



(21)申請案號：105137527

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 16 日

(51)Int. Cl.：

C07F9/564 (2006.01)

C07F9/24 (2006.01)

A61K31/675 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

C07B57/00 (2006.01)

B01D15/38 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/16 美國

62/255,905

2016/04/18 美國

62/324,259

(71)申請人：施瑞修德製藥公司(美國) THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：段建新 DUAN, JIAN-XIN (CN)；曹冶宇 CAO, YEYU (CN)；蔡曉宏 CAI,
XIAOHONG (CN)；矯海龍 JIAO, HAILONG (US)；馬靖原 MA, JING YUAN
(US)；馬特西馬克 MATTEUCCI, MARK (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：12 共 71 頁

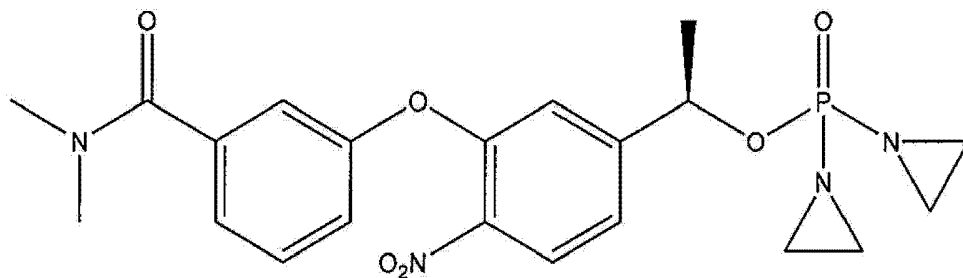
(54)名稱

(R)-及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙
(伸乙基)胺基磷酸酯、組合物及其使用及製備方法

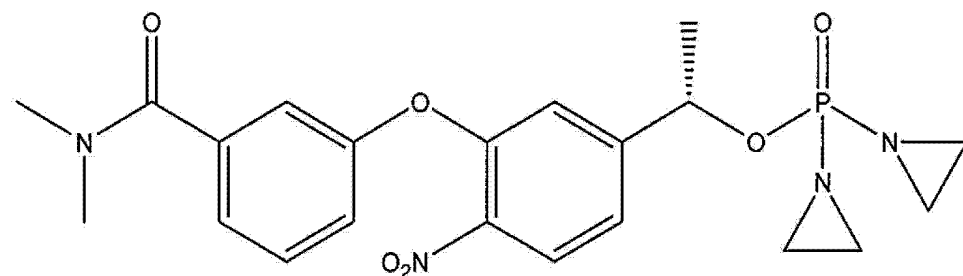
(R)- AND (S)-1-(3-(3-N,N-DIMETHYLAMINOCARBONYL)PHENOXYL-4-NITROPHENYL)-1-ETHYL-N,N'-BIS(ETHYLENE)PHOSPHORAMIDATE, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THEIR USE AND PREPARATION

(57)摘要

本文提供下式之光學活性化合物，

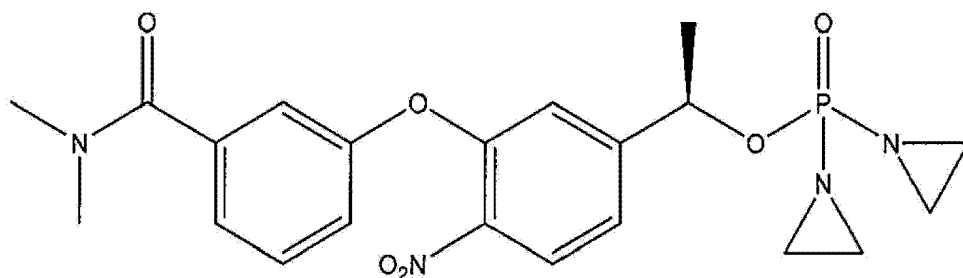


II 及

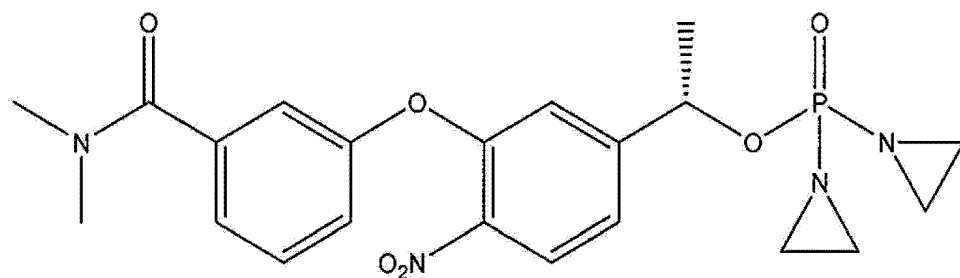


III，及其醫藥組合物。本文亦提供製造此等化合物及解析外消旋混合物或使其增濃其對映異構體之一以提供(R)-及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基氨基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯的方法，及包括投與此等化合物之治療癌症的方法。

Provided herein are optically active compounds of the formulae:

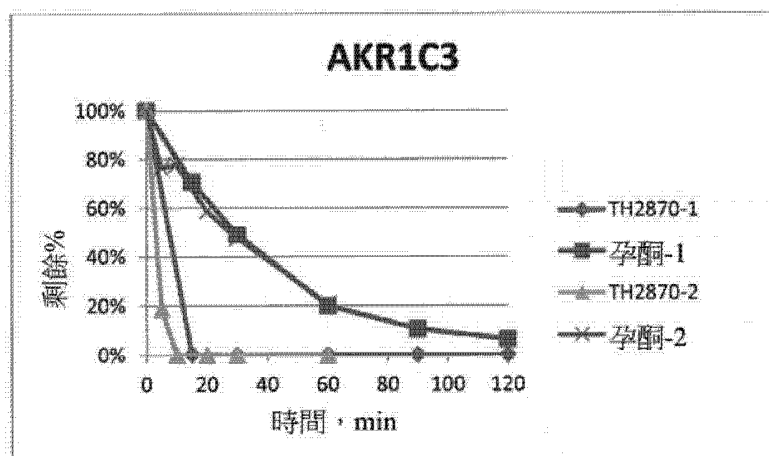


II; and



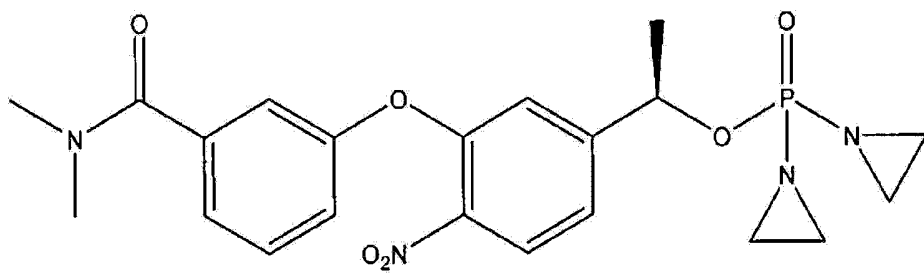
III and pharmaceutical compositions thereof. Also provided herein are processes of making these compounds and resolving the racemic mixture or the enrichment of same with in one of its enantiomers to provide (R)- and (S)-1-(3-(3-N,N-dimethylaminocarbonyl)phenoxy)-4-nitrophenyl)-1-ethyl-N,N'-bis(ethylene) phosphoramidate, and methods of treating cancer comprising administering such compounds.

指定代表圖：

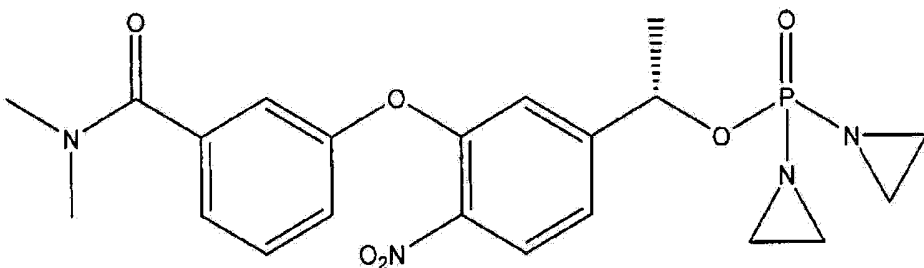


【圖2】

特徵化學式：



I



II

【發明說明書】

【中文發明名稱】

(R) - 及 (S) - 1 - (3 - (3 - N, N - 二甲基胺基羰基) 苯氧基 - 4 - 硝苯基) - 1 - 乙基 - N, N' - 雙(伸乙基)胺基磷酸酯、組合物及其使用及製備方法

【英文發明名稱】

(R)- AND (S)-1-(3-(3-N,N-DIMETHYLAMINOCARBONYL)PHENOXYL-4-NITROPHENYL)-1-ETHYL-N,N'-BIS(ETHYLENE)PHOSPHORAMIDATE, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THEIR USE AND PREPARATION

【技術領域】

本發明提供適合作為治療劑的光學活性形式之化合物1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯、此等化合物之醫藥組合物及治療癌症之方法，以及用於自化合物(R,S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯之外消旋混合物解析此等光學活性形式或增濃其對映異構體之一，或立體選擇性合成光學純(R)及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯的方法。

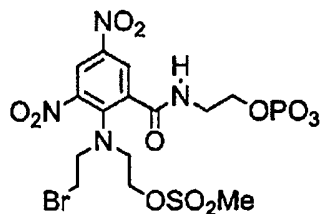
【先前技術】

癌症係造成人類發病及死亡之主要原因之一。因為難以在不損害或殺死正常細胞之情況下殺死癌細胞，所以癌症治療具有挑戰性。在癌症治療期間損害或殺死正常細胞會在患者體內引起不良副作用且可限制投與癌

症患者之抗癌藥物的量。

醛-酮還原酶家族1之成員C3 (AKR1C3)係人體中由AKR1C3基因編碼的一種酶。此基因編碼由超過40種已知酶及蛋白質組成之醛/酮還原酶超家族之成員。該等酶藉由利用NADH及/或NADPH作為輔因子，催化醛及酮轉化成其對應醇。

相對於正常細胞，許多癌細胞過度表現AKR1C3還原酶(參見例如，Cancer Res 2010；70:1573-1584, Cancer Res 2010；66: 2815-2825)。經展示，PR 104



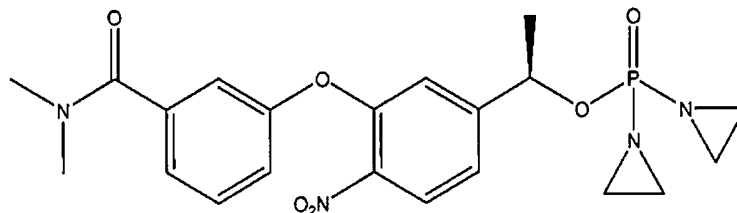
PR 104

為AKR1C3之較弱受質且在臨床試驗中進行測試。此化合物並非選擇性AKR1C3活化前藥，因為其亦可在低氧條件下活化。PR 104在臨床試驗中無效。

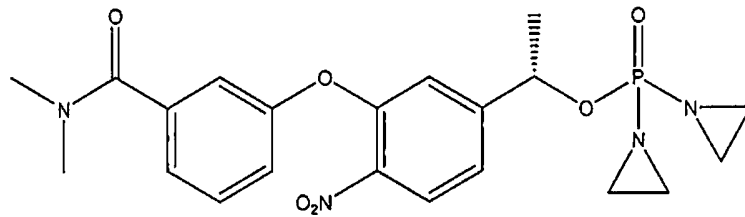
因此，仍需要適於治療癌症患者之化合物，包括用於治療癌症患者之選擇性AKR1C3還原酶活化前藥。本發明滿足此需要。

【發明內容】

在一個態樣中，本文提供式Ia及Ib之化合物：



Ia及



Ib,

或其同位素變體、溶劑合物或水合物。

本文中所提供之化合物包括個別對映異構體以及對映異構體之增濃混合物。

在另一態樣中，本文中提供一種醫藥組合物，其包含本文中所提供之化合物及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。在另一態樣中，本文中提供單位劑量的本文中所提供之醫藥組合物。

在另一態樣中，本文中提供一種用於治療患者之癌症的方法，該方法包含向患者投與治療有效量之如本文中所提供之化合物或醫藥學上可接受之組合物。在一個實施例中，癌症為這樣一種癌症，其中在此類癌症中，AKR1C3還原酶含量較高或高於常見含量。在一個實施例中，癌症為肝癌，且更特定言之為肝細胞癌(HCC)。在一個實施例中，癌症為非小細胞肺癌或黑素瘤。在一個實施例中，癌症為前列腺癌。在一個實施例中，癌症為乳癌。在一個實施例中，癌症為白血病。在一個實施例中，癌症為食道癌。在一個實施例中，癌症為腎癌、胃癌、結腸癌、腦癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巢癌、頭頸癌、子宮內膜癌、胰臟癌、肉瘤癌或直腸癌。在另一態樣中，該方法包含藉由使用AKR1C3抗體之方法測定癌症之AKR1C3還原酶含量，及若該含量等於或大於預定值，則向該患者投與治療有效量的本文中所提供之化合物或醫藥學上可接受之組合物。在一個態樣中，該方法包含在投與之前，測定自該患者分離之樣品中之腫瘤內AKR1C3還原酶含量，及若該含量等於或大於預定含量，則選擇該患者進

行治療。在一些實施例中，若該含量不超過或小於該預定值，則投與治療有效量之癌症治療劑，而非包含投與本文中所提供之化合物或醫藥學上可接受之組合物之治療劑。熟習此項技術者在閱讀本發明後且基於其所知之其他方法將對確定本文中所提供之化合物及組合物之治療有效量、適當投與模式的方法顯而易知。AKR1C3含量係遵循熟習此項技術者熟知之常規方法量測。

【圖式簡單說明】

圖1A至圖1C描繪用於在用65/35 CO₂/甲醇溶離之CHIRALPAK OZ-H 6×250 mm, 5 μm (Daicel)對掌性管柱上藉由對掌性高壓液相層析法解析1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯之兩種對映異構體的LC層析圖。

圖2說明與孕酮比較藉由醛酮還原酶AKR1C3活化TH 2870。

圖3說明肝癌細胞株中之AKR1C3表現。

圖4說明前列腺癌細胞株中之AKR1C3表現。

圖5說明各群組中之平均體重。

圖6說明各群組中之腫瘤負荷的典型螢光影像。

圖7說明各群組中之腫瘤生長曲線。

圖8說明各群組中之腫瘤負荷的螢光影像。

圖9說明不同群組中之平均腫瘤重量。

圖10說明不同群組中之體重變化。

圖11說明末梢血液中之腫瘤負荷生長曲線。

圖12說明不同群組中之終止點處之血液、脾及骨髓中之人類CD45抗體陽性百分比。

【實施方式】**定義**

提供以下定義以輔助讀者。除非另外定義，否則本文所使用之所有技術術語、符號以及其他科學或醫學術語或術語集意欲具有化學及醫學領域中之技術人員通常所理解的含義。在一些情況下，為了清楚起見及/或為便於參考，本文中對具有通常所理解之含義的術語進行定義，且本文中納入該等定義不應解釋為表示與此項技術中一般理解之該術語之定義存在相當大差異。

所有數值名稱，例如pH、溫度、時間、濃度及重量(包括其各自之範圍)為通常可適當地以(+)或(-) 0.1、1.0或10.0之增量變化的近似值。所有數值名稱可理解為在之前加有術語「約」。本文所描述之試劑為例示性的且其等效物可為此項技術中已知的。

除非上下文另外清楚地規定，否則「一種(a/an)」及「該(該等)」包括複數種參考物。因此，舉例而言，提及一種化合物係指一或多種化合物或至少一種化合物。因此，術語「一個(種)」、「一或多個(種)」及「至少一個(種)」在本文中可互換地使用。

術語「約(about)」或「大約(approximately)」意謂由本領域具有通常知識者測定的可接受特定值誤差，其部分視所述值如何量測或測定而定。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在1、2、3或4個標準差內。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在給定值或範圍之50%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.05%內。

如本文中所使用，術語「包含」欲意謂組合物及方法包括所述要

素，但不排除其他要素。當用於定義組合物及方法時，「主要由…組成」應意謂排除對於該組合物或方法具有稍許重要意義的其他要素。「由…組成」應意謂所主張之組合物及大致方法步驟不包括超過痕量的其他成分要素。由此等過渡術語中之每一者限定的實施例在本發明之範疇內。因此，預期該等方法及組合物可包括額外步驟及組分(包含)，或替代地包括不重要的步驟及組合物(主要由…組成)，或替代地僅預期所陳述之方法步驟或組合物(由…組成)。

「離去基」係指可在熟習此項技術者熟知之親核置換條件下經置換的部分。離去基團包括(但不限於)鹵基及 $-\text{OSO}_2-\text{R}^{20}$ ，其中 R^{20} 為視情況經取代之烷基、芳基、環烷基、雜環基或雜芳基。

向患者「投與(Administering)」藥物或藥物向患者「之投與(administration of)」(及此片語之文法等效物)係指直接投與，此可為由醫學專業人員向患者投與或可為自投藥；及/或間接投與，此可為開具藥物處方之操作。舉例而言，指導患者自行投與藥物及/或向患者提供藥物處方之醫師將向患者投與藥物。

「癌症」係指可藉由侵襲局部擴大且藉由轉移全身性地擴大來潛在地無限生長的白血病、淋巴瘤、癌瘤及其他惡性腫瘤，包括實體腫瘤。癌症之實例包括(但不限於)腎上腺癌、骨癌、腦癌、乳癌、支氣管癌、結腸癌及/或直腸癌、膽囊癌、頭頸癌、腎癌、喉癌、肝癌、肺癌、神經組織癌症、胰臟癌、前列腺癌、副甲狀腺癌、皮膚癌、胃癌及甲狀腺癌。癌症之某些其他實例包括急性及慢性淋巴細胞及顆粒細胞瘤、腺癌、腺瘤、基底細胞癌、子宮頸異常增生及原位癌、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、表皮樣癌、巨細胞瘤、多形性神經膠母細胞瘤、毛細胞腫瘤、腸神經節細胞

瘤、增生性角膜神經腫瘤、胰島細胞癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、平滑肌瘤、白血病、淋巴瘤、惡性類癌、惡性黑色素瘤、惡性高鈣血症、馬方氏症體型腫瘤(marfanoid habitus tumor)、髓性癌、轉移性皮膚癌、黏膜神經瘤、骨髓瘤、蕈樣真菌病、神經母細胞瘤、骨肉瘤、成骨肉瘤及其他肉瘤、卵巢腫瘤、嗜鉻細胞瘤、真性紅血球過多症、原發性腦腫瘤、小細胞肺腫瘤、潰瘍型及乳頭型鱗狀細胞癌、增生、精原細胞瘤、軟組織肉瘤、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、腎細胞腫瘤、局部皮膚病變、骨網狀細胞肉瘤及威爾姆氏腫瘤(Wilm's tumor)。

術語「接觸(contacting/contact)」意指使治療劑與細胞或組織在一起，使得作為此類接觸之結果而產生生理學及/或化學作用。接觸可活體外、離體或活體內進行。在一個實施例中，治療劑與細胞培養物(活體外)中之細胞接觸以測定治療劑對細胞之作用。在另一實施例中，治療劑與細胞或組織之接觸包括向具有待接觸之細胞或組織之個體投與治療劑。

術語「光學活性」及「對映異構性活性」係指分子之集合，其具有不低於約10%、不低於約20%、不低於約30%、不低於約40%、不低於約50%、不低於約60%、不低於約70%、不低於約80%、不低於約90%、不低於約91%、不低於約92%、不低於約93%、不低於約94%、不低於約95%、不低於約96%、不低於約97%、不低於約98%、不低於約99%、不低於約99.5%、不低於約99.8%或不低於約99.9%之對映異構體過量。在某些實施例中，光學或對映異構性活性化合物之對映異構體過量不低於約90%、不低於約95%、不低於約98%或不低於約99%。

在描述光學活性化合物時，使用前綴R及S來表示分子圍繞其對掌性中心之絕對組態。(+)及(-)用於表示化合物之旋光度，亦即偏光平面由光

學活性化合物旋轉之方向。(-)前綴指示化合物為左旋性，亦即化合物向左或逆時針旋轉偏光平面。(+)前綴指示化合物為右旋性，亦即化合物向右或順時針旋轉偏光平面。然而，旋光度之符號(+)及(-)與分子之絕對組態R及S無關。

術語「光學純」及「對映異構性純」係指分子之集合，其具有不低於約80%、不低於約90%、不低於約91%、不低於約92%、不低於約93%、不低於約94%、不低於約95%、不低於約96%、不低於約97%、不低於約98%、不低於約99%、不低於約99.5%、不低於約99.8%或不低於約99.9%之對映異構過量(ee)。在某些實施例中，光學或對映異構性純化合物之對映異構體過量不低於約90%、不低於約95%、不低於約98%或不低於約99%。化合物之對映異構體過量可由供一般熟習此項技術者使用之任何標準方法判定，該等方法包括(但不限於)使用光學活性固定相的對掌性層析法(氣相層析法、高效液相層析法及薄層層析法)、同位素稀釋法、電泳法、量熱法、旋光測定法、藉由對掌性衍生作用的NMR解析方法及藉由對掌性溶劑化劑或對掌性位移試劑的NMR方法。

術語「大體上純」及「大體上均質」意謂足夠均質以呈現不含如藉由供一般熟習此項技術者使用之標準分析方法所測定之可易於檢測之雜質，該等方法包括(但不限於)薄層層析法(TLC)、凝膠電泳、高效液相層析法(HPLC)、氣相層析法(GC)、核磁共振(NMR)及質譜法(MS)；或足夠純以使得進一步純化將不會可檢測地改變物理屬性、化學屬性、生物屬性及/或藥理學屬性，諸如物質之酶及生物活性。在某些實施例中，「大體上純」或「大體上均質」指代分子之集合，其中分子之按重量計至少約50%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約

98%、至少約99%、或至少約99.5%為化合物之單一立體異構體，如藉由標準分析方法所測定。

術語「同位素變體」係指在組成此類化合物之原子中之一或多者處含有非天然比例之同位素的化合物。在某些實施例中，化合物之「同位素變體」含有非天然比例之一或多種同位素，包括(但不限於)氫(^1H)、氘(^2H)、氚(^3H)、碳-11(^{11}C)、碳-12 (^{12}C)、碳-13 (^{13}C)、碳-14 (^{14}C)、氮-13 (^{13}N)、氮-14 (^{14}N)、氮-15 (^{15}N)、氧-14 (^{14}O)、氧-15 (^{15}O)、氧-16 (^{16}O)、氧-17 (^{17}O)、氧-18 (^{18}O)、氟-17 (^{17}F)、氟-18 (^{18}F)、磷-31 (^{31}P)、磷-32 (^{32}P)、磷-33 (^{33}P)、硫-32 (^{32}S)、硫-33 (^{33}S)、硫-34 (^{34}S)、硫-35 (^{35}S)、硫-36 (^{36}S)、氯-35 (^{35}Cl)、氯-36 (^{36}Cl)、氯-37 (^{37}Cl)、溴-79 (^{79}Br)、溴-81 (^{81}Br)、碘-123 (^{123}I)、碘-125 (^{125}I)、碘-127 (^{127}I)、碘-129 (^{129}I)及碘-131 (^{131}I)。在某些實施例中，化合物之「同位素變體」呈穩定形式，亦即非放射性。在某些實施例中，化合物之「同位素變體」含有非天然比例之一或多種同位素，包括(但不限於)氫(^1H)、氘(^2H)、碳-12 (^{12}C)、碳-13 (^{13}C)、氮-14 (^{14}N)、氮-15 (^{15}N)、氧-16 (^{16}O)、氧-17 (^{17}O)、氧-18 (^{18}O)、氟-17 (^{17}F)、磷-31 (^{31}P)、硫-32 (^{32}S)、硫-33 (^{33}S)、硫-34 (^{34}S)、硫-36 (^{36}S)、氯-35 (^{35}Cl)、氯-37 (^{37}Cl)、溴-79 (^{79}Br)、溴-81 (^{81}Br)及碘-127 (^{127}I)。在某些實施例中，化合物之“同位素變體”呈不穩定形式，亦即放射性。在某些實施例中，化合物之「同位素變體」含有非天然比例之一或多種同位素，包括(但不限於)氚(^3H)、碳-11 (^{11}C)、碳-14 (^{14}C)、氮-13 (^{13}N)、氧-14 (^{14}O)、氧-15 (^{15}O)、氟-18 (^{18}F)、磷-32 (^{32}P)、磷-33 (^{33}P)、硫-35 (^{35}S)、氯-36 (^{36}Cl)、碘-123 (^{123}I)、碘-125 (^{125}I)、碘-129 (^{129}I)及碘-131 (^{131}I)。應理

解，在如本文中提供之化合物中，在根據熟習此項技術者之判斷為可行時，任何氫可為例如 ^2H ，或任何碳可為例如 ^{13}C ，或任何氮可為例如 ^{15}N ，及任何氧可為 ^{18}O 。在某些實施例中，化合物之「同位素變體」含有非天然比例之氬。

片語「其同位素變體；或其醫藥上可接受之鹽、溶合物、水合物或前藥」具有與片語「其中所提及之化合物之同位素變體；或其中所提及化合物之醫藥上可接受之鹽、溶合物或前藥或其中所提及化合物之同位素變體」相同的含義。

「患者」與「個體」可互換地使用，以指代需要癌症治療之哺乳動物。通常，患者為人類。通常，患者為經診斷具有癌症之人類。在某些實施例中，「患者」或「個體」可指代用於篩選、表徵及評價藥物及療法之非人類哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、犬、貓、兔、豬、小鼠或大鼠。

術語「醫藥學上可接受之載劑」、「醫藥學上可接受之賦形劑」、「生理學上可接受之載劑」或「生理學上可接受之賦形劑」係指醫藥學上可接受之材料、組合物或媒劑，諸如液體或固體填充劑、稀釋劑、溶劑或囊封材料。在一個實施例中，各組分在與醫藥調配物之其他成分相容之意義上為「醫藥學上可接受的」，且適用於與人類及動物之組織或器官接觸而無過度毒性、刺激、過敏反應、免疫原性或與合理益處/風險比相匹配之其他問題或併發症。參見 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版；Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pa., 2005；Handbook of Pharmaceutical Excipients，第6版；Rowe等人編；The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association:

2009 ; Handbook of Pharmaceutical Additives, 第3版 ; Ash及Ash編 ; Gower Publishing Company: 2007 ; 及 Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 第2版 ; Gibson編 ; CRC Press LLC: Boca Raton, Fla, 2009 。

「前藥」係指一種化合物，其在投與之後代謝或以其他方式轉化為關於至少一種特性之生物活性或更具活性之化合物(或藥物)。相對於藥物，前藥以一定方式經化學改質，該方式使其相對於藥物活性較低或無活性，但化學改質使得在投與該前藥之後，藉由代謝或其他生物方法產生相應藥物。相對於活性藥物，前藥可具有改變的代謝穩定性或轉運特徵、更少副作用或更低毒性，或改良之香味(例如，參見參考文獻Nogrady, 1985, Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York，第388頁至392頁，其以引用的方式併入本文中)。前藥可使用除相應藥物外之反應物合成。

「實體腫瘤」係指包括(但不限於)骨骼、腦、肝、肺、淋巴結、胰臟、前列腺、皮膚及軟組織(肉瘤)中之轉移性腫瘤的實體腫瘤。

術語「溶劑合物」係指由溶質(例如，本文中所提供之化合物)之一或多個分子及溶劑(其以化學計量或非化學計量之量存在)之一或多個分子形成的複合物或聚集物。適合的溶劑包括(但不限於)水、甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇及乙酸。在某些實施例中，溶劑為醫藥學上可接受的。在一個實施例中，複合物或聚集物呈結晶形式。在另一實施例中，複合物或聚集物呈非結晶形式。當溶劑為水時，溶劑合物為水合物。水合物之實例包括(但不限於)半水合物、單水合物、二水合物、三水合物、四水合物及五水合物。

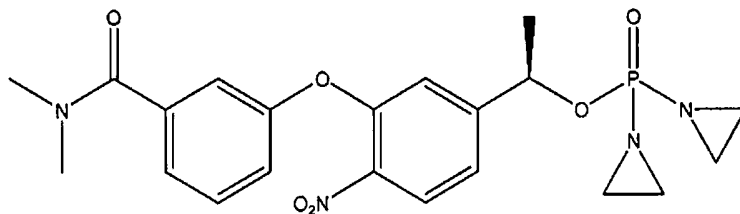
藥物之「治療有效量」係指當投與癌症患者時，經具有預期治療效果(例如緩解、改善、緩和或消除在患者體內之癌症之一或多種表現)的藥物之量。治療作用在投與一次劑量時未必會發生，且可能僅在投與一系列劑量之後發生。因此，可在一或多次投與中投與治療有效量。

「治療」病況或患者、病況或患者「之治療」或「之療法」係指採取步驟以獲得有益的或所需的結果，包括臨床結果。出於本發明之目的，有益的或所需的臨床結果包括(但不限於)癌症之一或多種症狀之緩解或改善；疾病程度之減輕；疾病進展之延遲或減緩；疾病病況之改善、緩和或穩定；或其他有益的結果。在一些情況下，癌症之治療可引起部分反應或穩定疾病。

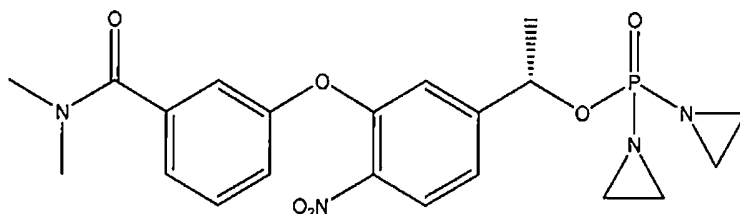
「腫瘤細胞」係指任何適當物種(例如哺乳動物，諸如鼠類、犬類、貓類、馬類或人類)之腫瘤細胞。

描述性實施例

本文中提供式Ia及Ib之化合物：



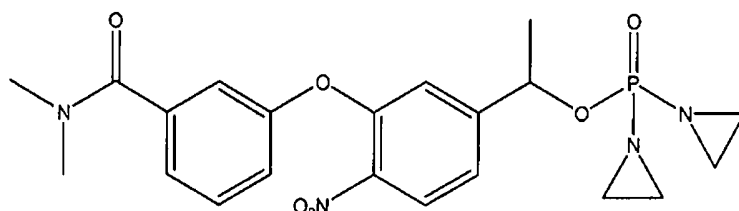
Ia及



Ib，

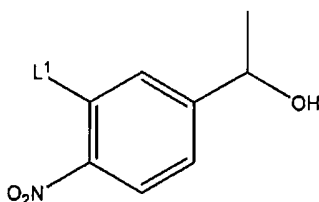
或其同位素變體、溶劑合物或水合物。

在另一態樣中，本文中提供製備式I化合物之方法：



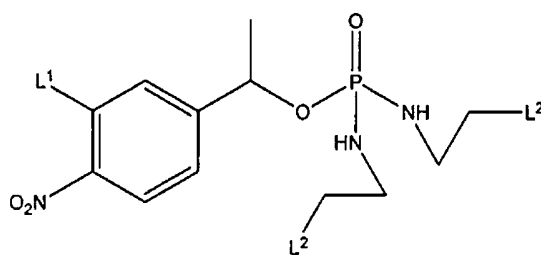
I

其包含使式II化合物



II

與 POCl_3 及 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{L}^2$ 或其鹽接觸，以提供式III化合物，



III

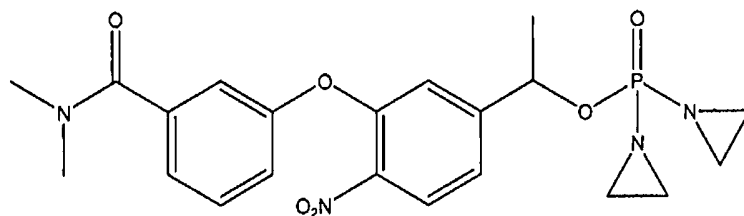
其中 L^1 及 L^2 分別為離去基，且接著採用式III化合物以提供式I化合物。

用於合成本文中所提供之化合物的某些方法提供於本文中。熟習此項技術者基於對其熟知之合成方法之改編以及其中試劑及反應物之替代將顯而易知用於合成該等及其他本文中所提供之化合物的其他方法。參見(例如) Hay 等人，*J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2456-2466 及 Hu 等人，*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 3986-3991。可用於製備本文中所提供之化合物之起始材料為可商購的或可遵循常規方法製備。反應通常在惰性溶劑中進行且必要時進行加熱。熟習此項技術者將易於理解，某些反應可能需要使用保護基。保護基為熟習此項技術者所熟知

的且描述(例如)於Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. Peter G. M. Wuts及Theodora W. Greene, 第4版或後續版本, John Wiley & Sons, Inc., 2007中。反應產物可遵循諸如結晶、沈澱、蒸餾及/或層析法之常規方法進行分離。化合物或中間物之純度可使用諸如¹H-NMR、HPLC、TLC及類似者之熟知方法確定。

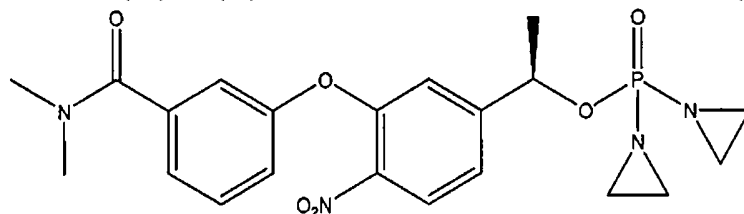
在另一實施例中,本發明係關於用於光學解析式I化合物的方法。鑒於本發明之式Ia及Ib化合物之醫藥學重要性,使用有效的工業製程且尤其以較佳產率及藉由極佳化學及對映異構體純度解析式I化合物為必不可少的。

本申請人研發出用於光學解析式I化合物之方法,該方法使得有可能獲得具有較佳特徵之產率及化學製品及對映異構體純度的式Ia及Ib化合物。本發明之方法使得有可能以具有較高生產率之極佳的對映異構體過量及以極佳的產率獲得式I化合物之任一對映異構體,同時節省所使用之溶劑。更具體言之,本發明係關於用於光學解析式I化合物的方法:

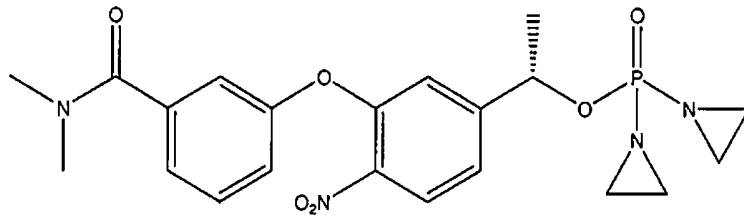


I

以得到絕對組態(R)及(S)之其對映異構體,分別為式(Ia)及(Ib):



Ia及



Ib

其中藉由對掌性層析法將式I化合物之外消旋或對映異構性增濃混合物分離成其兩種對映異構體，式(Ia)之(R)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯及式(Ib)之(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯。

光學解析應理解為意指分離外消旋混合物或彼等兩種對映異構體之任何混合物之兩種對映異構體。

外消旋混合物應理解為意指兩種對映異構體依55:45至45:55之比率，較佳地依50:50之比率的混合物。

對映異構性增濃混合物應理解為意指兩種對映異構體依55:45至90:10之間變化的比率含有顯著更多其中一種對映異構體之混合物。

對掌性層析法應理解為意指可以利用對掌性固定相及由溶劑或溶劑與氣體之混合物組成的流動相來分離混合物之對映異構體的過程。

根據本發明的實施例中之一者，用於對掌性層析法之固定相包含以官能化多醣浸漬之矽膠。

在一個實施例中，用於對掌性層析法之流動相包含醇及有機氣體之混合物。在可用於對掌性層析法之醇中，可提及(但不意味限於)異丙醇、乙醇及甲醇。在一個實施例中，用於對掌性層析法之醇為甲醇。

在可用於對掌性層析法之有機氣體中，可提及(但不意味限於)可在高壓下使用之有機氣體。較佳地使用之有機氣體為CO₂。在一個實施例中，

用於對掌性層析法之流動相包含甲醇及CO₂之混合物。在本發明的一個實施例中，用於對掌性層析法之流動相包含比率自50:50至2:98變化之甲醇及CO₂之混合物。

在本發明的一個實施例中，再循環用於對掌性層析法之流動相。在本發明的一個實施例中，在15°C至40°C（包含端點）之溫度下進行對掌性層析法。在本發明的一個實施例中，對之式(I)之1:1之外消旋混合物進行光學解析。在本發明之實施例中之一者中，使用1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯之(R)-對映異構體。根據本發明之實施例中之一者，使用1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯之(S)-對映異構體。

根據本發明之一個實施例，使用連續性多管柱分離方法。

根據本發明之另一實施例，使用模擬移動床層析法方法。模擬移動床層析法應理解為意指連續性層析法，該方法使得有可能模擬固定相在與流動相之移動之相反方向上移動。此方法使得有可能分離難以或不可能藉由習知層析法技術分離之化合物。當使用對掌性固定相時，此方法尤其適用於分離對映異構體。使用模擬移動床層析法使得有可能進行具有較高生產率之對映異構體之混合物的連續性解析，同時減少與非連續性層析法相比較所使用之固定及流動相之量。

所使用之縮寫清單

DMF：二甲基甲醯胺

TEA：三乙胺

RT：室溫

IPM：異磷醯胺氮芥

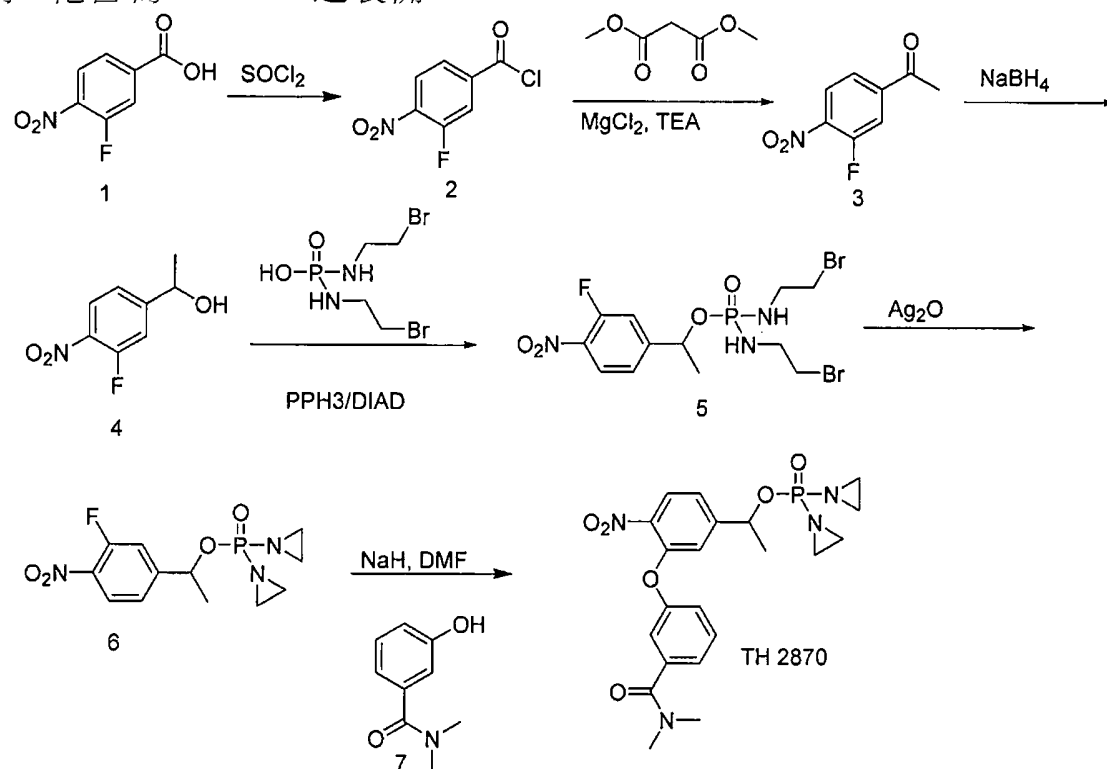
THF：四氫呋喃

DIAD：偶氮二甲酸二異丙酯

下文中之實例說明本發明。

實例

實例1. 化合物TH 2870之製備



如下文所描述合成化合物2至6。

a. 化合物3之合成：

在具有DMF (3滴)之SOCl₂ (10 mL)中回流化合物1 (3 g, 16.2 mmol) 3 h且接著在真空下移除SOCl₂。用甲苯(5 mL)稀釋殘餘物且不將其經進一步純化即用於後續步驟。

在RT下攪拌MgCl₂ (930 mg, 9.8 mmol)、TEA (4.7 mL, 33.4 mmol)及丙二酸二甲酯(1.9 mL, 16.6 mmol)1.5 h, 繼而添加上文所提及之化合物2之甲苯溶液。在RT下再攪拌所得混合物1.5 h, 接著所添加濃

HCl (4 mL) 且攪拌5分鐘。用EtOAc (30 mL×3) 萃取混合物，乾燥 (Na₂SO₄)，過濾且在減壓下濃縮。向殘餘物添加6N HCl (30 mL) 且將混合物回流隔夜。用EtOAc (30 mL×3) 萃取混合物，乾燥 (Na₂SO₄)，過濾且在減壓下濃縮。經由FCC (矽膠，EtOAc/己烷) 純化殘餘物以得到呈淡黃色固體狀之化合物**3** (1.9 g，63%產率)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H)、7.86 (t, d = 9.2 Hz, 2H)、2.68 (s, 3H) ppm。

b. 化合物**4**之合成

在-10°C下向化合物**3** (1.9 g，10.4 mmol) 於MeOH (20 mL) 中之混合物逐份添加NaBH₄ (418 mg，11 mmol)。在-10°C與0°C之間攪拌混合物20分鐘，用EtOAc (300 mL) 稀釋，用飽和NH₄Cl水性溶液、鹽水洗滌，乾燥 (Na₂SO₄)。過濾且在減壓下濃縮。經由FCC (矽膠，EtOAc/己烷) 純化殘餘物以得到呈淡黃色油狀之化合物**4** (1.44 g，75%產率)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.06 (t, J = 8.4 Hz, 1H)、7.35 (d, J = 11.6 Hz, 1H)、7.30 (d, J = 11.6 Hz, 1H)、5.01-4.99 (m, 1H)、1.52 (d, J = 6.4 Hz, 3H) ppm。

c. 化合物**5**之合成

在0°C下向化合物**4** (1.44 g，7.78 mmol)、Br-IPM (2.88 g，9.34 mmol)、PPh₃ (3.06 g，11.67 mmol) 於THF (60 mL) 中之混合物添加DIAD (2.34 g，11.67 mmol)。在0°C下攪拌混合物1.5 h，在減壓下濃縮且經由FCC (矽膠，EtOAc/己烷) 純化以得到呈淡黃色油狀之化合物**5** (1.0 g，27%產率)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.09 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、8.31 (dd,

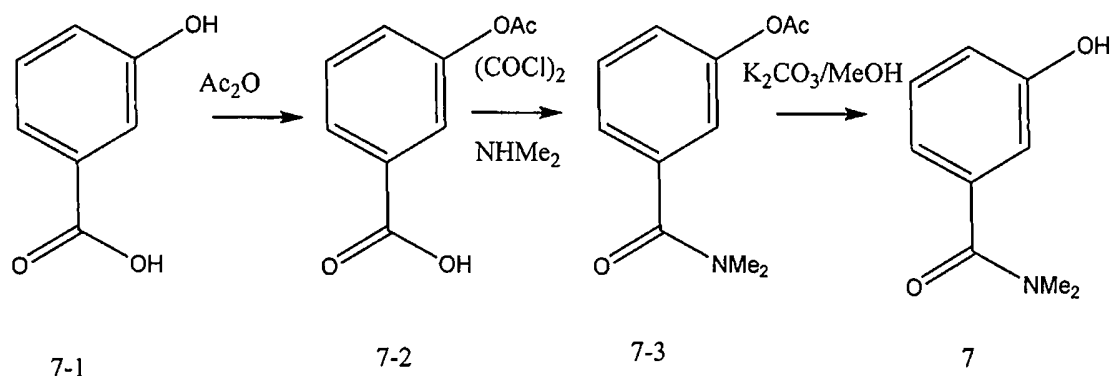
$J = 2.4, 13.6 \text{ Hz}, 2\text{H}$ 、 $5.52\text{-}5.60 \text{ (m, 1H)}$ 、 $3.54\text{-}3.19 \text{ (m, 8H)}$ 、 $1.63 \text{ (d, } J = 6.4 \text{ Hz, 3H)}$ ppm。

d. 化合物6之合成

在 65°C 下攪拌化合物5 (1 g, 2.1 mmol)及 Ag_2O (3 g)於THF (50 mL)中之混合物3 h。過濾且在減壓下濃縮。經由FCC (矽膠, 丙酮/己烷)純化殘餘物以得到呈黃色固體狀之化合物6 (0.6 g, 90%產率)。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.08 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、7.36 (d, $J = 11.6 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、7.31(d, $J = 8.4 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、5.70-5.67 (m, 1H)、2.25-2.08 (m, 8H)、1.64 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}, 3\text{H}$)ppm。

e. 化合物7之製備



化合物7-2之製備

在 0°C 下逐滴向化合物7-1 (150 g, 1.08 mol)於吡啶(700 mL)中之溶液添加 Ac_2O (562 mL, 1.5 eq), 在室溫下攪拌6小時。蒸發, 倒入冰水中, 過濾後, 乾燥濾餅以得到呈白色固體狀之化合物7-2 (150 g, 74%產率)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 8.00~7.98 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、8.03(s, 1H)、7.83(s, 1H)、7.51~7.47 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、7.36~7.34 (dd, $J = 8.0 \text{ Hz } 1.2 \text{ Hz}, 1\text{H}$)、2.34 (s, 3H)。

化合物7-3之製備

向化合物7-2 (150 g, 833 mmol)於DCM (1500 mL)中之溶液添加DMF (15 mL), 冷卻至0°C, 繼而添加草醯氯(225 mL, 2.50 mol), 在室溫下攪拌4小時。蒸發後, 將殘餘物溶解於DCM (1000 mL)中, 冷卻至0°C, 繼而添加二甲胺於THF (900 mL, 1.8 mol)中之2 M溶液, 在室溫下攪拌20小時。用H₂O (1500 mL)淬滅, 用DCM (2000 mL×3)萃取, 蒸發以得到呈淡黃色液態之粗化合物7-3 (137 g, 80%產率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.43~7.39 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、7.29~7.28(d, J = 7.6 Hz, 1H)、7.17~7.13 (m, 2H)、3.00(s, 6H), 2.32(s, 3H)。

化合物7之製備

向化合物7-3 (137 g, 661 mmol)於MeOH (1000 mL)中之溶液添加K₂CO₃ (276 g, 2 mol), 在室溫下攪拌5小時。過濾後, 蒸發濾過物。將殘餘物溶解於H₂O (1000 mL)中, 用4N HCl將其酸化至PH 6.0, 過濾後, 乾燥濾餅以得到呈白色固體狀之化合物7 (60 g, 55%產率)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 8.25 (s, 1H)、7.19~7.15(d, J = 8.0 Hz, 1H)、6.96~6.95 (t, J = 2.0 Hz, 1H)、6.84~6.81 (s, 2H)、3.11(s, 3H)、2.96(s, 3H)。

f. TH 2870之合成

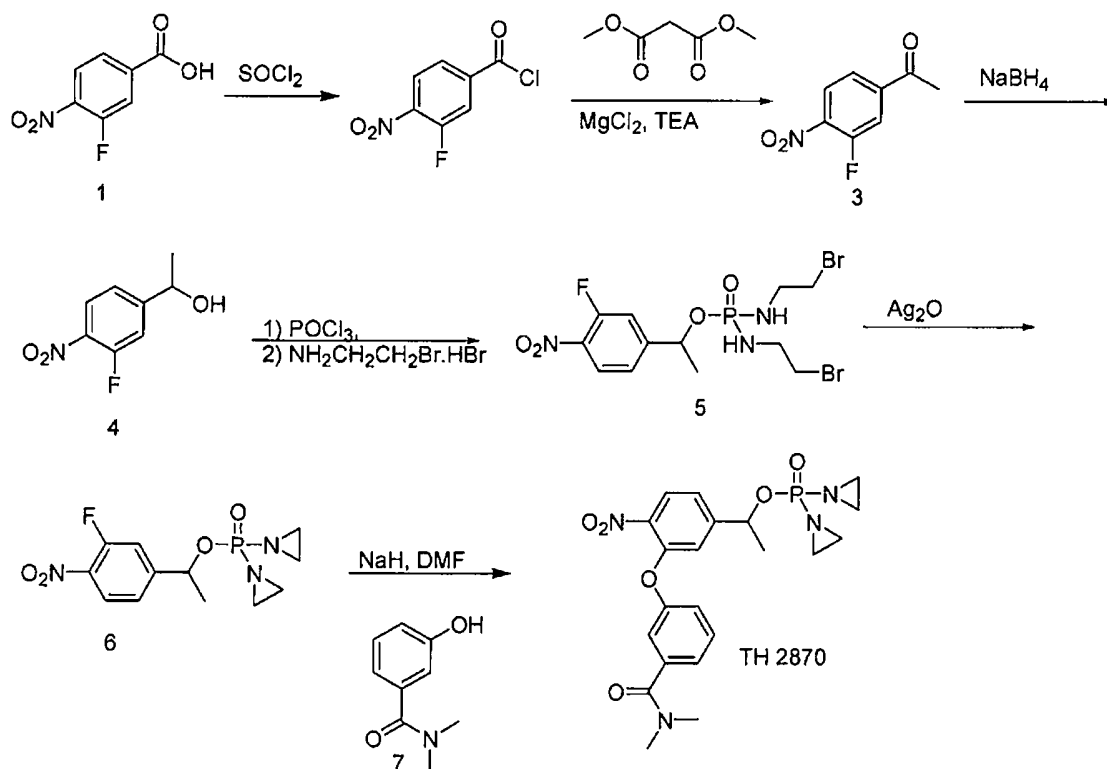
在0°C下向化合物7於DMF (60 mL)中之混合物逐份添加NaH (60%, 0.508 g, 12.7 mmol)。在0°C下攪拌混合物0.5 h, 隨後添加化合物6 (2 g, 6.35 mmol)且接著在0°C下攪拌2.5 h。用EtOAc (500 mL)稀釋混合物, 用鹽水(50 mL×3)洗滌, 經Na₂SO₄乾燥, 過濾, 在減壓下濃縮且經由FCC (矽膠, 丙酮/己烷)純化以得到呈黃色油狀物之TH 2870。

TH 2870之最終純化：

經由半製備型HPLC (C18管柱，乙腈/水)純化如上文所提及之TH 2870。在減壓下濃縮經合併集合以得到作為最終產物之淡黃色油狀物。將乙腈添加至作為共沸劑之蒸發物以移除水。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ ppm 7.98~7.96(d, $J = 8.4$ Hz, 1H) 、 7.43~7.39(m, 1H) 、 7.27~7.21(m, 2H) 、 7.10~7.06(m, 3H) 、 5.62~5.55(m, 1H) 、 3.09(s, 3H) 、 2.97(s, 3H) 、 2.19~2.00(m, 8H) 、 1.58~1.57(d, $J = 6.4$ Hz, 3H) 。 MS : m/z 460.8[M+1]⁺ 。 PLC : 254 nm : 94.8% 。

實例2. 化合物TH 2870之替代性製備。



a. 化合物3之製備

在具有DMF (10 ml)之 SOCl_2 (700 mL)中回流化合物1 (200 g, 1.08 mol)3小時且接著在真空下移除 SOCl_2 。用甲苯(400 mL)稀釋殘餘物且不

將其經進一步純化即用於後續步驟。

在RT下攪拌MgCl₂ (103 g, 1.08 mol)、TEA (500 mL, 3.60 mol)及丙二酸二甲酯(145 g, 1.1 mol)之混合物1.5小時，隨後逐滴添加上文所提及之化合物2之甲苯溶液。在RT下再攪拌所得混合物1.5小時。用H₂O (2 L)洗滌，用EtOAc (2 L×5)萃取，蒸發後，添加4N HCl直至PH 6.0且攪拌5分鐘。用EtOAc (2 L×5)萃取混合物，蒸發。

向殘餘物添加6N HCl (1500 mL)且將混合物回流隔夜。

用EtOAc (2 L×5)萃取混合物，濃縮，藉由矽膠管柱(石油醚：EtOAc=20:1)純化以得到呈黃色固體狀之化合物3 (80 g, 41%產率)。

b. 化合物4之製備

在-10°C下向化合物3 (150 g, 824 mol)於MeOH (2 L)中之混合物逐份添加NaBH₄ (31.2 g, 824 mmol)。在-10°C與0°C之間攪拌混合物20分鐘，用EtOAc (5 L)稀釋，用飽和NH₄Cl水性溶液、鹽水洗滌，經Na₂SO₄乾燥，濃縮。藉由矽膠管柱(石油醚：EtOAc=5:1)純化殘餘物以得到呈黃色油狀物之化合物4 (90 g, 60%產率)。

c. 化合物5之製備

向POCl₃ (2 ml, 21.6 mmol)於DCM (20 ml)中之溶液添加化合物4 (2 g, 10.8 mmol)，接著在-40°C，在N₂下添加含TEA (3.6 ml, 27 mmol)之DCM (10 ml)，在-40°C下攪拌5小時。接著添加2-溴乙胺氫溴酸鹽(17.6 g, 86.8 mmol)，在-40°C下將含TEA (12 ml, 86.8 mmol)之DCM (40 ml)緩慢添加至上述溶液中，攪拌0.5 h。添加K₂CO₃ (10%，10.4 g, 100 ml)，在室溫下攪拌5分鐘。用DCM (300 ml×3)萃取，蒸發，藉由矽膠管柱(EtOAc)純化以得到呈黃色油狀物之化合物5 (2.3 g, 43%產率)。

d. 化合物6之製備

在65°C下攪拌化合物5 (4 g, 8.42 mmol)及Ag₂O (5.85 g, 25.26 mmol)於THF (40 ml)中之混合物3小時，過濾及濃縮。藉由矽膠管柱(EtOAc)純化殘餘物以得到呈黃色油狀物之化合物6 (2.3 g, 87%產率)。

e. 化合物TH2870之製備

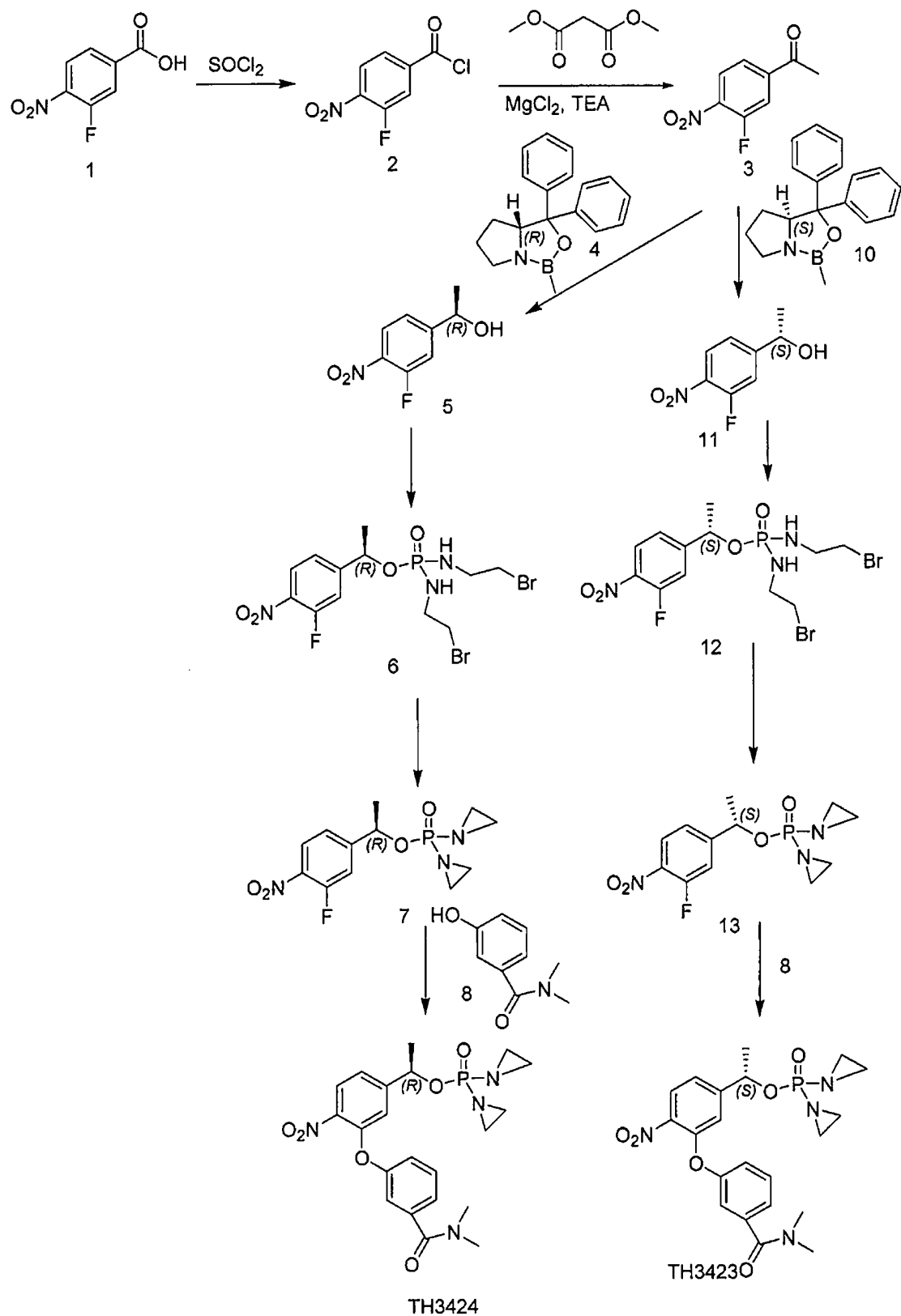
在0°C下向化合物7 (1.81 g, 10.95 mmol)於DMF (10 ml)中之溶液添加NaH (60%, 438 mg, 1095 mmol)，攪拌10分鐘，接著添加含化合物6 (2.3 g, 7.3 mol)之DMF (10 ml)，在0°C下攪拌30分鐘。

用H₂O淬滅，用EtOAc (100 ml×5)萃取，用H₂O (150 ml)、鹽水洗滌，蒸發，藉由矽膠管柱(DCM: MeOH=40:1)純化以得到呈黃色油狀物之化合物TH2870 (2.3 g, 69%產率)。

實例3. 藉由製備型對掌性層析法分離TH2870之對映異構體

將983 mg之式(I)化合物溶解於36 mL之甲醇中，在35°C至40°C之管柱溫度下以3.0 ml/min之流速及120巴之背壓將1 mL注入至SFC-80 Method Station (Thar, Waters)中之CHIRALPAK OZ-H 4.6×250 mm, 5 μm (Daicel)上，且在CO₂/甲醇(65-60/35-40)之混合物中以該流速溶離。以86.5%之產率及100%之對映異構體純度獲得式(Ia) (組態(R))之對映異構體。以83.8%之產率及100%之對映異構體純度獲得式(Ib) (組態(S))之對映異構體。圖1展示在藉由LCMS對掌性分離之後的TH 2870對映異構體1 (TH 3423)及TH 2870對映異構體2 (TH 3424或AST 106)之純度檢查。

TH 3423及3424之對掌性合成



化合物2

在具有DMF (2.5 mL)之 SOCl_2 (150 mL)中回流化合物1 (65 g) 5 h以獲得澄清溶液且接著在真空下移除 SOCl_2 。用甲苯(30 mL)稀釋殘餘物且

再次移除溶劑。將殘餘物不經進一步純化即用於後續步驟。

化合物3

在RT下用機械攪拌來攪拌MgCl₂ (21.0 g, 221 mmol)、TEA (100.0 mL, 717 mmol)及丙二酸二甲酯(41.0 mL, 359 mmol)之混合物2小時，隨後添加含化合物2之THF (80 ml)。在RT下攪拌所得混合物4小時，隨後添加濃HCl (90 mL)且攪拌30分鐘。用EtOAc (300 mL×3)萃取混合物，在減壓下濃縮。向殘餘物添加6N HCl (300 mL)且將混合物回流隔夜。用EtOAc (300 mL×3)萃取混合物，用NaHCO₃ (aq.)洗滌有機層且乾燥(Na₂SO₄)，過濾並在減壓下濃縮。藉由AcOEt/Hex=1/3 (V/V)再結晶殘餘物以得到呈淡黃色固體狀之化合物3 (46 g)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.16 (d, 1H)、7.86 (t, 2H)、2.68 (s, 3H)。

化合物5 :

在氬氣下，於0°C下將BH₃.THF (1 M, 11 mL)添加至化合物4於1 M 甲苯(3 mL, 3 mmol)中之溶液中。將溶液攪拌30 min，接著冷卻至-40°C。在-40°C下，歷經4小時緩慢添加化合物3 (1.83 g, 10 mmol)於THF (40 mL)中之溶液。在-40°C下攪拌系統2小時(TLC展示SM消失)。在-40°C下將MeOH (20 ml)添加至上述溶液中且攪拌該溶液30 min。在RT下移除溶劑之後，藉由管柱(Hex/AcOEt=3/1(V/V))純化殘餘物以獲得化合物5 (1.6 g)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.05 (t, 1H)、7.34 (d, 1H)、7.27 (d, 1H)、4.99 (m, 1H)、1.51 (d, 3H)。

化合物6

在氬氣下，於-40°C下向POCl₃ (1.6 mL, 17.25 mmol)於、之DCM

(10 mL)中之溶液添加化合物5 (1.6 g, 8.65 mmol), 接著添加含TEA (2.9 mL, 22.9 mmol)之10 mL DCM。在-40°C下攪拌混合物6小時且接著添加2-溴乙胺氫溴酸鹽(14.2 g, 69.3 mmol), 逐滴加入含TEA (9.6 mL)之DCM (10 mL)。將反應混合物自-40°C攪拌至室溫隔夜。添加K₂CO₃ (8.3g 於80 mL水中)且攪拌混合物5 min。用DCM萃取混合物, 經Na₂SO₄乾燥。過濾、濃縮且接著進行矽膠急驟層析法(用丙酮/己烷=0%至100%分離)以得到呈黃色油狀物之化合物6 (2.68 g, 產率: 65%)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.08 (t, 1H)、7.32 (d, 1H)、7.29 (d, 1H)、5.56 (m, 1H)、3.34-3.56 (m, 2H)、3.32-3.42 (m, 4H)、3.08-3.26 (m, 4H)、1.62 (d, 3H)。31PNMR: 14.44。

替代地, 可藉由下列程序合成TH3424:

在氮氣下將甲苯(11 ml/g)添加至四個玻璃頸瓶中。開始攪動, 在氮氣下將POCl₃添加(1.025 eq)至容器1。將容器1之內容物冷卻至-2°C至2°C。添加(1.0 eq)化合物1之溶液且在-2°C至2°C下逐滴加入含TEA (1.435 eq)之甲苯(11 ml/g)。在-2°C至2°C下攪動容器1之內容物1小時至2小時。取樣內容物以供資訊之HPLC分析。將2-溴乙胺氫溴酸鹽(3 eq)添加至容器1中。在-2°C至2°C下將TEA (6 eq)逐滴添加至容器1中。在0°C至RT下攪動容器1之內容物隔夜。取樣內容物以供HPLC分析。處理程序如下: 將H₂O (19 ml/g)添加至容器1中且攪拌5 min至10 min。用EA (19 ml/g)萃取混合物三次。有機相經無水Na₂SO₄乾燥且過濾。在40°C至50°C濃縮母液。藉由矽膠之層析法純化粗產物以獲得純化產物。

替代地, 可藉由下列程序合成TH3424:

在氮氣下將甲苯(11 ml/g)添加至四個玻璃頸瓶中。開始攪動且在氮

氣下將化合物1 (1.0 eq)及TEA (1.435 eq)添加至容器1中。將容器1之內容物冷卻至-2°C至2°C。在-2°C至2°C下，在氮氣下將POCl₃ (1.025 eq)逐滴添加至容器1中。在-2°C至2°C下攪動容器1之內容物1小時至2小時。取樣內容物以供資訊之HPLC分析。將2-溴乙胺氫溴酸鹽(3 eq)添加至容器1中。在-2°C至2°C下將TEA (6 eq)逐滴添加至容器1中。在0°C至RT下攪動容器1之內容物隔夜。取樣內容物以供HPLC分析。處理程序與上述相同。

替代地，可藉由下列程序合成TH3424：

在氮氣下將DCM (2.2 ml/g)及POCl₃ (1.91 eq)添加至四個玻璃頸瓶中。開始攪動且在氮氣下將容器1之內容物冷卻至-35°C至-40°C。在-35°C至-40°C下，在氮氣下將化合物1 (1.0 eq)/DCM (4.5 g/ml)溶液逐滴添加至容器1中。在-35°C至-40°C下，在氮氣下將TEA (4.0 eq)/DCM (4.5g/ml)溶液逐滴添加至容器1中。在-35°C至-40°C下攪動容器1之內容物4小時至6小時。取樣內容物以供資訊之HPLC分析。在-30°C至-40°C下將2-溴乙胺氫溴酸鹽(8 eq)添加至容器1中。在-30°C至-40°C下將TEA (12 eq)逐滴添加至容器1中。在在-30°C至-40°C下攪動容器1之內容物1 h至 2 h。取樣內容物以供HPLC分析。處理程序：將H₂O (15 ml/g)添加至容器1中並攪拌5 min至10 min。用DCM (12.5 ml/g)萃取水相一次。有機相經無水Na₂SO₄乾燥且過濾。在20°C至30°C下濃縮濾過物。藉由層析法純化粗產物以獲得純化產物。

化合物7

在55°C下攪拌化合物6 (2.68 g)、Ag₂O (3.92 g)於THF (30 mL)中之混合物隔夜。在於真空下移除溶劑之後，藉由矽膠急驟層析法分離殘餘物

以得到化合物7之淺色液體1.0 g。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.05 (t, 1H)、7.34 (d, 1H)、7.29 (d, 1H)、5.66 (m, 1H)、2.02-2.24 (m, 8H)、1.61 (d, 3H)。31PNMR : 31.55。

TH 3424 (TH 2870 對映異構體2)

在室溫下攪拌化合物7 (1.0 g)、化合物8 (785 mg)、 K_2CO_3 (880 mg) 於DMF (8 mL)中之混合物隔夜。用水稀釋混合物，用DCM萃取，經 Na_2SO_4 乾燥。過濾，濃縮且接著進行急驟層析法以得到呈黃色油狀物之化合物9 (1.1 g)。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.97 (d, 1H)、7.41 (t, 1H)、7.18-7.27 (m, 4H)、7.02-7.12 (m, 3H)、5.59 (m, 1H)、3.08 (s, 3H)、2.97 (s, 3H)、2.01-2.21 (m, 8H)、1.66 (d, 3H)。31P NMR : 31.27。

化合物11

與化合物5的程序相同。使用化合物8代替化合物3。產率：50%。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.05 (t, 1H)、7.34 (dd, 1H)、7.27 (d, 1H)、4.99 (m, 1H)、1.51 (d, 3H)。

化合物12

與化合物6的程序相同(產率：35%)。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.08 (t, 1H)、7.32 (d, 1H)、7.29 (d, 1H)、5.56 (m, 1H)、3.34-3.56 (m, 2H)、3.32-3.42 (m, 4H)、3.08-3.26 (m, 4H)、1.62 (d, 3H)。31PNMR : 14.47。

化合物13

與化合物7的程序相同(產率：36%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz)

δ : 8.06 (t, 1H)、7.34 (d, 1H)、7.30 (d, 1H)、5.67 (m, 1H)、2.02-2.25 (m, 8H)、1.62 (d, 3H)。³¹P NMR : 31.56。

TH3423 (TH 2870 對映異構體1)

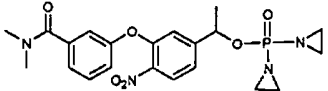
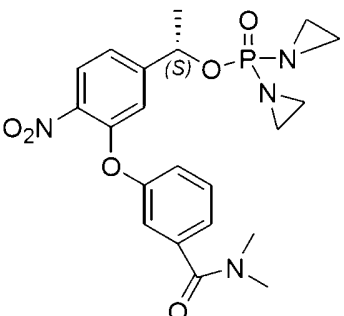
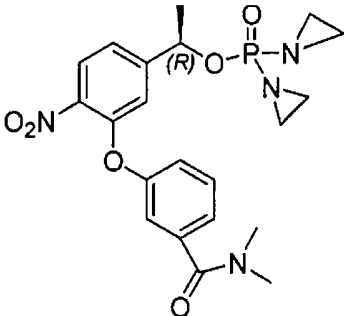
與化合物9的程序相同(產率：68%)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.97 (d, 1H)、7.41 (t, 1H)、7.18-7.27 (m, 4H)、7.02-7.12 (m, 3H)、5.59 (m, 1H)、3.08 (s, 3H)、2.97 (s, 3H)、2.01-2.21 (m, 8H)、1.66 (d, 3H)。³¹P NMR : 31.25。

實例4. 活體外人類腫瘤細胞株細胞毒性分析

關於H460非細胞肺癌人類腫瘤細胞株之活體外增殖資料報導於以上化合物圖表中。IC₅₀數值以微莫耳為單位報導且由以下引起：將化合物暴露於各種濃度2小時，隨後進行洗滌步驟且添加新鮮培養基，隨後生長及細胞活力染色且與僅培養基處理之對照比較。

特定言之，將按指數規律生長之細胞以 4×10^3 個細胞/孔之密度接種於96孔培養盤中且以37°C、5% CO₂、95%空氣及100%相對濕度培育24小時，隨後添加測試化合物。將化合物以200倍所需最終測試濃度溶解於100% DMSO中。在添加藥物時，用完全培養基將化合物進一步稀釋至4倍所需最終濃度。將50 μ l指定濃度之化合物之等分試樣添加至已含有150 μ l培養基之微量滴定孔中，產生所報導之最終藥物濃度。在添加藥物之後，以37°C、5% CO₂、95%空氣及100%相對濕度將培養盤再培育2小時，隨後洗去藥物且添加新鮮培養基，且以37°C、5% CO₂、95%空氣及100%相對濕度中將培養盤再培育70小時。此培育結束時，使用阿爾瑪藍分析法(AlamarBlue assay)對活細胞進行定量。使用Prism軟體(Irvine, CA)計算導致50% (IC₅₀)之生長抑制的藥物濃度，且結果列於表中。

其對H460肺癌細胞的抗增殖功效亦列表如下。

化合物編號	結構	H460細胞之增殖分析中之 IC ₅₀ (μM)
TH 2870 (外消旋體)		0.005
TH3423		0.005
TH3424		0.004

以上H460資料表明顯著抗腫瘤效果，且各種化合物在低至較低奈莫耳濃度量下僅2小時暴露時具有抑制作用。

實例5. 藉由醛酮還原酶AKR1C3活化TH 2870

用含有2 mM NADPH之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)，pH 7.4 (37 °C)將重組型人類AKR1C3稀釋至25 μg/mL。將含TH2870或孕酮(陽性對照)之30%甲醇/70%水以5 μM之最終濃度添加至反應混合物中且在37°C下培育120分鐘。在達到120 min之各個不同時間點採集50 μL之反應混合物，且添加含有作為內標之普萘洛爾(propranolol)的200 μL乙腈，渦流混合及離心10 min。將所得上清液(5 μL)注入至LC/MS/MS中以供定量TH

2870及孕酮之殘留%。以一式兩份測試化合物。

圖2中之資料顯示在AKR1C3之存在下TH 2870之快速消失，而已知受質孕酮則緩慢地減少。含有NADPH但無酶的緩衝劑對照組顯示不與任一化合物反應(資料未示出)。

實例6. 活體外人類腫瘤細胞株細胞毒性分析

亦使用如下材料及程序在不同癌細胞株中測試TH 2870、TH 3423及TH 3424。使用10*溶胞物緩衝液(cell signaling technology，目錄號9803)；用於哺乳動物組織之蛋白酶抑制劑混合物(Sigma，目錄號P8340)；用於絲胺酸/蘇胺酸磷酸酶及鹼性磷酸酶之L-同工酶的磷酸酶抑制劑混合物(Sigma，目錄號P0044)；用於酪胺酸蛋白質磷酸酶、酸及鹼性磷酸酶之磷酸酶抑制劑混合物(Sigma，目錄號P5726)；BCA套組(Thermo，目錄號23225)；初級抗體，小鼠單克隆AKR1C3抗體(純系NP6.G6.A6；Sigma-Aldrich)；初級抗體， α -微管蛋白(純系B-5-1-2；Sigma-Aldrich)；二級抗體，山羊抗小鼠IgG HRP結合物(A4416；Sigma-Aldrich)。細胞在良好條件下傳代兩代且經消解。在6 cm細胞培養皿中接種合適數量之細胞，並在37°C、5% CO₂下培育隔夜。當細胞生長至80%密度時，自培育箱取出培養皿。抽吸培養基，用冰冷的PBS洗滌兩次，且移除殘餘PBS。添加合適體積之冰冷的1*溶胞物且在冰上培育10分鐘。將溶胞物轉移至於冰中冷卻之微量離心試管中，在4°C，12,000 rpm下離心15分鐘。將上清液轉移至另一微量離心管中。藉由10*溶胞物稀釋溶胞物，且添加用於哺乳動物組織之蛋白酶抑制劑混合物(Sigma，#P8340)、用於絲胺酸/蘇胺酸磷酸酶及鹼性磷酸酶之L-同工酶之磷酸酶抑制劑混合物、用於酪胺酸蛋白質磷酸酶、酸及鹼性磷酸酶之磷酸酶抑制劑混合物。

將用於蛋白質定量之BCA蛋白質定量套組與1*溶胞物一起使用以將溶胞物稀釋至相同濃度。對5*SDS加樣緩衝液添加相應樣品，加熱至85°C保持10分鐘，且短暫離心。樣品在-20°C下保存或直接地用於蛋白質電泳。彼等樣品根據標準實踐進行電泳，轉印至膜上，根據製造商之說明書依序施加初級抗體及二級抗體。使用奧德賽(Odyssey)紅外雷射成像系統掃描信號。

結果展示於以下圖3及圖4中且列於下表中：

表：在肝癌、前列腺癌、食道癌及白血病細胞株中TH 2870、TH 3423及TH 3424之敏感度

肝癌細胞株	化合物ID	最小CV%	最大抑制%	RelIC50(μ M)	AbsIC50 (μ M)
HepG2	TH3424	3.4	100.2	0.0073	0.0086
HepG2	TH3423	-7.2	99.5	0.0131	0.0187
HepG2	TH2870	3.3	98.9	0.0055	0.0064
C3A	TH3424	-2.1	98.7	0.0041	0.0093
C3A	TH3423	5.4	98.5	0.0096	0.0117
C3A	TH2870	8.1	98.1	0.0071	0.0062
HCCC9810	TH3424	2.1	95.4	0.0134	0.0139
HCCC9810	TH3423	0.0	93.7	0.0168	0.0187
HCCC9810	TH2870	-2.6	95.4	0.0292	0.0294
PLCPRF5	TH3424	1.4	85.2	0.1279	0.1107
PLCPRF5	TH3423	-4.9	77.7	0.1556	0.2066
PLCPRF5	TH2870	-1.7	53.3	0.4745	0.5750
SNU-387	TH3424	-14.8	99.3	0.0587	0.0701
SNU-387	TH3423	1.3	99.8	0.0463	0.0397
SNU-387	TH2870	1.7	102.8	0.0422	0.0340
LIXC012	TH3424	4.1	82.8	0.0112	0.0175
LIXC012	TH3423	-1.1	84.8	0.0081	0.0169
LIXC-012	TH2870	6.6	87.1	0.0274	0.0187
Vcap_TH3424	Vcap_TH3424	-13.2	101.4	0.0132	0.0148

Vcap	TH3423	1.1	101.0	0.0266	0.0216
Vcap	TH2870	-3.4	100.2	0.0227	0.0152
TE-11	TH3424			0.0027	
TE-14	TH3424			0.0047	
OE 21	TH3424			0.0052	
T.T	TH3424			0.006	
TE-6	TH3424			0.021	
TE-9	TH3424			0.011	
ECa-109	TH3424			0.017	
KYSE	TH3424			0.011	
TE-4	TH3424			0.0099	
TE-8	TH3424			0.019	
TE-15	TH3424			0.0029	
COLO680N	TH3424			0.066	
EC-GI-10	TH3424			0.013	
KYSE 70	TH3424			0.033	
TE-5	TH3424			0.033	
OE 33	TH3424			0.084	
KYSE 510	TH3424			0.18	
KYSE 270	TH3424			0.27	
KYSE 180	TH3424			0.45	
CCRF-CEM	TH3424			0.0037	
MOLT-4	TH3424			0.010	
PF-382	TH3424			0.015	
SUP-T1	TH3424			0.003	
TALL-1	TH3424			0.03	
Jurkat	TH3424			0.04	
Jurkat, Clone E6-1	TH3424			0.024	
NOMO-1	TH3424			0.011	
P116	TH3424			0.084	
P30/OHK	TH3424			>1	
GR-ST	TH3424			0.099	
KG-1	TH3424			0.0153	

TF-1	TH3424			0.028	
HEL	TH3424			0.224	
Reh 3	TH3424			0.003	
HL-60	TH3424			0.003	
HL-60 Clone	TH3424			0.0526	
K-562	TH3424			>1.0	
ATN-1	TH3424			0.0298	
Mono-Mac-6	TH3424			>1.0	
THP-1	TH3424			>1.0	

實例7. 活體內人類腫瘤異種移植模型及抗腫瘤活性

利用非小細胞肺H460、非小細胞肺A549及黑素瘤A375模型之三個人類異種移植抗腫瘤模型用於顯示本文所提供之化合物的功效。

使用特定無病原體同型接合雌性裸小鼠(nu/nu, Charles River Laboratories)。任意給與小鼠食物及水且圈養在微小隔離盒籠具中。在實驗時藉由微晶片(Locus Technology, Manchester, MD, USA)識別四至六週齡動物。所有動物研究係經Threshold Pharmaceuticals, Inc的機構動物護理及使用委員會批准(Institutional Animal Care and Use Committee)。

所有細胞株來自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC, Rockville, MD, USA)。在具有10%胎牛血清之經推薦的培養基中培養細胞且在37°C下維持在5% CO₂潮濕環境中。

將細胞與基質膠(30%於H460中)混合且每一小鼠0.2 ml皮下植入至動物之側腹領域。當腫瘤大小達到100 mm³至150 mm³時，將小鼠隨機分入至具有10隻小鼠/群組的實驗或媒劑群組且開始治療(第1天)。在含5% DMSO之D5W中調配經測試化合物。藉由IP給與所有化合物，QDx5/週(5天給與，2天不給與)作為一個週期，持續總共2個週期。一週兩次量測腫瘤生長及體重。根據(長度×寬度²)/2計算腫瘤體積。將藥物功效評定為腫

瘤生長抑制(TGI)及腫瘤生長延遲(TGD)。TGI經定義為 $(1-\Delta T/\Delta C)\times 100$ ，其中 $\Delta T/\Delta C$ 呈現在治療組及對照組之平均(或中間，若群組內之變化相對地較大)腫瘤體積中變化之比率。TGD經計算為用於治療腫瘤以達到與對照組相比之 500 mm^3 的額外天數。當群組中之單一腫瘤大小達到 2000 mm^3 或平均腫瘤體積超出 1000 mm^3 時剔除動物。資料表示為平均值 \pm SEM。藉由杜奈特(Dunnett)比較後測試(GraphPad Prism 4)之單因子變異數分析或雙尾斯圖登氏*t*檢驗以供分析。將*P*值 <0.05 視為在統計上顯著的。

實例8. 活體內功效結果：

此研究採用A375黑素瘤人類腫瘤異種移植模型且將本文所提供之化合物與塞替派及經批准之抗黑素瘤藥物凱素(Abraxane)比較。抗腫瘤效果及投藥之安全性在下文以圖解說明。Mpk係指mg/kg。

群組	達到 500 mm^3 之天數	達到 1000 mm^3 之天數	TGD500，天數(相對於媒劑)	TGD1000，天數(相對於媒劑)	TGI
群組1：媒劑，qdx5x2，ip	15	25			
群組2：Thio-TEPA，2.5mpk，qdx5x2，ip	18	27	3	2	16.6%
群組4：凱素，30mpk，2x/wkx2，iv	24	35	9	10	47.4%
群組8：TH2870，20mpk，qdx5x2，ip			>13		98.0%

綜合而言，此等研究顯示相對於標準化學治療劑的3個不同腫瘤細胞株中之顯著抗腫瘤功效。

實例9. 人類肝癌之小鼠模型中之TH3424

雌性無胸腺裸小鼠(6週齡)用於此研究。動物購自Beijing HFK

Bioscience, Co., Ltd 且維持在高效粒子空氣過濾器(High Efficiency Particulate Air Filter, HEPA)過濾之環境中，其中藉由照射或高壓處理將籠具、食物及墊料除菌。總共32隻裸小鼠用於該研究。將HepG2-GFP人類肝細胞癌細胞(AntiCancer, Inc., San Diego, CA)與含有10% FBS之RPMI-1640 (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc.)一起培育。在保持37°C及5% CO₂/95%空氣氛圍的CO₂水夾套培育箱(Forma Scientific)中培養細胞。藉由錐蟲藍排除分析法測定細胞活力。五隻雌性無胸腺裸小鼠皮下注射有單次劑量之 5×10^6 HepG2-GFP細胞。當其大小達到1 cm³採集腫瘤並將腫瘤組織切割成1 mm³之較小碎片。四十隻雌性裸小鼠正位地植入有單片之腫瘤片段，該腫瘤片段係自HepG2-GFP人類肝細胞癌之皮下腫瘤模型導出。藉由SOI (手術原位植入)將腫瘤組織正位地植入於各小鼠中之肝之右葉中。簡言之，在麻醉下進行1 cm之上部腹切開。暴露肝之右葉且藉由剪刀機械地使肝表面之一部分受傷。接著將一片腫瘤片段固定在肝組織內，使肝返回至腹膜空腔並最後閉合腹壁。在特定無病原體條件下使小鼠保持在層狀流動櫃中。

當所植入腫瘤達到約1 mm²之平均大小時，在腫瘤植入的三天之後開始治療。將32隻負載腫瘤小鼠任意劃分成每組8隻小鼠的四個實驗群組。清楚地標記用於其群組的各籠子，其中每籠四隻小鼠。各小鼠具有用於辨識之耳標。下表展示該研究設計。

表. 群組及治療方案

群組(試劑)	劑量	體積	給藥時程	途徑	動物(n)
生理食鹽水(C)	0.9%	200 µl	Qdx35	I.P.	8
索拉非尼(Sorafenib) (S)	30mg/kg	100 µl	Qdx35	管飼	8
TH3424	2.5mg/kg	200 µl	QWx6	I.P.	8
TH3424	5mg/kg	200 µl	QWx3	I.P.	8

注意：治療在腫瘤植入3天後開始。

在該研究週期期間，每天一次檢查所有實驗小鼠死亡率或發病跡象。觀測動物直至腫瘤植入後的第38天。在該研究週期期間每週兩次量測小鼠之體重。藉由FluorVivo成像系統，模型300/Mag (美國，CA，INDEC)在該研究週期期間一週兩次獲得腫瘤生長及發展之影像。藉由注射劑量內之戊巴比妥鈉在腫瘤植入後的第38天將所有實驗動物安樂死。暴露肝以獲得影像，在此之後移除腫瘤且藉由電子天平(德國，Sartorius BS 124 S)稱重。將腫瘤組織保持在福馬林中以供進一步分析。使用 $\alpha = 0.05$ 的斯圖登氏t檢驗(雙面)分析不同群組中之體重及腫瘤負荷之比較。在經靜脈內注射測試劑之後，小鼠並未倒下，自主活動未減少。實驗動物通常情況較佳。各群組中之體重變化展示於圖5及下表中。

表. 研究結束時平均小鼠體重之比較

群組	第0天，體重(g) (平均值±sd)	第35天，體重(g) (平均值±sd)	體重增長率(%)	P值
生理食鹽水(C)	15.2±0.9	20.4±0.9	34	
索拉非尼(S)	15.1±1.1	18.2±0.8	21	P=0.0032 vs C
TH3424(2.5 mg/kg)	15.4±0.6	21.7±0.7	41	P=0.7252 vs C
TH3424(5mg/kg)	14.8±1.2	19.9±1.3	34	P=0.1740 vs C P=0.1869 vs (TH3424 2.5mg/kg)

如圖5及在上表中所展示，在研究之第35天，各群組中之小鼠之平均體重增加了21%至41%。在TH2870-2群組及陰性對照群組中不存在統計學上顯著之差異。此表明藉由腹膜內投與較低或較高劑量之TH2870-2對實驗小鼠無顯而易見的急性毒性。然而，在索拉非尼治療群組中，平均體重在統計學上顯著低於陰性對照群組。其表明藉由投與經測試劑量下之索

拉非尼對實驗小鼠存在某一程度之毒性。

各群組中之腫瘤進展。

藉由即時成像監測不同群組中之原位HepG2-GFP肝細胞癌之進展。一週兩次獲得影像。使用Power Station軟體(INDEC Biosystems, CA, USA)分析之自腫瘤螢光之信號導出的各群組中之在結束時之典型的腫瘤影像及腫瘤生長曲線分別地展示於圖6及圖7中。

表. 各群組中之平均腫瘤大小(mm^2)

群組	腫瘤面積(mm^2) (平均值 \pm sd)	P 值
生理食鹽水(C)	13.5 \pm 2.7	
索拉非尼(S)	8.2 \pm 5.3	P=0.0577 vs C ;
TH3424 (2.5mg/kg)	1.2 \pm 1.1 (第35天) 2.0 \pm 2.2 (第49天)	P=0.0000 vs C; P=0.0079 vs S P=0.1163 vs TH3424(2.5 mg/kg) (第49天)
TH3424 (5mg/kg)	0.0 \pm 0.0	P=0.0000 vs C; P=0.0031 vs S P=0.0183 vs TH3424(2.5 mg/kg)

如圖6、圖7及上表中所展示，陽性對照群組中之平均腫瘤大小比陰性對照群組中的小約39%，但在該2個控制群組之間不存在統計學上顯著的差異($p = 0.0577$)。

在TH3424 (2.5 mg/kg)群組及TH3424 (5 mg/kg)中，平均螢光成像讀取面積明顯地顯著小於陰性對照群組中之平均螢光成像讀取面積，其展示較強抑制性效應及顯而易見的劑量-效果關係。其中，螢光成像讀取面積在TH3424 (5 mg/kg)群組中為0。在此群組中，在3個週期的治療之後停止給藥，腫瘤螢光成像讀取仍然為0直到實驗結束。然而，在TH3424 (2.5 mg/kg)群組中，在3個週期治療的1週之後停止藥物投與且接著重新開始另外3個週期之治療。第35天之平均螢光成像讀取面積為 1.2 ± 1.1 ，其約為陰性對照群組中之8%且其為在第49天治療後之陰性對照群組中之

2.0±2.2 (約8%)。圖8展示在研究結束時之所有腫瘤且圖9展示實驗群組中之每一者中之腫瘤重量之平均值。

表. 各群組中之平均腫瘤重量

群組	腫瘤重量(g) (平均值±sd)	P值
生理食鹽水(C)	0.1543 ± 0.0546	
索拉非尼(S)	0.0637± 0.0389	P=0.0159 vs C
TH3424 (2.5mg/kg)	0.0081± 0.0088 (第49天)	P=0.0002 vs C; P=0.0020 vs S
TH3424 (5mg/kg)	0.0000 ± 0.0000	P=0.0001 vs C; P=0.0024 vs S; P=0.0341 vs TH3424(2.5 mg/kg)

如圖8、圖9及在上表中所示，陽性對照群組之平均腫瘤權數小於陰性對照群組之平均腫瘤權數(P=0.0159)，其展示陽性對照藥物(索拉非尼)對經測試劑量下之原位HepG2-GFP人類肝細胞癌小鼠模型具有抑制性效果。

TH3424 (2.5 mg/kg)及TH3424 (5 mg/kg)之群組中之平均腫瘤重量分別為0.0081 g及0 g。所有平均腫瘤重量在統計學上顯著小於陰性對照群組中之平均腫瘤重量。其中，平均重量在較高劑量群組中為0 g，且其在較低劑量群組中僅為0.0081±0.0088 g，其在陰性對照群組中分別為0%及5.2%。此表明TH3424在經測試劑量下對原位HepG2-GFP人類肝細胞癌小鼠模型具有非常強抑制性效果且其亦展示明顯的劑量-效果關係。

根據下式基於最終平均腫瘤重量計算腫瘤IR：

$$IR(\%) = (1 - \text{治療組}(t) / \text{對照組}(c)) \times 100$$

用於各治療群組之IR：

$$IR(\%) = (1 - PC / NC) \times 100 = (1 - 0.0637 / 0.1543) \times 100 \approx 58.7\%$$

$$IR(\%) = (1 - \text{TH2870-2 LT} / \text{NC}) \times 100 = (1 - 0.0081 / 0.1543) \times 100 \approx 94.8\%$$

$$\text{IR (\%)} = (1 - \text{TH2870-2 HT} / \text{NC}) \times 100 = (1 - 0.0000 / 0.1543) \times 100 \approx 100\%$$

注意：

NC表示陰性對照群組

PC陽性對照群組

腫瘤抑制速率在索拉非尼治療群組中為58.7% (相對於控制群組P=0.0159)，其展示在經測試劑量下對原位HepG2-GFP人類肝細胞癌小鼠模型的較強抑制性效果。然而，在此群組中，實驗小鼠之平均體重在統計學上顯著低於陰性對照群組中之平均體重。其表明藉由投與經測試劑量下之索拉非尼對實驗小鼠存在某一程度之毒性。TH3424 (2.5 mg/kg)及TH3424 (5 mg/kg)之腫瘤抑制速率分別為94.8%及100%，其展示對原位HepG2-GFP人類肝細胞癌小鼠模型的非常強的腫瘤抑制性效果及明顯的劑量-效果關係。在TH3424之經測試劑量下對實驗小鼠並不存在顯而易見的毒性。

實例10. T細胞白血病動物模型中之TH3424

藉由自LN2 (約2至3小瓶)解凍出約 150×10^6 個AL7473細胞且快速將其置放至37°C水浴中來製備白血病細胞。將所有細胞轉移至具有40 ml預溫熱完全介質之50 ml法爾康試管中。以1200 rpm離心細胞5 min。用40 ml RPMI1640再懸浮細胞。接著計數細胞。以1200 rpm離心細胞5 min且用冰冷的PBS再懸浮至每100 ul PBS 2百萬細胞。上文所製備之含有 2×10^6 細胞之100 ul生理食鹽水係用於藉由IV注入至各小鼠中。在實驗週期期間藉由將樣品轉移至FACS試管中針對血液每週進行FACS分析，將人類CD45 FITC及同種型添加至用於所有樣品之相應試管中並在暗處在冰上

培育細胞30 min。將2 ml之紅血球裂解緩衝劑添加至各試管中並在暗處在冰上再培育30 min。在此程序期間將所有樣品渦動若干倍並在4°C下以1500 rpm離心樣品5 min。捨棄上清液並將2 ml之冰冷洗滌緩衝劑添加至試管中。在4°C下以1500 rpm離心樣品5 min並重複此等步驟。將細胞再懸浮至150 µl之洗滌緩衝劑/PBS中以供FACS收購。藉由使用細胞探索或Flowjo在BD Calibur上分析樣品並藉由使用稜鏡5.0分析結果。

在細胞接種預分組後第26天、第33天、第42天收集用於FACS之血液樣本。在分組樣品之後，每週進行FACS直到成研究(細胞接種後第50天、第57天、第64天)。針對各小鼠收集10 µl血漿樣品且在細胞接種後第57天自各群組(第1組：#7、#43、#52；第2組：#11、#15、#23；第3組：#5、#9、#48；第4組：#25、#28、#36)進行3次血液抹片。樣品清單係概括於以下。

表：在終止點處為所有動物取樣。

樣本來源	用途	註解
血液	FACS (人類CD45)	所有小鼠
骨髓	FACS (人類CD45)	所有小鼠
	固定在福馬林中，嵌入於石蠟中	每組3隻小鼠
脾臟	FACS (人類CD45)	所有小鼠
	固定在福馬林中，嵌入於石蠟中	每組3隻小鼠

小鼠中之體重變化之結果展示於圖10中。自在細胞接種後第43天開始治療後，每週收集末梢血液以獲得在治療期間檢測到之人類CD45抗體FACS。在細胞接種後第43天、第50天、第57天及第64天(僅對第1組及第2組給藥)分別地給藥小鼠。分組之後的腫瘤負荷生長曲線展示於圖11中。各群組之末梢血液中之人類CD45+白血病細胞之百分比隨著疾病發展而增加，且在除第2組外的第一給藥之後7天百分比曲線下降($P>0.05$)。在第二

次給藥之後，治療群組(第2組至第4組)顯著地低於媒劑群組(第1組)($P<0.001$)。在第四次給藥後第6天處死所有小鼠(總共4組，每群組中10隻小鼠)。收集所有小鼠之血液、脾及骨髓以用於檢測人類CD45 FACS。收集各群組中之3隻小鼠的脾及骨以供FFPE。終止點處之細節資料及樣品清單概括於附件10.3中。研究終止點處之小鼠之末梢血液、脾及骨髓中之腫瘤負荷展示於圖12中。分別地與第1組之血液、脾及骨髓相比，除第2組中之骨髓展示略微顯著差異($P<0.05$)外，所有治療組(第2組至第4組)展示顯著差異($P<0.01$)。

實例10. 非幼猴中之藥代動力學及急性毒性研究

在藉由30 min靜脈內灌注之非幼猴(一隻雄性及一隻雌性，2 mg/kg之每種化合物)中測試TH 3423及TH 3424，TK取樣：在第1天及第15天：灌注初始化後0.25小時、0.5小時、0.75小時、1小時及2小時。血清化學試劑及血液病：給藥前(第1天)、第5天、第8天(給藥前)、第15天(給藥前)、第22天及第28天。臨床觀測：在研究期間每天一次，總共35天。食物消耗：在研究期間每天一次，總共35天。體重量測：每週兩次，持續五週。

TK參數列於下表中：

在以2 mg/kg對雄性及雌性食蟹獼猴30 min IV灌注之後的TH3423之血漿濃度				
劑量	時間點 (hr)	濃度(ng/mL)		平均值 (ng/mL)
		雄性_#1	雌性_#2	
IV-TH3423 2 mg/kg	0.25	1100	1320	1210
	0.5	1420	1370	1395
	0.75	359	313	336
	1	85.0	55.0	70.0
	2	1.03	BQL	1.03
TK參數	單位	#1-	#2	平均值

CL	L/hr/kg	2.59	2.61	2.60
V _{ss}	L/kg	0.584	0.469	0.5266
AUC _{last}	hr*ng/mL	773	758	766
AUC _{INF}	hr*ng/mL	774	766	770
終端 t _{1/2}	hr	0.150	0.108	0.129
MRT _{INF}	hr	0.226	0.180	0.2028

在以2 mg/kg對雄性及雌性食蟹獼猴30 min IV灌注之後的TH3424之血漿濃度				
劑量	時間點	濃度(ng/mL)		平均值 (ng/mL)
		雄性_#3	雌性_#4	
IV-TH3424 2 mg/kg	(hr)			
	0.25	2480	1850	2165
	0.5	2720	2090	2405
	0.75	1030	557	794
	1	260	110	185
	2	7.43	3.84	5.64
TK參數	單位	#3	#4	平均值
CL	L/hr/kg	1.16	1.67	1.42
V _{ss}	L/kg	0.289	0.360	0.3246
AUC _{last}	hr*ng/mL	1724	1195	1459
AUC _{INF}	hr*ng/mL	1726	1196	1461
終端 t _{1/2}	hr	0.181	0.182	0.182
MRT _{INF}	hr	0.250	0.215	0.2324

血清化學試劑展示於下表：

	性別	動物ID	取樣時間	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	γ -GT (U/L)	TBIL (μ M)	TP (g/L)	ALB (g/L)	BUN (μ M)	Glu (mM)
第1組 TH3423	雄性	#1	第1天	45.0	37.0	746.4	78.4	5.2	72.9	46.9	3.47	3.12
			第8天	21.0	40.8	540.3	37.6	9.8	76.2	39.1	26.82	5.28
	雌性	#2	第1天	41.7	43.3	205.5	41.5	0.0	66.0	42	4.06	6.03
			第8天	25.5	57.7	190.3	37.0	0.4	71.8	40.9	7.61	2.13
			第15天	21.1	76.7	123.6	29.4	1.4	54.9	34.2	5.96	2.51
第2組 TH3424	雄性	#3	第1天	43.0	40.2	287.5	62.2	2.1	70.4	50.5	4.89	4.5
			第8天	31.2	31.2	225.2	44.9	3.6	65.1	43.3	4.8	4.15
			第15天	45.0	73.5	174.8	36.7	2.1	53.2	36.8	9.66	1.47
	雌性	#4	第1天	61.6	23.7	134.2	47.3	1.5	70.2	46.1	3.43	3.34
			第8天	37.7	43.1	200.2	36.2	0.8	72.4	41.8	5.63	5.91
			第15天	31.9	23.8	151.5	34.2	4.0	62.3	38.5	3.87	2.8

	性別	動物ID	取樣時間	TC (mM)	TG (mmol/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	CK (U/L)	GLB (g/L)	CREA (μ M)
第1組	雄性	#1	第1天	2.1	0.24	2.54	1.27	146	26	66
			第8天	1.72	2.25	2.55	1.84	153	37.1	141
TH3423	雌性	#2	第1天	2.48	0.45	2.39	1.02	342	24	95
			第8天	3.01	1.17	2.47	1.53	126	30.9	120

			第15天	2.02	0.84	2.36	1.09	78	20.7	69
第2組 TH3424	雄性	#3	第1天	3.22	0.38	2.38	1.66	221	19.9	91
			第8天	3.06	0.66	2.33	1.57	83	21.8	96
			第15天	1.44	0.41	2.14	1.5	172	16.4	58
第1組 TH3423	雌性	#2	第1天	3.04	0.17	2.51	1.21	202	24.1	61
			第8天	2.91	0.63	2.37	1.31	190	30.6	88
			第15天	2.23	0.94	2.2	1.22	78	23.8	46
	性別	動物ID	取樣時間	A/G	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)			
第2組 TH3424	雄性	#3	第1天	1.8	143	6.92	106			
			第8天	1.1	112	5.86	71.2			
			第15天	1.7	128.17	4.81	83.87			
第1組 TH3423	雌性	#2	第1天	1.8	146	6.14	104			
			第8天	1.3	149	4.83	97.9			
			第15天	1.7	128.17	4.81	83.87			
第2組 TH3424	雌性	#4	第1天	2.5	147	4.31	110			
			第8天	2.0	147	4.51	97.2			
			第15天	2.2	136.14	6.05	92.47			
第1組 TH3423	雄性	#3	第1天	1.9	143	5.77	108			
			第8天	1.4	143	4.33	97.1			
			第15天	1.6	132.59	5.58	95.29			

血液病資料展示於下表：

	性別	動物 ID	取樣時間	WBC (x10 ⁹ /L)	%NEUT(%)	%LYM (%)	%MONO(%)	%EOS (%)	%BASO (%)	abs_neuts (x10 ⁹ /L)	abs_lymphs (x10 ⁹ /L)
第1組 TH3423	雄性	#1	第1天	5.33	55.4	36.7	5.5	2.4	0.0	2.96	1.95
			第8天	11.66	80.9	15.4	0.0	3.0	0.7	9.44	1.79
	雌性	#2	第1天	6.7	47.9	45	4.8	2.3	0.0	3.21	3.02
			第8天	10.35	61.90	35.60	0.00	2.30	0.20	6.40	3.68
			第15天	9.56	63.0	27.90	6.30	2.70	0.10	6.02	2.67
			第1天	4.71	58.4	38.9	0.1	2.6	0.0	2.75	1.84
第2組 TH3424	雄性	#3	第8天	9.15	34.60	45.90	13.10	1.10	5.30	3.16	4.19
			第15天	13.26	65.7	26.70	4.40	3.10	0.10	8.70	3.54
	雌性	#4	第1天	11.64	72.8	22.9	0.9	3.3	0.1	8.47	2.66
			第8天	16.91	49.10	18.90	0.20	1.50	30.30	8.29	3.20
			第15天	20.70	80.8	13.60	3.00	1.70	0.90	16.7	2.80

	性別	動物ID	取樣時間	abs_monos (x10 ⁹ /L)	abs_eos (x10 ⁹ /L)	abs_basos (x10 ⁹ /L)	RBC (x10 ¹² /L)	HGB (g/L)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)
第1組 TH3423	雄性	#1	第1天	0.29	0.13	0.0	5.2	132	40.8	78.3	25.4
			第8天	0.00	0.35	0.08	5.86	146.00	44.70	76.20	24.90
	雌性	#2	第1天	0.32	0.15	0	4.67	112	35	74.9	24
			第8天	0.00	0.25	0.02	5.21	128.00	39.80	76.30	24.60
			第15天	0.60	0.26	0.01	4.8	115	33.9	70.6	24.0
			第1天	0	0.12	0	4.55	117	34.9	76.7	25.7
第2組 TH3424	雄性	#3	第8天	1.21	0.10	0.49	4.59	117.00	35.20	76.70	25.50
			第15天	0.59	0.41	0.02	5.02	127	37.4	74.5	25.3
			第1天	0.11	0.39	0.01	4.65	118	35.7	76.8	25.4
第2組 TH3424	雌性	#4	第8天	0.03	0.26	5.13	5.15	130.00	39.30	76.30	25.30
			第15天	0.62	0.37	0.19	4.94	125	36.3	73.5	25.3

	性別	動物ID	取樣時間	MCHC (g/L)	RDW-CV (%)	RDW-SD (fL)	PLT (x10 ⁹ /L)	MPV (fL)	PDW	PCT (%)
第1組 TH3423	雄性	#1	第1天	324	11.6	38.2	358	10.2	15.1	0.365
			第8天	327.00	11.90	38.00	490.00	10.60	15.70	0.52
	雌性	#2	第1天	320	11.8	37.2	318	10.6	14.8	0.338
			第8天	322.00	12.30	39.50	699.00	9.60	15.40	0.67
			第15天	339	10.9	32.3	533	8.70	15.10	0.46
			第1天	335	11.8	38.1	240	11.1	15.5	0.267
第2組 TH3424	雄性	#3	第8天	332.00	11.50	37.20	496.00	10.30	15.30	0.51
			第15天	340	11.5	36.3	623	9.5	15.4	0.593
			第1天	331	11.5	37.4	213	13	15.4	0.277
	雌性	#4	第8天	331.00	11.20	36.20	390.00	12.80	15.50	0.50
			第15天	344	11.0	34.1	221	12.5	16.2	0.275

體重變化列於下表：

群組編號.	動物ID	第1天	第4天	第8天	第11天
		第1組TH3423	#1 3.35	3.23	3.23
	#2 平均值	3.65 3.50	3.55 3.39	3.41 3.32	2.96 2.96
第2組TH3424	#3- #4 平均值	3.40 3.28 3.34	3.30 3.22 3.26	3.31 3.08 3.20	3.17 2.94 3.06

應理解，儘管已藉由某些態樣、實施例及視情況選用之特徵具體地揭示本發明，但熟習此項技術者可對該等態樣、實施例及視情況選用之特徵作出修改、改進及變化，且該等修改、改進及變化被認為在本發明之範疇內。

本發明已大致上且一般性地描述於本文中。處於通用揭示內容內的較狹義類型及亞屬組中之每一者亦形成本發明之一部分。此外，在本發明之特徵或態樣以馬庫西組(Markush group)之方式進行描述的情況下，熟習此項技術者將認識到本發明亦因此以馬庫西組之任何個別成員或成員子組之形式進行描述。



【發明摘要】

【中文發明名稱】

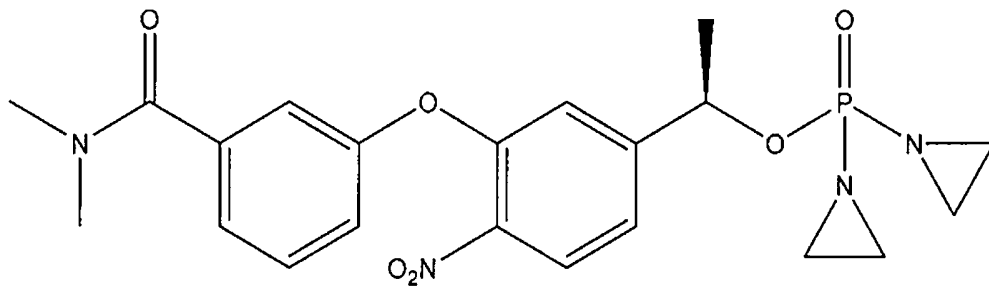
(R)-及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯、組合物及其使用及製備方法

【英文發明名稱】

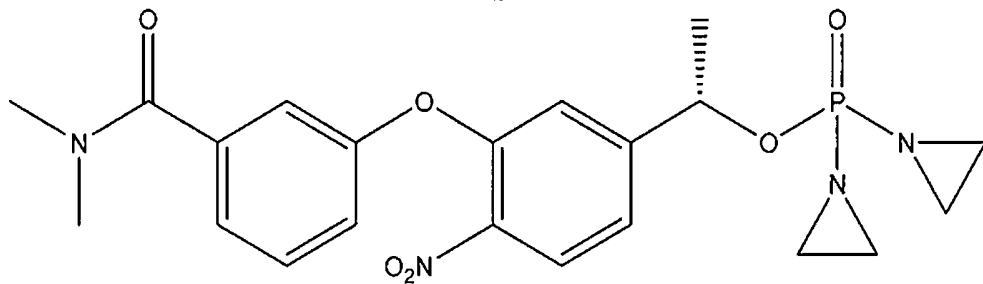
(R)- AND (S)-1-(3-(3-N,N-DIMETHYLAMINOCARBONYL)PHENOXYL-4-NITROPHENYL)-1-ETHYL-N,N'-BIS(ETHYLENE)PHOSPHORAMIDATE, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THEIR USE AND PREPARATION

【中文】

本文提供下式之光學活性化合物，



II及

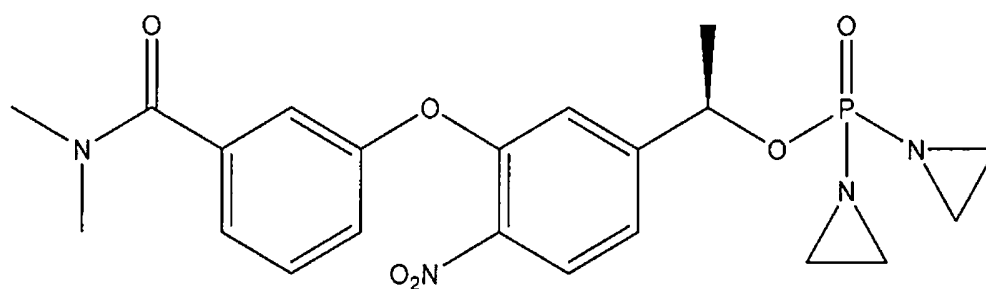


III，

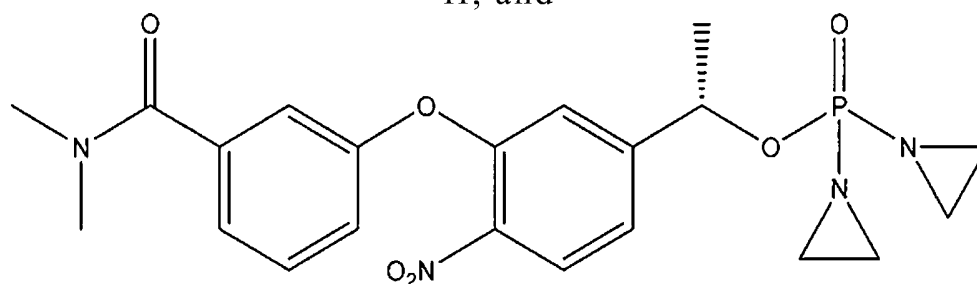
及其醫藥組合物。本文亦提供製造此等化合物及解析外消旋混合物或使其增濃其對映異構體之一以提供(R)-及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯的方法，及包括投與此等化合物之治療癌症的方法。

【英文】

Provided herein are optically active compounds of the formulae:



II; and



III

and pharmaceutical compositions thereof. Also provided herein are processes of making these compounds and resolving the racemic mixture or the enrichment of same with in one of its enantiomers to provide (R)- and (S)-1-(3-(3-N,N-dimethylaminocarbonyl)phenoxy)-4-nitrophenyl)-1-ethyl-N,N'-bis(ethylene)phosphoramidate, and methods of treating cancer comprising administering such compounds.

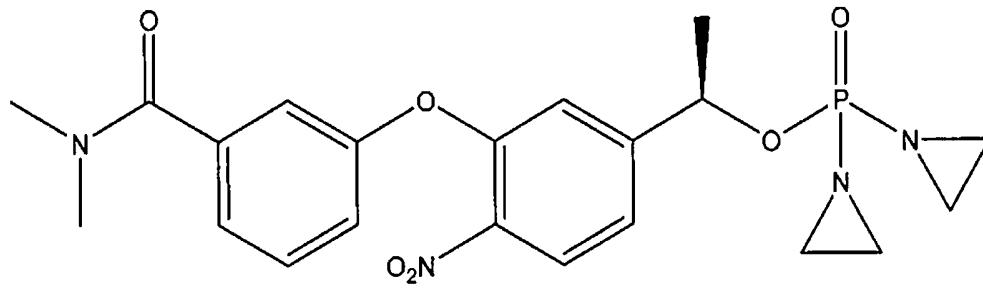
【指定代表圖】

圖2

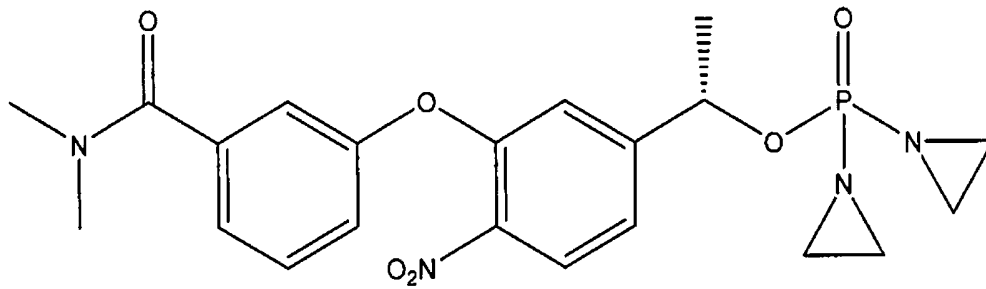
【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



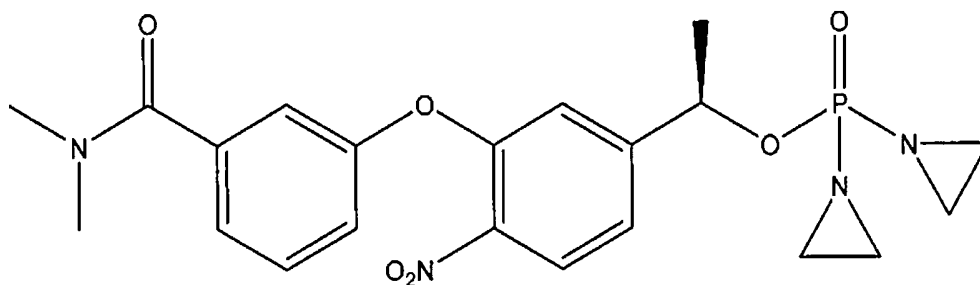
I



II

【發明申請專利範圍】**【第1項】**

一種(R)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯化合物，

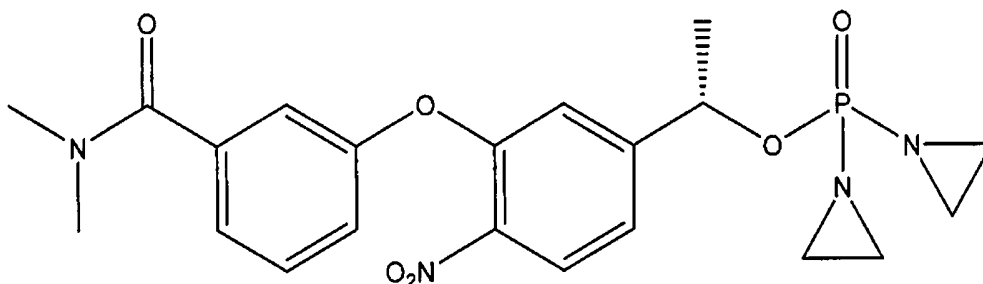


I

或其同位素變體、溶劑合物或水合物。

【第2項】

一種(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯化合物，



II

或其同位素變體，或其醫藥學上可接受之溶劑合物或水合物。

【第3項】

如請求項1或2之化合物，其中該化合物具有之對映異構體過量不低於80%。

【第4項】

如請求項3之化合物，其中該化合物具有之對映異構體過量不低於90%。

【第5項】

如請求項4之化合物，其中該化合物具有之對映異構體過量不低於95%。

【第6項】

如請求項1或2之化合物，其中該化合物實質上係純的。

【第7項】

如請求項6之化合物，其中該化合物具有至少50%之純度。

【第8項】

如請求項第7項之化合物，其中該化合物具有至少90%之純度。

【第9項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1或2之化合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【第10項】

一種治療或改善個體之增生性疾病之一或多種症狀的方法，其包含向該個體投與如請求項1或2之化合物。

【第11項】

如請求項10之方法，其中該疾病為癌症，包括肝癌、肝細胞癌(HCC)、非小細胞肺癌、黑素瘤、前列腺癌、乳癌、白血病、食道癌、腎癌、胃癌、結腸癌、腦癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巢癌、頭頸癌、子宮內膜癌、胰臟癌、肉瘤癌及直腸癌。

【第12項】

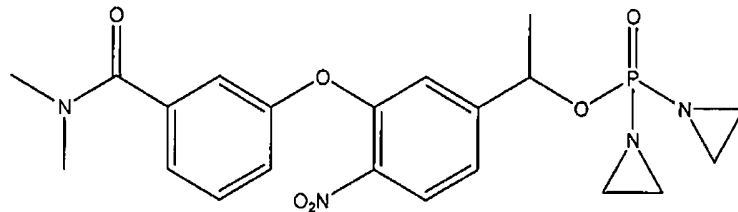
一種抑制細胞生長之方法，其包含使該細胞與如請求項1或2之化合物接觸。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該細胞為癌細胞。

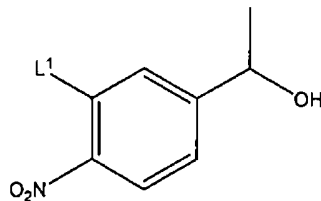
【第14項】

一種製造式I化合物之方法，



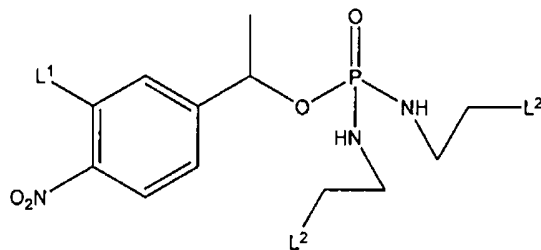
I

其包含使式II化合物



II

與 POCl_3 及 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{L}^2$ 或其鹽接觸，以提供式III化合物，



III

其中 L^1 及 L^2 獨立地為離去基；及將該式III化合物轉化為式I化合物。

【第15項】

一種用於將如請求項1之化合物之外消旋體解析成其中一種對映異構體或用於在混合物中增濃該式(I)化合物之任何對映異構體過量的方法，其包含以下步驟：a)使該式(I)化合物經過光學解析處理，其中藉由包含固定相及流動相之對掌性層析法，將1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯之對映異構性增濃之外消旋混合物分離成其兩種對映異構體(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯及(R)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝苯基)-1-乙基-N,N'-雙(伸乙基)胺基磷酸酯，其中該固定相包含以官能化多醣浸漬之矽膠，且其中該流動相包含醇及另一溶劑。

【第16項】

如請求項15之方法，其中該醇為甲醇。

【第17項】

如請求項15之方法，其中該另一溶劑為CO₂。

