隨機分配至每一組中。

每天(QD)藉由口服(PO)途徑用媒劑(0.5% (w/v)甲基纖維素)或以0.5% (w/v)甲基纖維素製備之活性化合物將患有確立的II型膠原關節炎之動物治療13天。在關節炎第1天開始經口投藥且每天持續投藥(QD，間隔24 h)直至第13天。動物在關節炎第14天處死。

4.2.2.3. 關節炎之臨床評價

藉由量測動物兩踝之直徑來評估關節炎之嚴重程度。自第0天開始每天用Digitrix II測微尺(Fowler & NSK)進行踝之卡尺量測。使用值舍入為千分之一英吋之一踝進行基線量測。藉由與基於一系列體重之大鼠之歷史值比較將量測確認為臨床上正常的(0.260-0.264英吋)。然後對兩個踝實施基線量測，且只要踝係臨床上正常的(具有所有踝骨之良好定義且無發炎證據)，則該等值屬於該動物。動物在第14天處死。

4.2.2.4. 化合物、劑量及結果

單獨及以組合測試不同劑量之化合物，此列示於下表II中。

表II：在CIA第二模型中所測試之化合物及劑量

化合物	劑量	組
對照，PO，QD	—	A
媒劑 (MC, 0.5%, w/v)	5 mL/kg	B
式II	1 mg/kg	C
	3 mg/kg	D
	10 mg/kg (*)	E
	30 mg/kg (*)	F

化合物	劑量	組
式I	25 mg/kg (*)	G
	50 mg/kg (*)	H
式II + 式I	3 mg/kg (式II) + 25 mg/kg (式I), (*)	I

(* = $p \leq 0.05$ ANOVA，相對於媒劑對照)

4.2.2.5. 結論

踝直徑量測表明，投與式I (25 mg/kg)與式II (3mg/kg)化合物之組合提供之效應強於式I化合物(25 mg/kg)單獨或式II化合物(3 mg/kg)單獨獲得之效應，如圖2及下表III中所顯示。

表III：在經本文所揭示之化合物治療後大鼠CIA模型中踝直徑(英吋)之演化

	組							
天數	A	B	C	D	E	F	G	H
0	0.2635	0.2628	0.2625	0.2623	0.2626	0.2620	0.2629	0.2624
1	0.2635	0.2717	0.2716	0.2718	0.2718	0.2718	0.2717	0.2718
2	0.2635	0.2780	0.2755	0.2755	0.2744	0.2679	0.2747	0.2705
3	0.2635	0.2865	0.2869	0.2869	0.2808	0.2683	0.2826	0.2814
4	0.2635	0.2980	0.2990	0.2957	0.2850	0.2708	0.2892	0.2886
5	0.2635	0.3109	0.3106	0.3058	0.2921	0.2698	0.2973	0.2970
6	0.2635	0.3246	0.3231	0.3168	0.3000	0.2696	0.3064	0.3061
7	0.2635	0.3290	0.3296	0.3205	0.3031	0.2706	0.3108	0.3110
8	0.2635	0.3301	0.3291	0.3259	0.3108	0.2741	0.3150	0.3160
9	0.2635	0.3260	0.3268	0.3216	0.3119	0.2721	0.3089	0.3085
10	0.2635	0.3227	0.3270	0.3197	0.3122	0.2706	0.3046	0.3032
11	0.2635	0.3187	0.3185	0.3156	0.3090	0.2711	0.3025	0.3041
12	0.2635	0.3186	0.3178	0.3165	0.3070	0.2685	0.3006	0.3039

	組							
天數	A	B	C	D	E	F	G	H
13	0.2635	0.3186	0.3185	0.3175	0.3069	0.2684	0.2996	0.3014
14	0.2635	0.3216	0.3226	0.3174	0.3066	0.2679	0.3016	0.2999

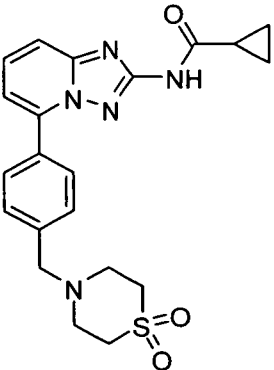
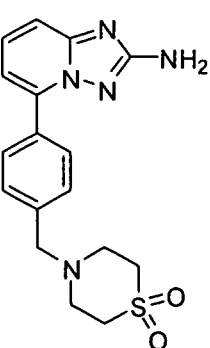
實例5. 藥動學研究

5.1. 活體外代謝研究

比較式II之[¹⁴C]-化合物在小鼠、大鼠、狗及人類肝細胞中之代謝之研究明確展示，式II化合物在所有物種中皆穩定，且確認代謝程度在所有物種中皆較低，其中24 h後存在至少80%之式II化合物，如圖3所顯示。

表IV顯示式II化合物在人類及動物物種肝細胞中之放射量測代謝特徵，此展現一種主要代謝物(式I化合物，11%)及兩種次要代謝物(未經表徵，< 1.0%，在層析圖上可見)。

表IV：式II化合物之活體外代謝特徵

結構			代謝物2	代謝物3
小鼠	85%	14%	<1.0%	<1.0%
大鼠	86%	12%	<1.0%	<1.0%
狗	93%	5.7%	<1.0%	1.0%
人類	88%	11.2%	<1.0%	<1.0%

5.2. 活體內研究

5.2.1. 動物中之單一劑量藥物代謝動力學

在多個經式II化合物投藥之動物物種中實施藥物代謝動力學研究

以測定式I化合物之暴露以及其表觀最終半衰期($T_{1/2}$) (若可能)。

5.2.1.1. 方案

5.2.1.1.1. 動物

使普斯拉-道來氏大鼠(Sprague-Dawley rat, 雄性, 200-250 g)、CD1小鼠(雄性, 25-30 g)、比格犬(Beagle dog, 雄性, 9-10 kg)、哥廷根小型豬(Göttingen minipig, 雄性, 10-15 kg)及紐西蘭白兔(New Zealand White rabbit, 雄性, 3-5 kg)適應至少7天, 然後治療且保持在12 hr光照/黑暗循環中(07h00-19h00)。

將溫度維持在約22°C下, 且隨意提供食物及水。

5.2.1.1.2. 藥物代謝動力學研究

將式I化合物於0.5%甲基纖維素中調配且以單一食道管飼劑形式以介於15 mg/kg至180 mg/kg之間之劑量在5 mL/kg或10 mL/kg之投藥體積下經口投給3或6只動物。

將式II化合物於0.5%甲基纖維素中調配且以單一食道管飼劑形式以介於15 mg/kg至45 mg/kg之間之劑量在5 mL/kg或10 mL/kg之投藥體積下經口投給3只動物(或3只小鼠/時間點)。

經由頸靜脈(狗、小型豬)、耳血管(兔)、心臟穿刺(小鼠)或眼窩後靜脈竇(大鼠)且使用肝素鋰作為抗凝血劑經24 h時段收集血液試樣。將全血試樣離心且在分析之前將所得血漿試樣儲存在-20°C下。

5.2.1.1.3. 血漿中化合物含量之量化

藉由LC-MS/MS方法來測定式I化合物及式II化合物之血漿濃度, 其中對於所有物種式I及式II之量化極限皆 ≤ 10.0 ng/mL。

5.2.1.1.4. 藥物代謝動力學參數之測定

使用統計分析包(WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, USA)來計算藥物代謝動力學參數。

5.2.1.2. 結果

5.2.1.2.1. 投與單獨式I化合物後之結果

使用上文所闡述之方案，測定如下表V所顯示之AUC及表觀最終半衰期。

表 V：投與本發明式I化合物後不同物種中之暴露及表觀最終半衰期

物種	劑量 (mg/kg)	AUC (µg.h/mL)	表觀最終半衰期(h)
大鼠	20	19.7 (雄性) 25.2 (雌性)	7
	60	102 (雄性) 123 (雌性)	
	180	376 (雄性) 541 (雌性)	
狗 (雄性)	10	49.4	9
	25	114	
	50	290	
兔 (雌性)	125	777	未測定
	250	1029	

表V中所呈現之結果顯示式I化合物當單獨投配時易於吸收，且因此在活體內有所暴露。

5.2.1.2.2. 投與單獨式I化合物後之結果

投與式II化合物後，在小鼠(2.1 h)及兔(4.6 h)中測定式I化合物之表觀最終清除半衰期。

5.2.2. 人類中之單一劑量藥物代謝動力學

5.2.2.1. 方案

在高脂肪高熱量早餐(FDA建議：高脂肪(佔餐總熱量含量之約50%)及高熱量(約800卡路里(calory)至1000卡路里)後使個體接受呈膠

囊形式之單一劑量(10 mg、25 mg、50 mg、100 mg或200 mg)之式II化合物。實例性測試餐將係兩個奶油煎蛋、兩條醃肉、兩片奶油土司(toast)、四盎司(ounce)炸薯餅及八盎司全乳。可對此測試餐作出取代，只要該餐提供來自蛋白質、碳水化合物及脂肪之相似熱量且具有相當餐體積及黏度。

經72 h收集系列血液試樣以使用經驗證的液相層析-質譜/質譜(LC-MS/MS)方法來測定式II及式I化合物之血漿濃度，其中量化極限為1.00 ng/mL。使用統計分析包(WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, USA)來評價PK參數。

5.2.2.2. 血漿清除結果

量測式II化合物及式I化合物之平均血漿濃度-時間曲線。

式II化合物隨時間之清除展現兩相曲線且平均表觀最終清除半衰期為約5-8 h。

相比之下，式I化合物之血漿清除展現單相曲線且平均表觀最終清除半衰期介於21 h至27 h之間。

5.2.2.3. 式II及式I化合物之暴露

為顯示兩種化合物之比較暴露，計算式I化合物及式II化合物之AUC。AUC值表示投配後化合物在物種中之總暴露。在圖4中該等值則表示為式I化合物之AUC:式II化合物之AUC之比率。自此比率可明確看出，在人類中投與式II化合物後式I化合物之暴露與在治療等效劑量之動物中所見之暴露相比顯著不同。不欲受限於理論，人們相信此差異與在不同物種中表觀最終半衰期之差異相關。

表VI：投與式II化合物時所量測之[式I]:[式II]暴露之比率(表示為AUC)

物種	式I	式II	I/II比率
小鼠(30 mg/kg)	11.4	7.3	1.56

物種	式I	式II	I/II比率
大鼠(45 mg/kg)	13.3	33.3	0.40
狗(15 mg/kg)	10.6	44.9	0.24
小型豬(30mg/kg)	16.7	19.1	0.88
兔(20mg/kg)	10	26	0.38
人類(10 mg)	2.89	0.128	22.58
人類(25 mg)	7.22	0.331	21.81
人類(50 mg)	14.6	0.735	19.86
人類(100 mg)	26.9	1.69	15.92
人類(200 mg)	57.6	4.5	12.8

5.2.3. 人類中之重複劑量藥物代謝動力學

5.2.3.1. 方案

個體在標準早餐後接受呈膠囊形式之重複劑量(25 mg、50 mg及100 mg BID或200 mg、300 mg及450 mg QD)之式II化合物達10天。

在第1天及第10天經12 h (BID方案)或24 h (QD方案)收集系列血液試樣以使用經驗證的液相層析-質譜/質譜(LC-MS/MS)方法來測定式II及式I化合物之血漿濃度，其中對於兩個式之量化極限皆為1.00 ng/mL。使用統計分析包(WinNonLin (Pharsight, Sunnyvale, California: CA 94086, USA)來評價PK參數。

5.2.3.2. 血漿清除結果

量測式II化合物及式I化合物之平均血漿濃度-時間曲線。

式II化合物隨時間之清除展現兩相曲線且平均表觀最終清除半衰期為約4-11 h。

相比之下，式I化合物之血漿清除展現單相曲線且平均表觀最終清除半衰期介於22 h至27 h之間。

5.2.3.3. 式II及式I化合物之暴露

為顯示兩種化合物之比較暴露，計算式I化合物及式II化合物之

AUC。AUC值表示重複投配後化合物之穩態暴露。式I化合物之AUC：式II化合物之AUC之比率係展現於表VII中。

表VII：重複投與式II化合物時所量測之式II及式I之暴露(表示為AUC， $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)

方案	BID			QD		
劑量	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	300 mg	450 mg
式II	0.346	0.758	2.38	4.45	4.40	10.2
式I	8.66	15.2	41.1	70.0	66.1	102
I/II比率	24.4	20.5	18.3	16.1	15.0	10.1

5.2.4. 結論

式I化合物在活體外在所有物種中展現極相似特徵。然而，出人意料的是，在活體內此特徵在人類與其他動物物種之間極不同，人類中之表觀最終半衰期係其他動物物種的至少3倍。此較長表觀最終半衰期使得式I化合物在人類中累積，此可提供眾多劑量方案頻率，具體而言低頻率劑量方案，且更具體而言每天一次至每兩週一次，更具體而言每天一次至每週一次。

5.3. 靶標抑制

在健康志願者中每天以200 mg QD及100 mg BID投配式II化合物。

然後量測所得式II及式I之含量且繪製成其各別 IC_{50} 之倍數(圖5)，該等 IC_{50} 係如藉由以上實例3.4中所闡述之全血分析測定。

單獨式II及式I在CIA大鼠模型中皆有活性。令人驚奇的是，如圖4中所顯示，式II化合物之投與與2種活性物質式I及式II相關。不希望受限於理論，人們相信式II提供對靶標之快速抑制，且然後式I化合物穩定形成且累積，因此使得經過幾乎24 h藥物含量大於 IC_{50} 值，如圖6中超過 IC_{50} 之累積倍數所顯示。此尤其出人意料，此乃因自大鼠、小

鼠及兔中之模型未曾預測到該特徵，在該模型中並未出現該累積。

表 VIII：比率計算為[化合物之血液循環劑量，表示為ng/mL] / [相同化合物在IC₅₀量下之循環劑量]

	式II，100 mg BID			式II，200 mg QD		
時間點(h)	式II	式I	式I + 式II	式II	式I	式I + 式II
0	0.09	0.97	1.06	0.02	0.69	0.71
0.5	0.12	0.93	1.04	0.46	0.65	1.11
1	0.48	0.88	1.36	3.14	0.69	3.83
2	1.28	0.97	2.25	3.88	0.84	4.72
3	1.71	1.00	2.71	3.16	0.96	4.12
5	0.88	1.13	2.01	1.31	1.00	2.31
8	0.26	0.96	1.22	0.36	0.93	1.29
12	0.09	0.86	0.94	-	-	-
12.5	0.12	0.93	1.04	-	-	-
13	0.48	0.88	1.36	-	-	-
14	1.28	0.97	2.25	-	-	-
15	1.71	1.00	2.71	-	-	-
17	0.88	1.13	2.01	-	-	-
20	0.26	0.96	1.22	-	-	-
24	0.09	0.86	0.94	0.11	0.84	0.95

一般結論

本申請案中所提供之數據展示，儘管式I化合物在生物化學分析中展現針對JAK1及JAK2之相似的活體外效能，但與生理學條件更接近之活體外全血選擇性分析(Saharinen等人2000 Mol. Cell. Biol., 20(10), 3387)顯示本發明式I化合物展現針對JAK1之選擇性係JAK2之10倍。此外，與可在其他物種中自活體外數據或活體內數據所預期者相比，本發明式I化合物在人類中顯示出人意料的活體內特徵。具體

S

而言，式I化合物在人類中展現介於21 h至27 h之間之顯著較長的表觀最終半衰期，此係熟習此項技術者未曾預測到的，此可能有利於低頻率劑量方案且增加患者順從性。具體而言，若患者錯過一次給藥，則可能降低不遵從性之影響。

實例6 其他方案

6.1. 熱力學溶解度

在室溫下於玻璃瓶中製備存於0.2 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)或0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 3.0)中之1 mg/mL測試化合物溶液。

在室溫下於旋轉器驅動STR 4 (Stuart Scientific, Bibby)中以速度3.0使試樣旋轉24 h。

24 hr後，將800 μ L試樣轉移至埃彭道夫管中並以14000 rpm離心5 min。然後將200 μ L試樣之上清液轉移至MultiscreenR Solubility板(Millipore, MSSLBPC50)中且藉助真空歧管將上清液過濾(10-12" Hg)至潔淨Greiner聚丙烯V形底96孔板(目錄編號為651201)中。將5 μ L濾液稀釋至在含有標準曲線之板(Greiner，目錄編號為651201)中培育所使用的95 μ L (F20)相同緩衝液中。

在DMSO中製備化合物之新標準曲線，其始於10 mM DMSO儲備溶液，然後於DMSO中將其稀釋2倍(5000 μ M)，且然後於DMSO中進一步稀釋至19.5 μ M。然後將3 μ L始於5000 μ M之稀釋系列轉移至97 μ L乙腈緩衝液混合物(50/50)中。最終濃度範圍為2.5-150 μ M。

使用密封墊(MA96RD-04S, Kinesis, Cambs, PE19 8YX, UK)將板密封且於室溫下在LCMS (來自Waters之ZQ 1525)上在最佳條件下使用Quanoptimize量測試樣以確定分子之適當質量。

在流速為1 mL/min之LCMS上分析試樣。溶劑A係15 mM氨且溶劑B係乙腈。在陽離子噴霧下在來自Waters之XBridge C₁₈ 3.5 μ M (2.1 $\times$ 30 mm)管柱上運行試樣。溶劑梯度具有2 min之總運行時間且介於

5% B至95% B之間。

藉助Masslynx軟體包分析峰面積且相對於標準曲線繪製試樣之峰面積以獲得化合物之溶解度。

溶解度值係以 μM 或 $\mu\text{g/mL}$ 報告。

6.2. 水溶解度

6.2.1. 水溶解度2% DMSO程序

自存於DMSO中之10 mM儲備溶液開始，在DMSO中製備連續稀釋之化合物。將稀釋系列轉移至F形底部之96 NUNC Maxisorb板(目錄編號為442404)中且在室溫下添加0.2 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)或0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 3.0)。

最終濃度介於200 μM 至2.5 μM 之間，呈5個相等稀釋等級。最終DMSO濃度不超過2%。將200 μM 芘添加至各96孔板之拐角點處且在顯微鏡上用作校正Z軸之參照點。

密封分析板並在37°C下培育1 hr，同時以230 rpm振盪。然後在白光顯微鏡下掃描板，在每個濃度下產生沈澱之單獨圖像。分析沈澱物並將其轉化為繪製於圖表上之數值。化合物似乎完全溶解之第一濃度係下文所報告之濃度，然而，實際濃度將介於此濃度與比此濃度高一個稀釋等級之濃度之間。

以 $\mu\text{g/mL}$ 形式報告根據此方案量測之溶解度值。

6.2.2. 水溶解度3% DMSO程序

自存於DMSO中之10 mM儲備溶液開始，在DMSO中製備連續稀釋之化合物。將稀釋系列轉移至F形底部之96 NUNC Maxisorb板(目錄編號為442404)中且在室溫下添加0.1 M磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)或0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(pH 3.0)。

最終濃度將介於300 μM 至18.75 μM 之間，呈5個相等稀釋等級。最終DMSO濃度不超過3%。將200 μM 芘添加至各96孔板之拐角點處

且在顯微鏡上用作校正Z軸之參照點。

密封分析板並在37°C下培育1 h，同時以230 rpm振盪。然後在白光顯微鏡下掃描板，在每個濃度下產生沈澱之單獨圖像。分析沈澱物並使用軟體工具將其轉化為可繪製於圖表上之數值。化合物似乎完全溶解之第一濃度係所報告之濃度；然而，實際濃度將介於此濃度與比此濃度高一個稀釋等級之濃度之間。

以 $\mu\text{g/mL}$ 形式報告根據此方案量測之溶解度值。

6.3. 血漿蛋白結合(平衡透析)

在DMSO中5倍稀釋存於DMSO中之10 mM化合物之儲備溶液。將此溶液進一步稀釋於剛解凍之人類、大鼠、小鼠或狗血漿(BioReclamation INC)中，其最終濃度為10 μM 且最終DMSO濃度為0.5% (在PP-Master阻斷96孔(Greiner，目錄編號為780285)中，5.5 μL 存於1094.5 μL 血漿中)。

製備具有插入物之Pierce Red Device板(ThermoScientific，目錄編號為89809)且在緩衝液室中填充750 μL PBS且於血漿室中填充500 μL 加標血漿。在37°C下將板培育4 h，同時以230 rpm振盪。在培育後，將兩室中液體之120 μL 轉移至96孔圓底、PP深孔板(Nunc，目錄編號為278743)中之360 μL 乙腈中並使用鋁箔蓋密封。混合試樣並置於冰上30 min。然後在4°C下以1200 rcf將此板離心30 min且將上清液轉移至96 v形底PP板(Greiner, 651201)上用以在LCMS上分析。

使用Kinesis, Cambs, PE19 8YX, UK之密封墊(MA96RD-04S)將板密封且於室溫下在LCMS (來自Waters之ZQ 1525)上在最佳條件下使用Quanoptimize量測試樣以確定分子之適當質量。

在流速為1 mL/min之LCMS上分析試樣。溶劑A係15 mM氨且溶劑B係乙腈。在陽離子噴霧下在來自Waters之XBridge C₁₈ 3.5 μM (2.1 $\times$ 30 mm)管柱上運行試樣。溶劑梯度具有2 min之總運行時間且介於

5% B至95% B之間。

將緩衝液室及血漿室中之化合物的峰面積視為100%化合物。自該等結果推導出結合至血漿之百分比且將其報告為結合至血漿之百分比。

藉由顯微鏡檢查最終測試濃度之化合物在PBS中的溶解性以顯示是否觀察到沈澱。

6.4. 微粒體穩定性

6.4.1. 微粒體穩定性，1 h培育程序

在96深孔板(Greiner，目錄編號為780285)中之182 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中將存於DMSO中之10 mM化合物儲備溶液稀釋1000倍並在37°C下預培育。

將40 μ L去離子水添加至聚丙烯Matrix 2D條形碼標記之儲存管(Thermo Scientific)之孔中並在37°C下預培育。

在182 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中製備葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH)工作儲備溶液並在使用前將其放置於冰上。在去離子水中製備含有MgCl₂、葡萄糖-6-磷酸酯及NADP⁺之輔因子並在使用前將其放置於冰上。

製備含有目標物種(人類、小鼠、大鼠、狗)之肝微粒體(Xenotech)、前文所闡述之G6PDH及輔因子的最終工作溶液且在室溫下將此混合物培育不超過20 min。

向Matrix管中之40 μ L預熱水中添加30 μ L預熱化合物稀釋液並添加30 μ L微粒體混合物。最終反應濃度係3 μ M化合物、1 mg微粒體、0.4 U/mL G6PDH、3.3 mM MgCl₂、3.3 mM葡萄糖-6-磷酸酯及1.3 mM NADP⁺。

為量測在零時刻化合物之剩餘百分比，在添加微粒體混合物前向孔中添加MeOH或MeCN (1:1)。用Matrix Septra密封件(Matrix，目錄

編號為4464)將板密封並振盪數秒以確保所有組份皆完全混合。

在37°C、300 rpm下培育未終止之試樣，且在培育1 hr後使用MeOH或MeCN (1:1)終止反應。

在終止反應後，混合試樣並將其於冰上放置30 min以沈澱蛋白質。然後在1200 rcf下在4°C下將板離心30 min且將上清液轉移至96 v形底PP板(Greiner, 651201)中用以在LCMS上分析。

使用Kinesis, Cambs, PE19 8YX, UK之密封墊(MA96RD-04S)將該等板密封且於室溫下在LCMS (來自Waters之ZQ 1525)上在最佳條件下使用Quanoptimize量測試樣以確定母體分子之適當質量。

以1 mL/min之流速在LCMS上分析試樣。端視所用終止溶液，溶劑A係15 mM氨且溶劑B係甲醇或乙腈。在陽離子噴霧下在來自Waters之XBridge C₁₈ 3.5 μM (2.1 × 30 mm)管柱上運行試樣。溶劑梯度具有2 min之總運行時間且介於5% B至95% B之間。

將0時刻時母體化合物的峰面積視為剩餘100%。自0時刻計算培育1 hr後之剩餘百分比且將其計算為剩餘百分比。藉由顯微鏡檢查最終測試濃度之化合物在緩衝液中的溶解度且報告結果。

關於微粒體穩定性之數據表示為60 min後剩餘化合物總量之百分比。

6.4.2. 微粒體穩定性，30 min培育程序

在96深孔板(Greiner，目錄編號為780285)中之105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中將存於DMSO中之10 mM化合物儲備溶液稀釋至6 μM並在37°C下預熱。

在105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中將700 U/ml之葡萄糖-6-磷酸脫氫酶(G6PDH, Roche, 10127671001)工作儲備溶液稀釋700倍。在105 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)中將含有0.528 M MgCl₂·6H₂O (Sigma, M2670)、0.528M 葡萄糖-6-磷酸酯(Sigma, G-7879)及0.208 M NADP+

(Sigma,N-0505)之輔因子混合物稀釋8倍。

製備含有目標物種(人類、小鼠、大鼠、狗.....)之1 mg/ml肝微粒體(Provider, Xenotech)、0.8 U/ml G6PDH及輔因子混合物(6.6 mM MgCl₂、6.6 mM葡萄糖-6-磷酸酯、2.6 mM NADP⁺)之工作溶液。在室溫下，將此混合物預培育15 min但不能超過20 min。

預培育之後，以相等量一起添加化合物稀釋液及含有微粒體之混合物並以300 rpm培育30 min。對於第0 min之時間點而言，向化合物稀釋液中添加2體積甲醇，然後添加微粒體混合物。培育期間之最終濃度為：3 μM測試化合物或對照化合物、0.5 mg/ml微粒體、0.4 U/ml G6PDH、3.3 mM MgCl₂、3.3 mM葡萄糖-6-磷酸酯及1.3 mM NaDP⁺。

在培育30 min之後，使用2體積甲醇終止反應。

在兩個時間點中，混合試樣，離心且收穫上清液以用於在LC-MS/MS上進行分析。儀器反應(即峰高)可參照零時間點試樣(100%)以測定剩餘化合物之百分比。在分析設計中包含標準化合物心得安(Propanolol)及維拉帕米(Verapamil)。

關於微粒體穩定性之數據表示為30 min後剩餘化合物總量之百分比。

肝細胞穩定性(100 μM 式II之[¹⁴C]-化合物在不同物種之肝細胞懸浮液中培育24 h後式II化合物及其主要代謝物之濃度(總放射活性%))

6.5. Caco2滲透性

如下文所闡述實施雙向Caco-2分析。Caco-2細胞係自歐洲動物細胞培養物收集中心(European Collection of Cell Cultures, ECACC, 目錄編號為86010202)獲得且在24孔Transwell板(Fisher TKT-545-020B)中進行21天之細胞培養後使用。

S

將 2×10^5 個細胞/孔接種於由DMEM + GlutaMAXI + 1% NEAA + 10% FBS (FetalClone II) + 1% Pen/Strep組成之平板培養基中。每2-3天更換培養基。

在含有25 mM HEPES (pH 7.4)之翰克司(Hanks')平衡鹽溶液中製備測試化合物及參照化合物(普萘洛爾(propranolol)及羅丹明(rhodamine) 123或長春鹼，所有化合物皆係自Sigma購得)且以10 μ M之濃度將其添加至Transwell板總成之頂室(125 μ L)或底側室(600 μ L)中，其中最終DMSO濃度為0.25%。

將50 μ M螢光黃(Sigma)添加至所有孔中之供體緩衝液中以藉由監測螢光黃滲透性來平均細胞層之完整性。因螢光黃(LY)不能自由滲透磷親脂性障壁，故高程度之LY轉運表明細胞層之完整性較差。

在37°C下於定軌振盪器中以150 rpm振盪培育1小時後，自頂室(A)及基底室(B)二者中取出70 μ L等分試樣並將其添加至96孔板中含有分析性內部標準物(0.5 μ M卡馬西平(carbamazepine))之100 μ L 50:50 乙腈:水溶液中。

使用Spectramax Gemini XS (Ex 426 nm及Em 538 nm)在含有來自底側及頂側之150 μ L液體的潔淨96孔板中量測螢光黃。

藉由高效液相層析/質譜(LC-MS/MS)量測試樣中之化合物濃度。

根據以下關係計算表觀滲透率(P_{app})值：

$$P_{app} = \frac{[\text{化合物}]_{\text{受體最終濃度}} \times V_{\text{受體}}}{([\text{化合物}]_{\text{供體初始濃度}} \times V_{\text{供體}}) / T_{\text{培育}} \times V_{\text{供體}} / \text{表面積}} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

V = 室體積

T_{inc} = 培育時間。

表面積 = 0.33 cm^2

使用 $P_{app} B > A / P_{app} A > B$ 之比率計算流出比來指示來自頂室表面之主動流出。

使用下列分析接受標準：

普蔡洛爾： P_{app} (A>B)值 $\geq 20(\times 10^{-6} \text{ cm/s})$

羅丹明123或長春鹼： P_{app} (A>B)值 $< 5 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ ，其中流出比 ≥ 5 。

螢光黃滲透率： $\leq 100 \text{ nm/s}$

6.6. 敗血性休克模型

注射脂多糖(LPS)會誘導向周圍快速釋放可溶腫瘤壞死因子(TNF- α)。使用此模型來分析有希望之活體內TNF釋放阻斷劑。

以預期投藥劑量(一次，po)處理每組6只BALB/cJ雌性小鼠(20 g)。30分鐘後，腹膜內注射LPS (15 $\mu\text{g/kg}$ ；大腸桿菌(*E. Coli*)血清型 0111:B4)。90分鐘後，使小鼠安樂死並收集血液。使用市售ELISA套組確定循環TNF α 含量。使用地塞米松(5 $\mu\text{g/kg}$)作為參照消炎化合物。

6.7. MAB模型

MAB模型允許快速評價治療劑對RA樣發炎症反應的調節(Khachigian LM. Nature Protocols (2006) 2512-2516: Collagen antibody-induced arthritis)。對DBA/J小鼠靜脈內注射針對膠原II之mAb混合劑。一天後，開始化合物處理(媒劑：10% (v/v) HP β CD)。三天後，小鼠接受腹膜內LPS注射(50 $\mu\text{g/小鼠}$)，從而導致發炎快速發作。繼續實施化合物處理直至mAb注射後10天為止。藉由量測爪腫脹並記錄各爪之臨床評分來對發炎實施讀取。呈現四肢之累積臨床關節炎評分以顯示發炎之嚴重性。使用0-4之量表對各肢體施用評分系統，其中4係最嚴重發炎。

0 無症狀

1 一類關節(例如踝或腕)輕微、但明顯充血且腫脹、或限於個別足趾之顯著充血及腫脹(不管受侵襲足趾之數量為多少)

5

- 2 兩類或更多類關節中度充血及腫脹
- 3 整個爪(包含足趾)嚴重充血及腫脹
- 4 肢體中多處關節出現最大發炎

6.8. 腫瘤學模型

Wernig等人，Cancer Cell 13, 311, 2008及Geron等人，Cancer Cell 13, 321, 2008闡述證實小分子對JAK2引發之骨髓組織增生性疾病之效能的活體內模型。

6.9. 小鼠IBD模型

Wirtz等人2007闡述證實小分子對IBD之效能的活體外及活體內模型。

6.10. 小鼠氣喘模型

Nials等人，2008；Ip等人2006；Pernis等人，2002；Kudlacz等人，2008闡述證實小分子對氣喘之效能的活體外及活體內模型。

最後註解

彼等熟習此項技術者將瞭解，前述說明係例示性及解釋性的，且意欲闡釋本發明及其較佳實施例。通過常規實驗，熟習此項技術者將意識到在不背離本發明之精神下可作出明顯修改及變化。因此，本發明並不意欲藉由以上說明來定義，而藉由隨附申請專利範圍及其等效物來定義。

本說明書引用之所有出版物(包含(但不限於)專利及專利申請案)皆以引用方式併入本文中，如同充分陳述之已特定地及個別地指明將各個出版物以引用方式併入本文中一般。

根據前述說明，彼等熟習此項技術者可對本發明之組合物及方法作出各種修改及改變。在隨附申請專利範圍之範疇內之所有該等修改皆意欲包含於本文中。

應理解，諸如各種化合物之差示細胞滲透能力等因素可促成活

體外生物化學及細胞分析中之化合物活性間的差異。

如本申請案中所給出及闡述之本發明化合物的至少某些化學名稱可藉由使用市售化學品命名軟體程式自動生成，但未經獨立驗證。實施此功能之代表性程式包含由 Open Eye Software 公司出售之 Lexichem 命名工具及由 MDL 公司出售之 Autonom Software 工具。在所指示化學名稱及所繪示結構不同之情況下，以所繪示結構為準。

本文所顯示之化學結構係使用 ChemDraw[®] 或 ISIS[®] /DRAW 製備。在本文結構中之碳、氧或氮原子上出現之任何空缺化合價皆表示存在氫原子。當結構中存在對掌性中心但該對掌性中心未顯示特定立體化學時，結構涵蓋與對掌性結構相關之兩個鏡像異構體。

参考文献

a) Vainchenker W. 等人 **2008** Seminars in Cell & Developmental Biology, 19, 385-393

b) Verstovsek 等人 **2009** Hematology Am Soc Hematol Educ Program., 636-42

c) Elie Dolgin 等人 **2011** Nature Reviews Drug Discovery, 10, 717-718

d) Smolen 等人 **2003** Nat Rev Drug Discov., 2, 473-88

e) Lee DM 等人 **2001** Lancet, 358, 903-11

f) Choy EH 等人 **2001** N Engl J Med., 344, 907-16

g) O'Dell JR. **2004** N Engl J Med., 350(25), 2591-602

h) Firestein GS. **2003** Nature, 423, 356-61

i) Kopf 等人 **2010** Nat. Rev. Drug Disc., 703-718

j) Zenz R 等人 **2005** Nature, 437 (7057), 369-75

k) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2004年11月18日) 「Guideline on Clinical Investigation of Medicinal

Products indicated for the treatment of Psoriasis」

1) Punwani等人，**2012** 「Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis」 J Am Acad Dermatol., 67, 4, 658-664

m) Zikherman等人**2011** J Clin Invest. 1(12), 4618-21

n) O'Sullivan等人**2007** Mol Immunol. 44(10), 2497-506

o) Xiang等人**2008** Blood 111-9, 4809-4812

p) Mullighan CG等人**2009** PNAS 106(23), 9414-9418

q) Zhang等人**1996** PNAS 93, 9148-9153

r) Constantinescu等人**2007** Trends in Biochemical Sciences 33(3), 122-131

s) Tam等人**2007** British Journal of Cancer 97, 378-383

t) Berishaj等人**2007**, Breast Cancer Research 9: R32

u) Naka等人**2002** Arthritis Res. 4 (增刊3):S233-S242

v) Ingersoll等人**2008** J Behav Med. 31(3), 213-224

w) Bundgard, H., Design of Prodrugs, 第7-9頁, 第21-24頁, Elsevier, Amsterdam **1985**

x) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, **1985**, 第8部分, Mack Publishing公司, Easton, Pennsylvania

y) T. W. Greene及P. G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, 第二版, Wiley, New York, **1991**

z) WO 2010/149769

aa) Sims NA等人**2004** Arthritis Rheum. 50, 2338-2346

bb) Jou等人**2005** Arthritis Rheum 52, 339-44

cc) Khachigian, L. M.等人**2006** Nature Protocols 1, 2512-6

dd) Lin HS等人**2007** Br J Pharmacol. 150(7), 862-872

- ee) Nishida K等人**2004** Arthritis Rheum. 10, 3365-76
- ff) Shelton DL等人**2005** Pain 116, 8-16
- gg) Argiles JM等人**1998** Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1, 245-51
- hh) Rall等人**2004** Rheumatology 43, 1219-23
- ii) Walsmith J等人**2004** J Rheumatol. 31, 23-9
- jj) Salvemini D等人**2001** Arthritis Rheum. 44, 2909-21
- kk) Bush KA等人**2002** Arthritis Rheum. 46, 802-5
- ll) Oste L等人, ECTC Montreal **2007**
- mm) Saharinen等人**2000** Mol. Cell. Biol. 20(10), 3387
- nn) Wernig等人**2008** Cancer Cell 13(4), 311-320
- oo) Geron等人**2008** Cancer Cell 13(4), 321-30
- pp) Wirtz 等人 **2007** Advanced Drug Delivery Reviews, 2007, 1073-1083
- qq) Nials等人**2008** Disease Models & Mechanisms, 213-220
- rr) Ip等人**2006** Clin. Exp. Immun, 162-172
- ss) Pernis等人**2002** J. Clin. Invest. 1279
- tt) Kudlacz等人**2008** Eur J Pharmacol 154-161
- uu) McGinnity等人 Drug Metabolism and Disposition **2004**, 32, 11, 1247。

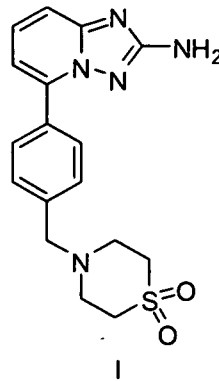
【符號說明】

無

申請專利範圍

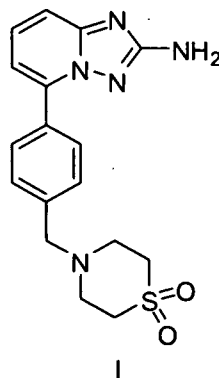
106年1月3日修正本

1. 一種式I化合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物或溶劑合物之醫藥上可接受之鹽之用途，



其用於製造藥劑。

2. 一種式I化合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物或溶劑合物之醫藥上可接受之鹽之用途，

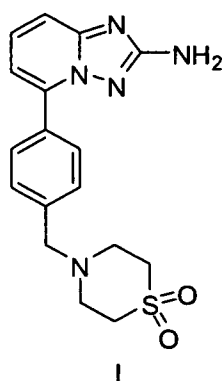


其用於製造用來治療以下疾病之藥劑：發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。

3. 如請求項2之用途，其中該藥劑係用於治療類風濕性關節炎。
4. 如請求項2之用途，其中該藥劑係用於治療發炎性腸病。
5. 如請求項2之用途，其中該藥劑係用於治療克羅恩氏病(Crohn's

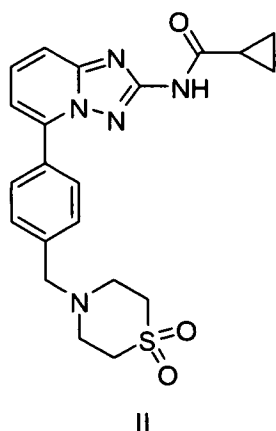
disease)及/或結腸炎。

6. 如請求項2之用途，其中該藥劑係用於治療關節黏連性脊椎炎、牛皮癬及/或牛皮癬性關節炎。
7. 如請求項1至6中任一項之用途，其中該藥劑進一步包括另一治療劑或與該另一治療劑組合。
8. 如請求項7之用途，其中該另一治療劑係類風濕性關節炎治療劑。
9. 一種醫藥組合物，其包括式I化合物：



及醫藥上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

10. 如請求項9之醫藥組合物，其另外包括另一治療劑。
11. 如請求項10之醫藥組合物，其中該另一治療劑係類風濕性關節炎治療劑。
12. 如請求項10之醫藥組合物，其中該另一治療劑具有式II：



13. 如請求項12之醫藥組合物，其中式I/式II之比率係1/5至1/20。
14. 如請求項12之醫藥組合物，其中式I/式II之比率係1/5至1/10。
15. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於藥品中。
16. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於治療發炎性病狀、自體免疫疾病、增生性疾病、過敏、移植排斥、涉及軟骨代謝損傷之疾病、先天性軟骨畸形及/或與IL6或干擾素分泌過多相關之疾病。
17. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於治療類風濕性關節炎。
18. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於治療發炎性腸病。
19. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於治療克羅恩氏病及/或結腸炎。
20. 如請求項9至14中任一項之醫藥組合物，其用於治療關節黏連性脊椎炎、牛皮癬及/或牛皮癬性關節炎。