

(21)申請案號：101120801

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K31/415 (2006.01)

C07D231/02 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/08

瑞典

1150521-1

(71)申請人：米迪維有限公司 (英國) MEDIVIR UK LTD. (GB)

英國

(72)發明人：艾亞沙 蘇珊娜 AYESA, SUSANA (ES)；葛波斯佳 俄蘇拉 GRABOWSKA,

URSZULA (GB)；海維特 艾倫 HEWITT, ELLEN (GB)；喬森 丹尼爾 (SE)；卡

柏格 皮亞 KAHNBERG, PIA (SE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 60 頁

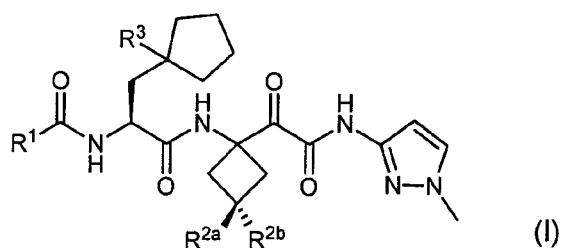
(54)名稱

半胱胺酸蛋白酶抑制劑

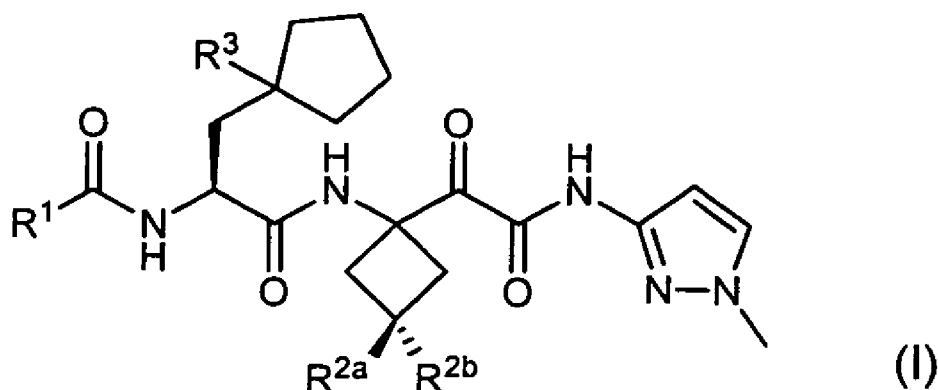
CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS

(57)摘要

一種式 I 化合物，



其中 R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 鹵烷基、 C_3 - C_6 環烷基，其中 C_3 - C_6 環烷基視情況經 CF_3 、甲基、乙基或一或兩個 F 取代； R^{2a} 及 R^{2b} 獨立地為 H、F 及 CH_3O ； R^3 為 F 或 CH_3 ；或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或 N-氧化物，其係用於預防或治療以組織蛋白酶 S 之不適當表現或活化為特徵之病症。



(21)申請案號：101120801

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K31/415 (2006.01)

C07D231/02 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/08

瑞典

1150521-1

(71)申請人：米迪維有限公司 (英國) MEDIVIR UK LTD. (GB)

英國

(72)發明人：艾亞沙 蘇珊娜 AYESA, SUSANA (ES)；葛波斯佳 俄蘇拉 GRABOWSKA,

URSZULA (GB)；海維特 艾倫 HEWITT, ELLEN (GB)；喬森 丹尼爾 (SE)；卡

柏格 皮亞 KAHNBERG, PIA (SE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：0 共 60 頁

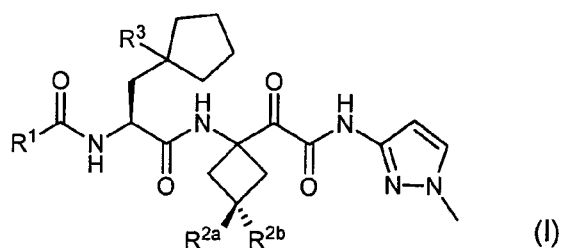
(54)名稱

半胱胺酸蛋白酶抑制劑

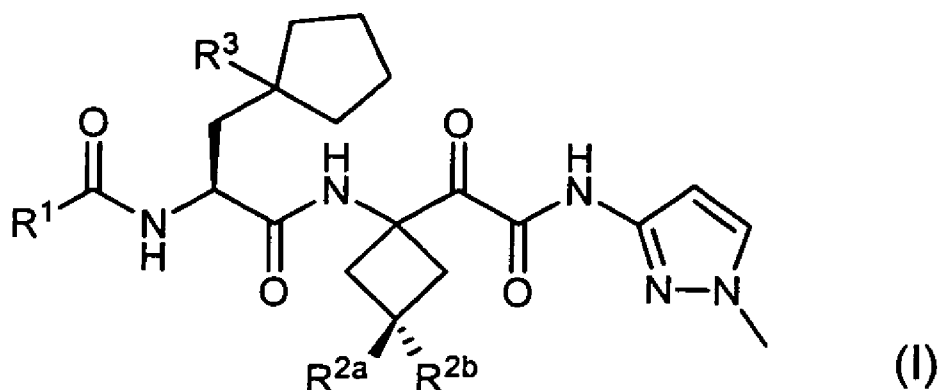
CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS

(57)摘要

一種式 I 化合物，



其中 R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 鹵烷基、 C_3 - C_6 環烷基，其中 C_3 - C_6 環烷基視情況經 CF_3 、甲基、乙基或一或兩個 F 取代； R^{2a} 及 R^{2b} 獨立地為 H、F 及 CH_3O ； R^3 為 F 或 CH_3 ；或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或 N-氧化物，其係用於預防或治療以組織蛋白酶 S 之不適當表現或活化為特徵之病症。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101120801

※申請日：

101.6.8

※IPC 分類：

A61K 31/415 (2006.01)

C07D 231/02 (2006.01)

A61P 37/00

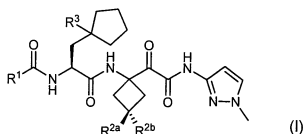
一、發明名稱：(中文/英文)

半胱胺酸蛋白酶抑制剂

CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS

二、中文發明摘要：

一種式I化合物，



其中

R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 鹵烷基、 C_3 - C_6 環烷基，其中 C_3 - C_6 環烷基視情況經 CF_3 、甲基、乙基或一或兩個 F 取代；

R^{2a} 及 R^{2b} 獨立地為 H、F 及 CH_3O ；

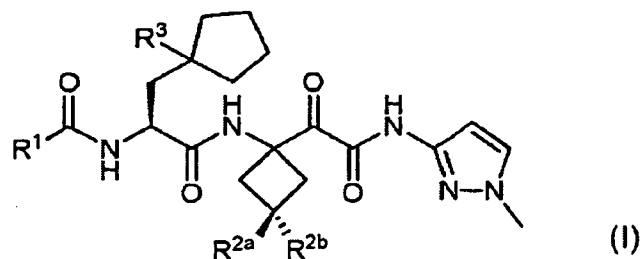
R^3 為 F 或 CH_3 ；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或 N-氧化物，

其係用於預防或治療以組織蛋白酶 S 之不適當表現或活化為特徵之病症。

三、英文發明摘要：

Compounds of the formula I



wherein

R¹ is C₁-C₆alkyl, C₁-C₆haloalkyl, C₃-C₆cycloalkyl, wherein C₃-C₆cycloalkyl is optionally substituted with CF₃, methyl, ethyl or one or two F;

R^{2a} and R^{2b} are independently H, F and CH₃O;

R³ is F or CH₃;

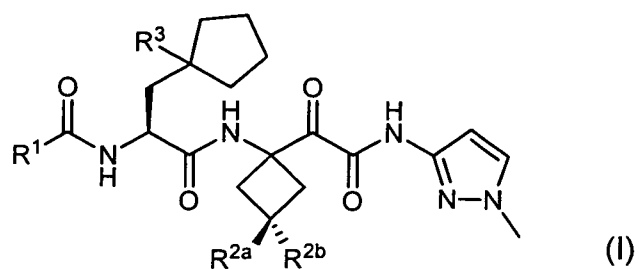
or a pharmaceutically acceptable salt, hydrate or N-oxide thereof,

for the use in the prophylaxis or treatment of a disorder characterised by inappropriate expression or activation of cathepsin S.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：（無）

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於組織蛋白酶S之抑制劑及其在治療涉及組織蛋白酶S之病症中之用途，該等病症諸如自體免疫病症、過敏症及慢性疼痛病狀。

【先前技術】

半胱胺酸蛋白酶之番木瓜蛋白酶(papain)超家族廣泛分佈於各種物種中，包括哺乳動物、無脊椎動物、原生動物、植物及細菌。許多哺乳動物組織蛋白酶(包括組織蛋白酶B、F、H、K、L、O、S及W)已歸於此超家族，且其活性之不當調節與許多代謝病症有關聯，該等代謝病症包括關節炎、肌肉萎縮症、炎症、絲球體腎炎及腫瘤入侵。致病性組織蛋白酶樣酶包括細菌牙齦卟啉單胞菌、瘧疾鐮狀單胞菌I、II、III以及下列等等，及來自肺炎肺囊蟲、克氏及布魯氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi* and *brucei*)、束形短膜蟲(*Crithidia fusiculata*)、血吸蟲屬之半胱胺酸蛋白酶。

在WO 97/40066中，描述針對組織蛋白酶S之抑制劑的用途。提出抑制該酶可預防或治療由蛋白酶活性引起之疾病。組織蛋白酶S為屬於番木瓜蛋白酶超家族之高活性半胱胺酸蛋白酶。其一級結構與人類組織蛋白酶L及人類組織蛋白酶H及植物半胱胺酸蛋白酶番木瓜蛋白酶分別具57%、41%及45%之同源性，但與組織蛋白酶B僅31%同源。其主要發現於B細胞、樹突狀細胞及巨噬細胞中，且此有限出現率表明此酶在退化疾病之發病機制中之潛在關

聯。此外，已發現II類MHC分子需要藉由蛋白水解破壞Ii以結合抗原肽並運輸所得複合物至細胞表面。此外，已發現組織蛋白酶S在B細胞中為使得II類分子能夠結合肽所必需之有效Ii蛋白水解所必需的。因此，抑制此酶可適用於調節II類限制免疫反應(WO 97/40066)。組織蛋白酶S亦由發炎細胞(諸如樹突狀細胞、B細胞及巨噬細胞)產生。其與包括動脈粥樣硬化及稱為腹主動脈瘤(AAA)之病狀在內的若干病狀之病理學有關。

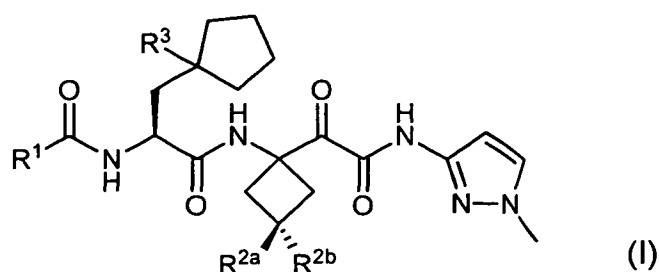
細胞之胞外成型為持續進行之過程，以修復損壞之動脈壁，其中組織蛋白酶S發揮使構成動脈壁之諸如彈性蛋白及膠原蛋白之胞外基質蛋白降解的作用。內皮細胞偶爾可能例如由於諸如高膽固醇含量、應力、總健康狀況及基因之因素而發生功能障礙。此功能障礙導致自血液產生及補充發炎細胞，該等發炎細胞滲透動脈壁以防止受損害，且發炎細胞最終產生組織蛋白酶S。再成型失衡可能引起更多蛋白水解降解，其反過來可引起形成於動脈壁內之斑塊的不穩定性。斑塊不穩定性過高可導致斑塊破裂及可能的血栓形成相關事件。

另外，腹主動脈之胞外基質可由於過度降解而不再發揮作用(weekend)，從而引起AAA。因此，抑制組織蛋白酶S提供治療動脈粥樣硬化及AAA之手段。

牽涉組織蛋白酶S之其他病症為哮喘、慢性阻塞性肺病、子宮內膜異位及慢性疼痛。

【發明內容】

根據本發明之第一態樣，提供一種式I化合物：



其中

R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 鹵烷基或 C_3 - C_6 環烷基，其中 C_3 - C_6 環烷基視情況經 CF_3 、甲基、乙基或一或兩個 F 取代；

R^{2a} 及 R^{2b} 係獨立地選自 H、F 及 CH_3O ；

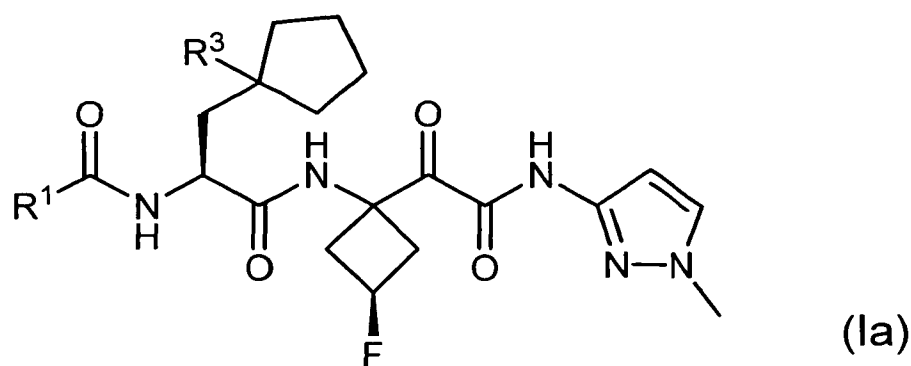
R^3 為 F 或 CH_3 ；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或 N-氧化物。

在一些實施例中， R^{2a} 及 R^{2b} 皆為氫。

在替代性實施例中， R^{2a} 及 R^{2b} 中之一者為 H 且另一者為 F 或 CH_3O 。

通常， R^{2a} 及 R^{2b} 中之一者為 H 且另一者為 F 的化合物具有如式 Ia 所示之立體化學：



在其他實施例中， R^{2a} 及 R^{2b} 皆為 F。

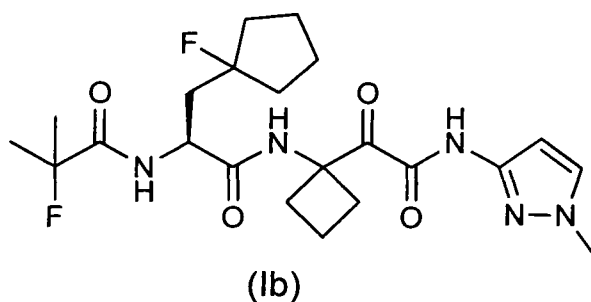
在一些實施例中， R^3 為 F。

在替代性實施例中， R^3 為 CH_3 。

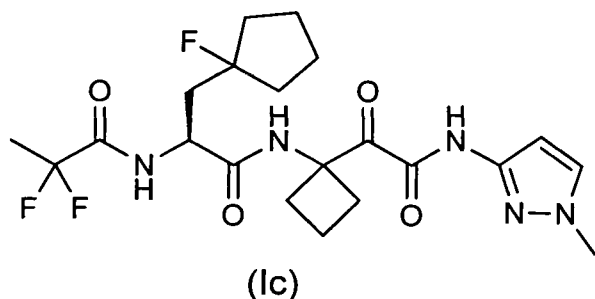
本發明之一個實施例包括 R^1 為 C_1 - C_6 烷基之化合物。根據此實施例， R^1 通常為乙基、異丙基或第三丁基。

另一實施例包括 R^1 為 C_1 - C_6 鹵烷基之化合物，諸如氯烷基或氟烷基。根據此實施例， R^1 通常為單、二或三氟 C_1 - C_6 烷基，諸如單氟丙基、二氟丙基、三氟丙基或三氟丁基。

本發明之一較佳化合物為式 Ib 化合物：



本發明之另一較佳化合物為式 Ic 化合物：



式 I 或式 I 之任何子群之化合物係以各種有利醫藥特性為特徵，且展示鑒於先前技術之化合物至少一種改良之特性。特定而言，本發明之抑制劑在一或多種以下藥理學相關特性方面具優越性，亦即效能、降低之細胞毒性、改良之藥物動力學、可接受劑量及藥丸負荷。

決不希望束縛於理論或為特定變數歸屬試驗性結合模式，本文所使用之 P1、P2 及 P3 係僅出於方便起見而提供，

且具有其習知含義，且指示抑制劑之咸信分別填充酶之S1、S2及S3亞位點的彼等部分，其中S1鄰近裂解位點且S3遠離裂解位點。

本發明之另一態樣包含一種使用式I或式I之任何子群之化合物預防或治療由組織蛋白酶異常表現或活化引起的疾病，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

在一較佳態樣中，本發明係關於一種使用如本文所規定之式I或式I之任何子群之化合物治療由組織蛋白酶異常表現或活化所引起的疾病，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

本發明之另一較佳態樣提供式I或式I之任何子群之化合物的用途，其係用於預防或治療由組織蛋白酶異常表現或活化所引起的疾病，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

在一較佳態樣中，本發明係關於如本文所規定之式I或式I之任何子群之化合物的用途，其係用於治療由組織蛋白酶異常表現或活化所引起的疾病，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

本發明之另一態樣提供式I或式I之任何子群之化合物用

途，其係用於製造用於預防或治療由組織蛋白酶異常表現或活化所引起的疾病的藥物，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

在一較佳態樣中，本發明係關於如本文所規定之式I或式I之任何子群之化合物的用途，其係用於製造預防或治療由組織蛋白酶異常表現或活化所引起的疾病的藥物，亦即藉由較佳在不實質性伴隨抑制番木瓜蛋白酶超家族之其他成員的情況下抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症。

本發明化合物可適用之疾病或病症的實例包括 WO 97/40066 中列舉之疾病或病症，諸如自體免疫疾病、過敏症(諸如哮喘及枯草熱)、多發性硬化、類風濕性關節炎及其類似疾病或病症。另一實例為如 WO 03/20287 中所揭示之子宮內膜異位症，尤其慢性疼痛。其他實例為動脈粥樣硬化、斑塊不穩定性及腹主動脈瘤(AAA)。

本發明另外提供式I或式I之任何子群之化合物在治療藉由抑制組織蛋白酶S來減輕或緩和之疾病或病症及製造用於治療該等疾病或病症之藥物中的用途。

本發明之另一態樣提供一種醫藥組合物，其包含本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑及視情況選用之一或多種其他治療劑。

在一系列實施例中，該等方法用於治療處於自體免疫疾

病風險中或罹患自體免疫疾病的哺乳動物，尤其人類。自體免疫性意謂宿主之免疫反應轉向針對其自身組成部分從而導致病變之現象。許多人類自體免疫疾病與某些II類MHC複合物有關。存在此相關性係因為由T細胞(引起自體免疫性之細胞)識別之結構為由II類MHC分子及抗原肽構成之複合物。當T細胞與宿主之與來源於宿主之自身基因產物的肽複合之II類MHC分子反應時可產生自體免疫疾病。若抑制形成該等II類MHC/抗原肽複合物，則自體免疫反應得以降低或抑制。II類MHC/抗原複合物發揮作用之任何自體免疫疾病皆可根據本發明方法治療。

該等自體免疫疾病包括例如青少年發作型糖尿病(胰島素依賴性)、多發性硬化、尋常天疱瘡、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、重症肌無力、全身性紅斑狼瘡症、類風濕性關節炎及橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)。

在另一系列實施例中，該等方法用以治療處於過敏反應風險中或罹患過敏反應的哺乳動物，尤其人類。「過敏反應」意謂宿主對特定抗原之免疫反應不必要或不成比例從而導致病變的現象。過敏症為此項技術中所熟知，且術語「過敏反應」在本文中係根據醫學領域中之標準用法使用。

過敏症之實例包括(但不限於)對花粉、「豚草」、貝類、家畜(例如貓及狗)、蜂毒、室內塵蟎過敏原及其類似物之過敏症。另一特別涵蓋之過敏反應為引起哮喘之過敏反應。過敏反應可在人類中發生，因為T細胞尤其識別II

類MHC/抗原肽複合物。若抑制形成該等II類MHC/抗原肽複合物，則過敏反應得以降低或抑制。II類MHC/抗原肽複合物發揮作用之任何過敏反應皆可根據本發明方法治療。藉由本發明方法達成之免疫抑制通常將預防或治療性治療可能在氣喘發作或過敏性休克期間出現之嚴重或危及生命之過敏反應。該治療較佳為治療性治療。

在另一系列實施例中，該等方法用以治療已經受或即將經受器官移植或組織移植之哺乳動物，尤其人類。在組織移植(例如腎臟、肺臟、肝臟、心臟)或皮膚移植中，當供體與受體之II類MHC基因型(HLA型)之間存在錯配時，可能存在針對供體組織之嚴重「同種異體」免疫反應，其由供體細胞之表面上存在非自身或同種異體II類MHC分子呈現抗原肽而產生。鑒於此反應取決於II類MHC/抗原肽複合物之形成，故抑制組織蛋白酶S可抑制此反應且減輕組織排斥。組織蛋白酶S之抑制劑可單獨或結合其他治療劑使用，例如作為環孢素A及/或抗淋巴球 γ 球蛋白之輔助物以達成免疫抑制且提高移植存活率。較佳藉由在手術前及/或手術後全身性應用於宿主來實現投藥。或者或此外，在移植之前或之後灌注供體器官或組織可能有效。

以上實施例已以II類MHC機制說明，但本發明不限於此作用機制。抑制組織蛋白酶S作為對COPD或慢性疼痛之治療可能例如根本不涉及II類MHC。

本發明之相關態樣係關於一種治療正經受在患者中引起免疫反應，較佳有害免疫反應之治療之患者的方法，該方

法包含向患者投與式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽、n-氧化物或水合物。免疫反應通常係由II類MHC分子介導。本發明化合物可在治療之前、同時或之後投藥。治療通常涉及使用生物製劑(諸如蛋白質)，較佳抗體，更佳單株抗體之治療。更佳，生物製劑為Remicade®、Refacto®、ReferonA®、第八因子、第七因子、Betaseron®、Epogen®、Enbrel®、干擾素 β 、Botox®、Fabrazyme®、Elspar®、Cerezyme®、Myobloc®、Aldurazyrne®、Verluma®、干擾素 α 、Humira®、Aranesp®、Zevalin®或OKT3。或者，治療涉及使用肝素、低分子量肝素、普魯卡因胺(procainamide)或聯胺肼(hydralazine)。

用於在治療包括神經痛或發炎性疼痛之慢性疼痛中評估組織蛋白酶S抑制劑之分析描述於WO 03/20287中。

當前可根據本發明治療之較佳適應症包括：

牛皮癬；

自體免疫適應症，包括特發性血小板減少性紫癜(ITP)、類風濕性關節炎(RA)、多發性硬化(MS)、重症肌無力(MG)、休格連氏症候群(Sjögrens syndrome)、格雷夫斯氏病及全身性紅斑狼瘡(SLE)；

非自體免疫適應症，包括過敏性鼻炎、哮喘、動脈粥樣硬化、慢性阻塞性肺病(COPD)及慢性疼痛。

本發明化合物可形成鹽，其形成本發明之另一態樣。本發明化合物之適當醫藥學上可接受之鹽包括有機酸、尤其羧酸之鹽，包括(但不限於)乙酸鹽、三氟乙酸鹽、乳酸

鹽、葡糖酸鹽、檸檬酸鹽、酒石酸鹽、順丁烯二酸鹽、蘋果酸鹽、泛酸鹽、羥乙磺酸鹽、己二酸鹽、海藻酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、丁酸鹽、二葡糖酸鹽、環戊酸鹽、葡糖庚酸鹽、甘油磷酸鹽、草酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、反丁烯二酸鹽、菸鹼酸鹽、棕櫚酸鹽、果膠酸鹽、3-苯丙酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、酒石酸鹽、乳糖酸鹽、特戊酸、樟腦酸鹽、十一烷酸鹽及丁二酸鹽，有機磺酸之鹽，諸如甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、2-羥基乙磺酸鹽、樟腦磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、苯磺酸鹽、對氯苯磺酸鹽及對甲苯磺酸鹽；及無機酸之鹽，諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、半硫酸鹽、硫氰酸鹽、過硫酸鹽、磷酸及磺酸。

本發明化合物在一些情況下可以水合物形式分離。水合物通常係藉由使用諸如二氧雜環己烯、四氫呋喃或甲醇之有機溶劑自水性/有機溶劑混合物中再結晶而製備。水合物亦可藉由將相應酮投與患者而原位產生。

本發明化合物之N-氧化物可藉由一般熟習此項技術者已知之方法製備。舉例而言，N-氧化物可藉由在約0°C下在適合之惰性有機溶劑(例如鹵代烴，諸如二氯甲烷)中以氧化劑(例如三氟過氧乙酸、過順丁烯二酸、過苯甲酸、過乙酸、間氯過氧苯甲酸或其類似物)處理本發明化合物之未氧化形式來製備。或者，本發明化合物之N-氧化物可由適當起始物質之N-氧化物製備。

呈未氧化形式之本發明化合物可自本發明相應化合物之

N-氧化物藉由在0°C至80°C下在適合惰性有機溶劑(例如乙腈、乙醇、二噁烷水溶液或其類似物)中以還原劑(例如硫、二氧化硫、三苯膦、硼氫化鋰、硼氫化鈉、二氯化磷、三溴化物或其類似物)處理來製備。

本發明亦包括同位素標記之式I或式I之任何子群的化合物，其中一或多個原子經彼原子之同位素(亦即原子序數與通常在自然界中發現之原子相同但原子質量與其不同之原子)置換。可併入式I或式I之任何子群之化合物的同位素之實例包括(但不限於)氫之同位素，諸如 ^2H 及 ^3H (亦分別用D表示氘且用T表示氚)；碳之同位素，諸如 ^{11}C 、 ^{13}C 及 ^{14}C ；氮之同位素，諸如 ^{13}N 及 ^{15}N ；氧之同位素，諸如 ^{15}O 、 ^{17}O 及 ^{18}O ；磷之同位素，諸如 ^{31}P 及 ^{32}P ；硫之同位素，諸如 ^{35}S ；氟之同位素，諸如 ^{18}F ；氯之同位素，諸如 ^{36}Cl ；溴之同位素，諸如 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 及 ^{82}Br ；及碘之同位素，諸如 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 及 ^{131}I 。

包括於同位素標記化合物中之同位素的選擇將取決於該化合物之特定應用。舉例而言，對於藥物或基質組織分佈分析，併有諸如 ^3H 或 ^{14}C 之放射性同位素的化合物一般將最適用。對於放射成像應用(例如正電子發射斷層攝影法(PET))，諸如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{13}N 或 ^{15}O 之正電子發射同位素將適用。併有較重同位素(諸如氘亦即 ^2H)可對式I或式I之任何子群之化合物提供較大代謝穩定性，其可導致例如化合物之活體內半衰期延長或劑量需求降低。舉例而言， ^2H 同位素通常併入於部署為易發生代謝之位置處。本發明化合物

中，併有 ^2H 同位素之適合位置為例如作為1,1-伸環烷基之取代基，亦即 R^{2a} 及 R^{2b} 中之一者或兩者為 ^2H 。

同位素標記之式I或式I之任何子群的化合物可藉由與本文以下之流程及/或實例中所述類似之方法，藉由使用適當同位素標記試劑或起始物質替代相應非同位素標記試劑或起始物質，或藉由熟習此項技術者已知之習知技術來製備。

應注意，定義中所用之任何分子部分上之基團位置可為該部分上之任何位置，只要其具化學穩定性即可。

本文中所用之以下術語具有如下定義之含義：

本文使用之「 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基」表示具有指定數目碳原子之直鏈或支鏈烷基，例如 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基意謂具有1至4個碳原子之烷基。用於本發明之較佳烷基為 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基且包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、第三丁基、正丁基及異丁基。甲基及第三丁基通常較佳。 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基具有相應含義，亦包括戊基及己基之所有直鏈及分支鏈異構體。表述「 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基」可單獨使用或在諸如 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 鹵烷基、 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基羰基、 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基胺等複合表述中使用。

術語「Me」意謂甲基，「MeO」意謂甲氧基，Et意謂乙基且Ac意謂乙醯基。

如本文中所用之「 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 鹵烷基」表示如以上所定義之 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基，其中至少一個C原子經鹵素、較佳氯或氟取代。三氟甲基通常較佳。

如本文中所用之「 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷氧基」表示基團 $\text{C}_m\text{-C}_n$ 烷基-

O，其中 C_m-C_n 烷基如以上所定義。典型 C_m-C_n 烷氧基包括 C_1-C_4 烷氧基，諸如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、第三丁氧基、正丁氧基及異丁氧基。甲氧基及異丙氧基通常較佳。 C_1-C_6 烷氧基具有相應含義，擴大為包括戊氧基及己氧基之所有直鏈及分支鏈異構體。

如本文中所用之「 C_m-C_n 鹵烷氧基」表示其中至少一或多個C原子經一或多個鹵素原子(通常為氯或氟)取代之 C_m-C_n 烷氧基。在許多情況下三氟甲基較佳。在 C_m-C_n 鹵烷氧基中， C_1-C_4 鹵烷氧基較佳。

如本文中所用之「 C_3-C_n 環烷基」表示具有指定數目碳原子之環狀單價烷基，例如 C_3-C_6 環烷基意謂具有3至6個碳原子之環狀單價烷基。用於本發明之較佳環烷基為 C_3-C_4 烷基，亦即環丙基及環丁基。

如本文中所用之「 C_3-C_n 伸環烷基」表示具有指定數目碳原子之二價環烷基。用於本發明之較佳伸環烷基為 C_3-C_4 伸環烷基，亦即伸環丙基及伸環丁基。

「 C_m-C_n 烷氧羰基」意謂基團 C_m-C_n 烷基-O-C(=O)。

本發明化合物包括許多諸如OH、NH或COOH基團之操作，對此可應用習知前藥部分。前藥通常在活體內水解以在血漿、肝臟或腸壁中釋放母體化合物。有利前藥為羧基酯，諸如 R^1 處之酚羧基；或胺官能基，諸如磺醯胺官能基。較佳醫藥學上可接受之酯包括來源於 C_1-C_6 羧酸之酯，諸如乙醯基酯或特戊醯基酯或視情況經取代之苯甲酸酯，較佳未經取代或經廣泛地如對 R^{1a} 描述之取代基取

代，該等取代基通常為1-3個鹵基(例如氟)、C₁-C₄烷基(例如 Me)、C₁-C₄鹵烷基(例如 CF₃)或C₁-C₄烷氧基(例如 MeO)。有利磺醯胺前藥包括來源於C₁-C₆羧酸之胺醯基(諸如乙醯基或特戊醯基)或視情況經取代之苯甲酸酯，較佳未經取代或經廣泛地如對於變數R^{1a}描述之取代基取代，該等取代基通常為1-3個鹵基(例如氟)、C₁-C₄烷基(例如 Me)、C₁-C₄鹵烷基(例如 CF₃)或C₁-C₄烷氧基(例如 MeO)。

除非另有提及或指示，否則化合物之化學名稱涵蓋該化合物可能具有之所有可能立體化學異構形式之混合物。該混合物可含有該化合物之基本分子結構的所有非對映異構體及/或對映異構體。純形式或彼此混合之本發明化合物的所有立體化學異構形式均意欲包含於本發明之範疇內。

如本文中提及之化合物及中間物之純立體異構形式係定義為實質上不含該等化合物或中間物之相同基本分子結構之其他對映異構或非對映異構形式的異構體。特定而言，術語「立體異構純」係關於具有至少80%之立體異構過量(亦即最少90%之一種異構體及最多10%之其他可能異構體)直至100%之立體異構過量(亦即100%之一種異構體且無其他異構體)之化合物或中間物，更特定而言，具有90%直至100%之立體異構過量、甚至更特定而言具有94%直至100%之立體異構過量且最特定而言具有97%直至100%之立體異構過量的化合物或中間物。術語「對映異構純」及「非對映異構純」應以類似方式來理解，但分別關於所討論混合物之對映異構過量及非對映異構過量。

本發明化合物可藉由使該化合物之外消旋混合物與光學活性解析劑反應以形成一對非對映異構化合物，分離非對映異構體並回收光學純之對映異構體而製備成其個別立體異構體。雖然可使用式I化合物之共價非對映異構衍生物進行對映異構體之解析，但可分離複合物較佳(例如結晶、非對映異構鹽)。非對映異構體具有獨特物理特性(例如熔點、沸點、溶解度、反應性等)且可利用此等不同點容易地分離。非對映異構體可藉由例如HPLC之層析或較佳藉由基於溶解度差異之分離/解析技術來分離。接著藉由不會引起外消旋之任何實踐手段回收光學純對映異構體以及解析劑。適用於自化合物立體異構體之外消旋混合物解析化合物之立體異構體的技術之更詳細描述可見於Jean Jacques Andre Collet, Samuel H. Wilen, Enantiomers, Racemates and Resolutions, John Wiley & Sons, Inc. (1981)中。

雖然有可能單獨投與活性劑，但較佳使其作為醫藥調配物之部分。該調配物將包含以上定義之活性劑，以及一或多種可接受載劑/賦形劑及視情況選用之其它治療成份。載劑必須為可接受的，即可與該調配物之其它成份相容且對接受體無害。

調配物包括適合於經直腸、經鼻、經局部(包括經頰及經舌下)、經陰道或非經腸(包括經皮下、經肌肉內、經靜脈內及經皮內)投藥之調配物，但較佳調配物為經口投與之調配物。調配物可便利地以單位劑型(例如錠劑及持續

釋放膠囊)存在，且可藉由藥劑學技術中熟知之任何方法製備。該等方法包括使以上定義之活性劑與載劑締合之步驟。通常，如下製備調配物：使活性劑與液體載劑或細粉狀固體載劑或兩者均勻且緊密締合，接著若必要則使產物成形。本發明擴展至製備醫藥組合物之方法，其包含使式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽與醫藥學上可接受之載劑或媒劑接合或締合。若醫藥調配物之製造涉及均勻混合醫藥賦形劑與呈鹽形式之活性成份，則經常較佳使用本質上非鹼性(意即酸性或中性)之賦形劑。

本發明中用於經口投藥之調配物可呈各自包含預定量之活性劑之離散單位(諸如膠囊、扁囊劑或錠劑)形式；粉末或顆粒形式；活性劑於水性液體或非水性液體中之溶液或懸浮液形式；或水包油液體乳液或油包水液體乳液形式及大丸劑等形式。

關於用於經口投藥之組合物(例如錠劑或膠囊)，術語「適合載劑」包括諸如常用賦形劑之媒劑，例如黏合劑，例如糖漿、阿拉伯樹膠、明膠、山梨糖醇、黃耆膠、聚乙烯吡咯啶酮(聚維酮(Povidone))、甲基纖維素、乙基纖維素、羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素、蔗糖及澱粉；填充劑及載劑，例如玉米澱粉、明膠、乳糖、蔗糖、微晶纖維素、高嶺土、甘露醇、磷酸二鈣、氯化鈉及褐藻酸；及潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸鈉及其它金屬硬脂酸鹽、硬脂酸甘油酯硬脂酸、聚矽氧流體、滑石蠟、油類及膠態二氧化矽。亦可使用芳香劑，諸如胡椒薄荷、冬青

油、櫻桃香精或其類似物。可能需要添加著色劑以使劑型可容易辨識。亦可藉由此項技術中熟知之方法塗佈錠劑。

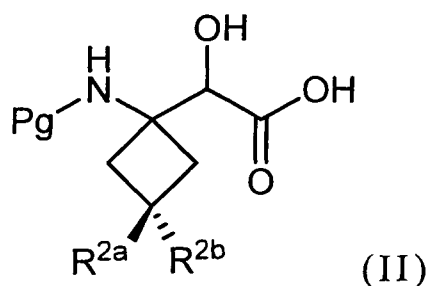
可藉由壓縮或模塑，視情況使用一或多種附加成份製備錠劑。壓縮錠劑可藉由在適合機器中壓縮呈自由流動形式(諸如粉末或顆粒)之活性劑來製備，活性劑視情況與黏合劑、潤滑劑、惰性稀釋劑、防腐劑、表面活性劑或分散劑混合。可在適合機器中，由經惰性液體稀釋劑濕潤之粉末狀化合物之混合物模塑製成模製錠劑。錠劑可視情況經塗佈或刻痕，且可經調配以便緩慢或控制釋放活性劑。

適於經口投藥之其它調配物包括口含錠，其包含於調味基質(通常為蔗糖及阿拉伯樹膠或黃耆膠)中之活性劑；片劑，其包含於惰性基質(諸如明膠及甘油，或蔗糖及阿拉伯樹膠)中之活性劑；及漱口劑，其包含於適合液體載劑中之活性劑。

如同所有藥物一樣，本發明之化合物或調配物之適當劑量將取決於適應症、疾病之嚴重程度、患者之體型及代謝活力、投藥模式且很容易藉由習知動物試驗決定。提供約0.01 μM 至100 μM 、更佳0.01 μM 至10 μM (諸如0.1 μM 至5 μM)之胞內(為抑制番木瓜蛋白酶超家族之生理蛋白酶)濃度的劑量通常合乎需要且可達成。

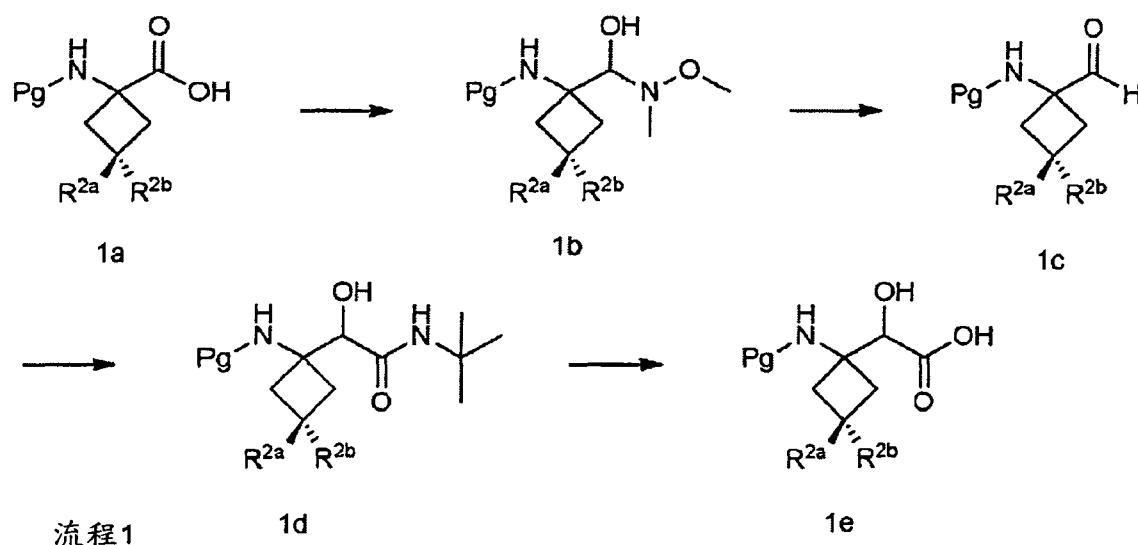
本發明化合物係藉由多種溶液及固相化學方法製備。

典型第一步驟為製備式II之P1構築嵌段。



其中 R^{2a} 及 R^{2b} 如上文所定義，Pg 為習知 N 保護基團，諸如 Boc、CBz 或 Fmoc。該等構築嵌段為新穎的且構成本發明之另一態樣。

式 II 之構築嵌段通常如以下流程 1 所述製備。

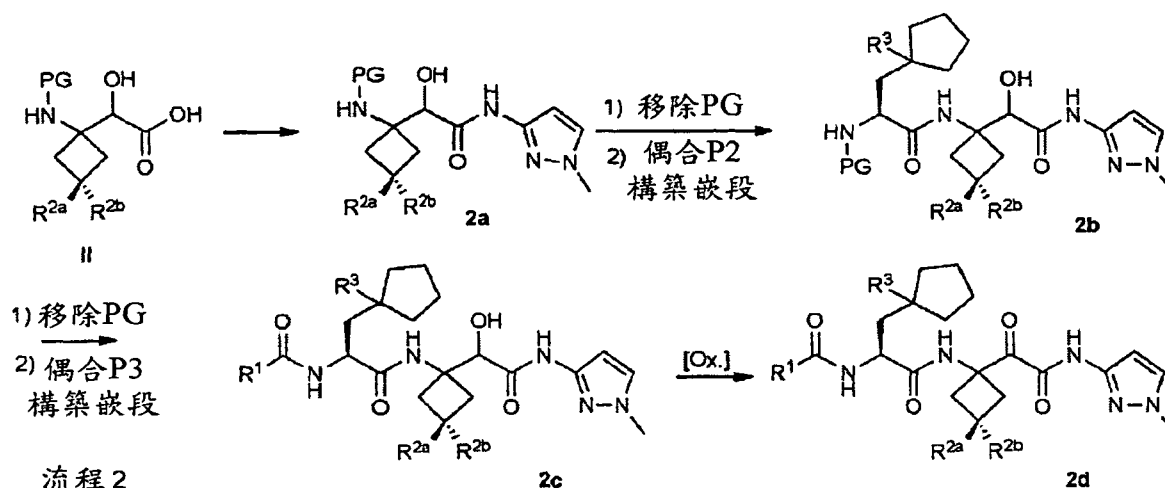


適合起始物質為 N 保護之環烷基胺基酸，其中若干可購得或可如以下實例中所示或如 Allan 等人在 J. Med. Chem., 1990 33(10)2905-2915 中所述製備。

羧酸 (1a) 經由魏因雷布合成 (Weinreb synthesis) 轉化為 N,O-二甲基異羥肱酸 (1b)，得到相應醛 (1c)。亦可藉由還原環烷基胺基酸之羧基官能基隨後在戴斯-馬丁條件 (Dess Martin condition) 下氧化來獲得醛。醛 (1c) 可隨後與第三丁基肼或等效物在帕瑟里尼反應 (Passerini reaction) 中反應以提供 α -羥基醯胺 (1d)。後續之醯胺水解接著提供所需 α -羥

基羧酸 P1 構築嵌段 (1e)。水解醯胺所需之強酸性條件一般亦導致 NBoc 保護 (若使用) 之損失。因此可使用胺直接偶合於 P2 構築嵌段或若其需要儲存，則胺可再加以保護。

因此，如以下流程 2 中所說明，接著將所提供之 P1 構築嵌段在 C 端及 N 端改質/延長以提供式 I 化合物。



通常式 II 構築嵌段之 C 端藉由使用任何適合之習知肽偶合策略與 N-甲基吡唑胺反應而在 C 端延長。此後使由此製備之 P1-最初側單元 (2a) 在 N 端脫除保護基且使用習知肽化學方法用 P2 隨後用 P3 構築嵌段伸長。舉例而言，可使用標準偶合條件 (諸如 DMF 中之 HATU、DIPEA) 經由 BocP2-OH 引入 P2 殘基。再次用乙醯氯甲醇溶液或等效物移除末端 Boc 保護，且經由使用標準偶合條件 (諸如 DMF 中之 HATU、DIPEA) 偶合 P3-OH 來引入 P3 殘基。或者，P3-P2-構築嵌段可分別製備且在一個步驟中直接添加至 P1-最初側構築嵌段 (2a)，因此提供二肽衍生物 (2c)。接著使用此項技術中已知之任何適宜氧化方法 (諸如戴斯-馬丁氧化或莫法特氧化 (Moffat oxidation) 或其類似方法) 將 α -羥基醯胺

氧化為相應 α -酮醯胺。

廣泛範圍之適用於P2構築嵌段之經適當保護之L-胺基酸及適用於P3構築嵌段之羧酸、羧酸鹵化物及胺甲醯基鹵化物可購得或藉由簡單化學方法或如WO 06/064286中所示來獲得。或者，可首先使P3構築嵌段及P2構築嵌段偶合，接著與P1-最初側單元反應。

通常視情況在1-羥基苯并三唑(HOBT)及諸如N,N-二異丙基乙胺、三乙胺、N-甲基嗎啉及其類似物之鹼存在下，在例如以下之適合偶合劑存在下進行伸長：六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基參吡咯啶鎂(PyBOP)、六氟磷酸O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基-鎂(HBTU)、六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-鎂(HATU)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)或1,3-二環己基碳化二亞胺(DCC)。反應通常在20℃至30℃下、較佳在約25℃下進行，且需要2小時至24小時來完成。適合反應溶劑為惰性有機溶劑，諸如鹵化有機溶劑(例如二氯甲烷、氯仿及其類似物)、乙腈、N,N-二甲基甲醯胺、醚溶劑(諸如四氫呋喃、二噁烷及其類似物)。

或者，可藉由首先將P3/P2構築嵌段轉化成諸如丁二醯亞胺酯之活性酸衍生物，接著使其與P1胺反應來進行以上伸長偶合步驟。反應通常需要2小時至3小時來完成。此反應中所使用之條件視活性酸衍生物之性質而定。舉例而言，若其為酸鹵化物衍生物，則反應在適合鹼(例如三乙胺、二異丙基乙胺、吡啶及其類似物)之存在下進行。適

合反應溶劑為極性有機溶劑，諸如乙腈、N,N-二甲基甲醯胺、二氯甲烷或其任何適合之混合物。

本文所使用之術語「N-保護基團」或「N-保護」係指意欲保護胺基酸或肽之N端或保護胺基防止在合成程序期間發生不需要之反應的基團。常用之N保護基團由Greene揭示於「Protective Groups in Organic Synthesis」(John Wiley & Sons, New York, 1981)中，其以引用之方式併入本文。N-保護基團包括醯基，諸如甲醯基、乙醯基、丙醯基、特戊醯基、第三丁基乙醯基、2-氯乙醯基、2-溴乙醯基、三氟乙醯基、三氯乙醯基、酞醯基、鄰硝基苯氧基乙醯基、 α -氯丁醯基、苄醯基、4-氯苄醯基、4-溴苄醯基、4-硝基苄醯基及其類似基團；磺醯基，諸如苯磺醯基、對甲苯磺醯基及其類似基團，胺基甲酸酯形成基團，諸如苄氧羰基、對氯苄氧羰基、對甲氧基苄氧羰基、對硝基苄氧羰基、2-硝基苄氧羰基、對溴苄氧羰基、3,4-二甲氧基苄氧羰基、4-甲氧基苄氧羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧羰基、1-(對聯苯基)-1-甲基乙氧羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、二苄氧羰基、第三丁氧羰基、二異丙基甲氧羰基、異丙氧羰基、乙氧羰基、甲氧羰基、烯丙氧羰基、2,2,2-三氯乙氧羰基、苯氧羰基、4-硝基苯氧羰基、苄基-9-甲氧羰基、環戊氧羰基、金剛烷氧羰基、環己氧羰基、苯基硫代羰基及其類似基團；烷基，諸如苄基、三苯基甲基、苄氧基甲基及其類似基團；及矽烷基，諸如三甲基矽烷基及其類似基團。有利

之N-保護基團包括甲醯基、乙醯基、苄醯基、特戊醯基、第三丁基乙醯基、苯磺醯基、苄基(Bz)、第三丁氧羰基(BOC)及苄氧羰基(CBz)。

羥基及/或羧基保護基亦由Greene在如上文獻中廣泛評論，且包括醚，諸如甲基醚，經取代之甲基醚，諸如甲氧基甲基、甲硫基甲基、苄氧基甲基、第三丁氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基及其類似基團；矽烷基醚，諸如三甲基矽烷基(TMS)、第三丁基二甲基矽烷基(TBDMS)、三苄基矽烷基、三苯基矽烷基、第三丁基二苯基矽烷基、三異丙基矽烷基及其類似基團；經取代之乙基醚，諸如1-乙氧基甲基、1-甲基-1-甲氧基乙基、第三丁基、烯丙基、苄基、對甲氧基苄基、二苯基甲基、三苯基甲基及其類似基團；芳烷基，諸如三苯甲基及pixyl(9-羥基-9-苯基二苯并呋喃衍生物，尤其氯化物)。酯羥基保護基包括諸如甲酸酯、苄基甲酸酯、氯乙酸酯、甲氧基乙酸酯、苄氧基乙酸酯、特戊酸酯、金剛烷酸酯、茱酸酯、苯甲酸酯及其類似物之酯。碳酸酯羥基保護基包括甲基乙烯基、烯丙基、桂皮基、苄基及其類似基團。

【實施方式】

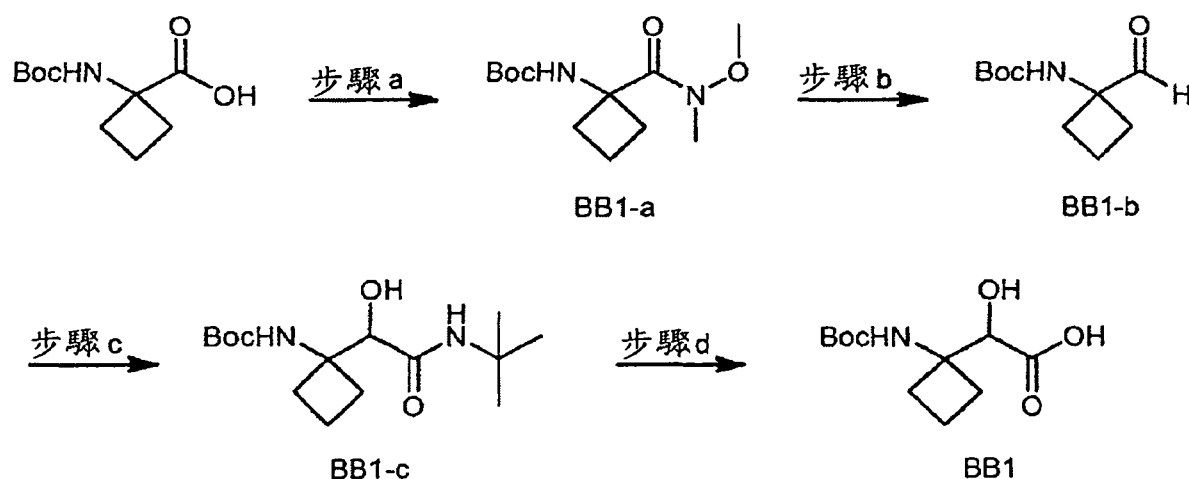
現將以僅舉例說明之方式參考下列實例描述本發明之各種實施例。

在以下實例中，通常使用以下系統：

核磁共振(NMR)光譜係在指定溶劑中於Varian Gemini 7 Tesla 300 MHz儀器或Bruker Avance 400 MHz儀器上記

錄。化學位移係以自四甲基矽烷(TMS)向低場及高場位移之ppm形式給出。共振多重性分別以s、d、t、m、br及app表示單峰、雙峰、三重峰、多重峰、寬峰及明顯峰。質譜分析法(MS)光譜係於Finnigan SSQ7000 TSP或Finnigan SSQ710 DI/EI儀器上記錄。LC-MS係使用裝有Waters Xterra™ MS C₈ 2.5 μm 2.1 mm×30 mm柱、Waters 996光電二極體陣列偵測器及Micromass ZMD之Waters 2790 LC系統獲得。高壓液相層析(HPLC)分析係使用裝有Zorbax柱SB-C₈ 4.6 mm×15 cm之Hewlett Packard 1100系列HPLC系統進行。管柱層析係使用矽膠60(230-400目, ASTM, Merck)進行, 且薄層層析(TLC)係在TLC預塗佈板矽膠60 F₂₅₄(Merck)上進行。

製備構築嵌段1(BB1), P1構築嵌段



步驟 a) 2-(1-((第三丁氧羰基)胺基)環丁基)-2-羥基乙酸 (BB1-a)

向1-第三丁氧羰基胺基-環丁烷甲酸(3 g, 13.94 mmol)於無水DMF(50 mL)中之溶液中添加N,O-二甲基羥胺鹽酸鹽

(1.36 g, 13.94 mmol)及DIEA(9.21 mL, 55.75 mmol)。將反應燒瓶冷卻至0℃且10分鐘後添加HATU(5.30 g, 13.94 mmol)至溶液(其在添加後即變黃)。2小時後，藉由在減壓下旋轉蒸發移除DMF。將殘餘物溶解於EtOAc(100 mL)中並用10%檸檬酸(水溶液)及飽和NaHCO₃(水)溶液洗滌兩次。有機相用Na₂SO₄乾燥，在二氧化矽上過濾並蒸發。藉由急驟層析(庚烷:乙酸乙酯(1:1))純化產物，得到緩慢結晶之呈無色油狀之產物(3.13 g)，產率為87%。

步驟b) (1-甲醯基-環丁基)-胺基甲酸第三丁酯(BB1-b)

在0℃下，將LiAlH₄(202 mg, 5.33 mmol)添加至魏因雷布醯胺BB1-a(1.10 g, 4.27 mmol)溶解於無水乙醚(35 mL)中之溶液中。攪拌溶液15分鐘，然後緩慢添加酒石酸氫鉀(飽和，水溶液)來淬滅反應，並攪拌10分鐘。將溶液倒入分液漏斗並以乙酸乙酯萃取水相兩次。用0.5 M HCl(3次)、NaHCO₃(水溶液)(2次)及鹽水(1次)洗滌經合併之有機相。有機相用Na₂SO₄乾燥，在二氧化矽上過濾並蒸發。藉由急驟層析(庚烷:乙酸乙酯(4:1至3:1))純化產物，得到呈白色晶體狀之產物(0.647 g)，產率為76%。

步驟c) [1-(第三丁基胺甲醯基-羥基-甲基)-環丁基]-胺基甲酸第三丁酯(BB1-c)

在惰性氣體下，將BB1-b(1.75 g, 8.78 mmol)溶解於CH₂Cl₂(18 mL)中並在冰浴中冷卻。添加吡啶(2.85 mL)，隨後添加第三丁基肼(1.50 mL, 13.3 mmol)。接著經30分鐘逐滴添加三氟乙酸(1.35 mL, 17.5 mmol)。將黃色溶液

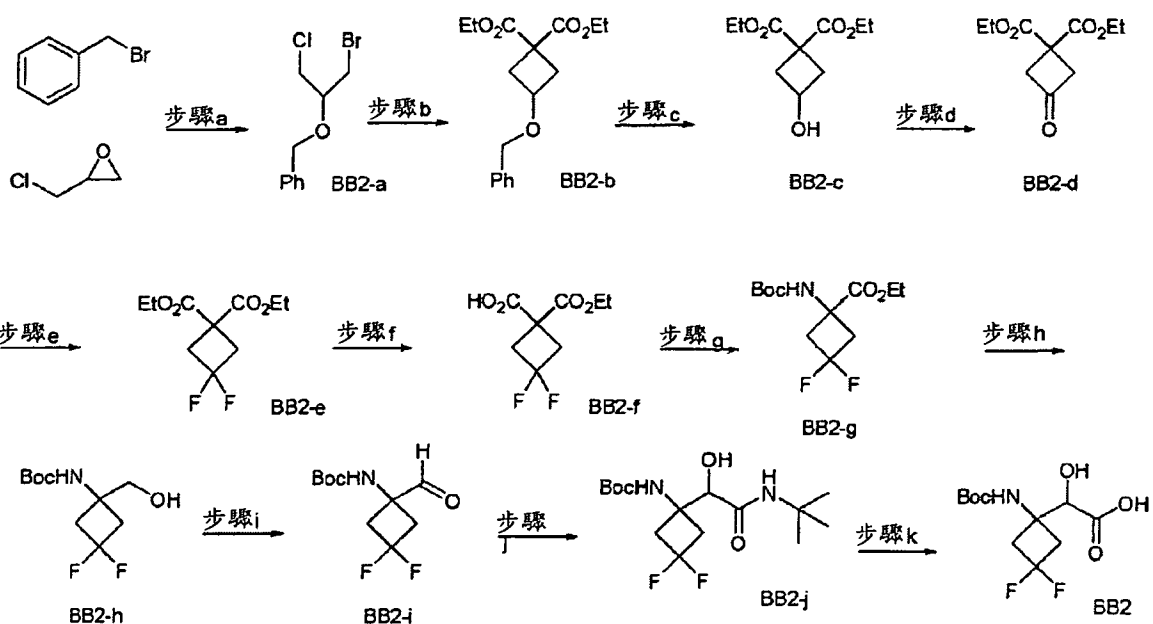
在室溫下攪拌隔夜。濃縮混合物，用 EtOAc(100 mL)稀釋並依次用 1 N HCl(50 mL)、飽和 NaHCO₃(50 mL)及飽和 NaCl(2×50 mL)洗滌。乾燥(Na₂SO₄)並在真空下濃縮。在室溫下，用 THF(2.5 mL)及 1 M LiOH於 3/1 MeOH-水中之溶液(2.5 mL)中處理所得之粗產物。15分鐘後 TLC(3/1 石油醚-EtOAc)顯示完全酯水解。反應 45 分鐘後，添加 1 N HCl(2.5 mL)、水(10 mL)及 EtOAc(20 mL)並分離各層。用飽和 NaHCO₃(20 mL)，接著用飽和 NaCl(2×20 mL)洗滌有機相，乾燥(Na₂SO₄)並濃縮。急驟層析(75 g 二氧化矽，5/1 至 1/1 石油醚-EtOAc)獲得白色固體(2.36 g，89%)。

步驟 d) (1-第三丁氧羰基氨基-環丁基)-羧基乙酸(BB1)

使 BB1-c(1.30 g，4.33 mmol)與 6 N HCl(40 mL)一起回流，直至藉由 LCMS 監測醯胺水解完全。蒸發混合物，與水共蒸發若干次。添加 1 M NaOH(15 mL)至殘餘物中且在真空下攪拌鹼性溶液 15 分鐘。添加含 Boc₂O(1.92 g，8.80 mmol)之二噁烷(10 mL)，保持 pH 值在 10 至 11，並在室溫下攪拌混合物隔夜。在冰浴中用水稀釋(50 mL)混合物，用 1 N HCl 酸化至 pH 3，接著以 EtOAc(2×50 mL，接著 30 mL)萃取。有機相用飽和 NaCl(50 mL)洗滌，乾燥(Na₂SO₄)並蒸發，獲得粗 P1 構築嵌段 BB1(0.649 g)。

¹H NMR (400 MHz，d₆-DMSO) δ 6.88 (br s, 1H)，4.15 (s, 1H)，2.40 (br m, 2H)，1.98 (br m, 2H)，1.80 (br m, 2H)，1.35 (s, 9H)；ms ES⁺ m/z 146 (100%)，190 (50%)。

製備構築嵌段 2(BB2)，P1 構築嵌段



步驟 a) ((1-溴-3-氯丙-2-基-氧基)甲基)苯 (BB2-a)

向經攪拌之苄基溴 (185 g, 1.08 mol) 與 (1.5 g) 氯化亞汞之混合物中添加表氯醇 (100 g, 1.08 mol)。在 100°C 下加熱反應混合物 12 小時。TLC 分析證實產物形成。藉由管柱層析使用石油醚作為溶離劑自深棕色反應混合物中分離產物。TLC 系統：石油醚：乙酸乙酯 (9:1), $R_F=0.7$ 。產量：148 g, 51%。

步驟 b) 3-苄氧基-環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯 (BB2-b)

經 20 分鐘向經攪拌之氫化鈉 (22.5 g, 0.562 mol) 於 800 mL 無水二噁烷中之懸浮液中逐滴添加丙二酸二乙酯 (90 g, 0.562 mol)。此添加完成後，經 20 分鐘逐滴添加 BB2-a (148 g, 0.56 mol)。接著在回流下加熱混合物 24 小時。冷卻至室溫後，將含氫化鈉 (22.5 g, 0.562 mol) 之少量二噁烷 (約 20 mL) 添加至混合物中並繼續在回流下加熱另外 48 小時。在減壓下部分移除溶劑，並用 800 mL 水處理混合物。接著以乙酸乙酯 (500 mL×3) 萃取此混合物，乾燥

(Na₂SO₄)萃取物並真空濃縮，且藉由管柱層析使用石油醚：乙酸乙酯(10%)純化殘餘物，得到標題化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(9:1)，R_F=0.3。產量：100 g，58%。

步驟c) 3-羥基環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB2-c)

向化合物BB2-b(40 g)於EtOH(500 mL)中之溶液中添加10%鈀/碳(4 g)，且在室溫下在50 psi下將混合物氫化3.5小時。藉由過濾移除催化劑，用乙酸乙酯洗滌，接著在減壓下移除EtOH及溶劑。藉由矽膠層析以己烷/乙酸乙酯作為溶離劑純化殘餘物得到標題化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(9:1)，R_F=0.3。產量：18 g，64%。

步驟d) 3-側氧基環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB2-d)

向化合物BB2-c(18 g，0.0833 mol)於DCM(200 mL)中之溶液中添加PCC(37 g，0.176 mol)，並在室溫下攪拌混合物四個小時。經矽膠管柱過濾溶液，並用DCM/MeOH 98/2洗滌殘餘物，接著經類似管柱過濾。在減壓下蒸發經合併之溶離份得到所要化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(9:1)，R_F=0.3。產量：11 g，62%。

步驟e) 3,3-二氟環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB2-e)

向經冷卻之化合物BB2-d(11 g，0.0513 mol)於無水DCM(150 mL)中之溶液中逐滴添加DAST(18.72 g，0.116 mol)溶液，並在室溫下攪拌混合物隔夜。將混合物添加至冰水中並用DCM萃取三次。溶液用硫酸鈉乾燥並在減壓下蒸發。藉由矽膠層析使用己烷/乙酸乙酯作為溶離劑純化

殘餘物得到標題化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(7:3)， $R_F=0.5$ 。產量：7.7 g，64%。

步驟f) 1-(乙氧羰基)-3,3-二氟環丁烷甲酸(BB2-f)

將化合物BB2-e(7.7 g，0.0325 mol)溶解於經冰冷卻之0.5 M乙醇氫氧化鉀溶液(30 mL)及水(6 mL)中。在室溫下攪拌混合物隔夜。添加水並在減壓下移除大部分乙醇。用2 M HCl酸化混合物並用乙酸乙酯萃取三次。有機相用硫酸鈉乾燥並在減壓下蒸發獲得所要化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(1:1)， $R_F=0.3$ 。產量：5.8 g，86%。

步驟g) 1-(第三丁氧羰基氨基)-3,3-二氟環丁烷甲酸乙酯(BB2-g)

向化合物BB2-f(5.8 g，0.0273 mol)於無水二噁烷(100 mL)中之溶液中添加第三丁醇(24.4 mL)、DPPA(7.87 g，0.027 mol)及TEA(2.87 g，0.0284 mol)，並回流混合物五小時。添加乙酸乙酯(約200 mL)並用5%檸檬酸及飽和碳酸氫鈉洗滌有機相兩次。使溶液乾燥並在減壓下蒸發。藉由矽膠層析用己烷/乙酸乙酯分離所要產物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(1:1)， $R_F=0.5$ 。產量：4 g，51.4%。

步驟h) 3,3-二氟-1-(羥甲基)環丁基氨基甲酸第三丁酯(BB2-h)

向經冰冷卻之化合物BB2-g(4 g，0.0143 mol)於無水THF(100 mL)中之溶液中緩慢添加2 M硼氫化鋰溶液(30 mL)，並使混合物升溫至室溫。在室溫下攪拌混合物三小時。添加冰水及5%檸檬酸並用DCM萃取混合物三次。使

有機相乾燥(Na_2SO_4)，過濾並在減壓下蒸發，獲得標題化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(1:1)， $R_F=0.3$ 。產量：3.1 g，91%。

步驟 i) 3,3-二氟-1-甲醯基環丁基胺基甲酸第三丁酯(BB2-i)

向BB2-h(3.1 g，0.0130 mol)於無水DCM(100 mL)中之溶液中添加戴斯-馬丁高碘烷(19.9 g，0.0470 mol)，並在室溫下攪拌混合物三小時。添加乙酸乙酯(200 mL)並用10%硫代硫酸鈉溶液洗滌有機相兩次，用0.5 M NaOH及用鹽水洗滌兩次。將有機相乾燥並在減壓下蒸發。藉由矽膠層析用己烷/乙酸乙酯作為溶離劑純化殘餘物，獲得標題化合物。TLC系統：石油醚：乙酸乙酯(1:1)， $R_F=0.4$ 。產量：2.7 g，87%。

步驟 j) 1-(2-(第三丁基胺基)-1-羥基-2-側氧基乙基)-3,3-二氟環丁基胺基甲酸第三丁酯(BB2-j)

向經冰冷卻之化合物BB2-i(1.5 g，0.0064 mol)於無水DCM(100 mL)中之溶液中添加異氰酸第三丁酯(0.81 g，0.009 mol)及吡啶(2.04 g，0.027 mol)。經十分鐘時間添加三氟乙酸(1.58 g，0.015 mol)。在室溫下攪拌混合物五小時。添加乙酸乙酯，並用5%檸檬酸及鹽水洗滌有機相兩次。蒸發有機相並溶解於二噁烷(50 mL)中。添加1 M LiOH溶液(100 mL)並在室溫下攪拌混合物隔夜。添加5%檸檬酸並用乙酸乙酯萃取混合物三次。用鹽水洗滌有機相，乾燥(Na_2SO_4)，過濾並在減壓下蒸發。藉由矽膠層析以己烷/乙酸乙酯作為溶離劑純化產物。TLC系統：石油

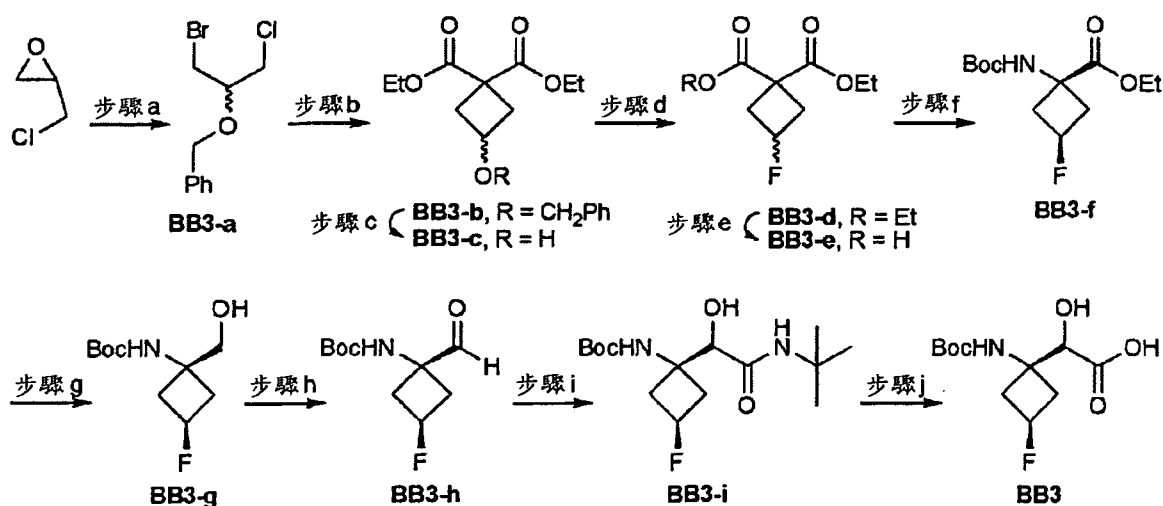
醚：乙酸乙酯(1:1)， $R_F=0.4$ 。產量：1.0 g，46%。

步驟k) 2-(1-(第三丁氧羰基胺基)-3,3-二氟環丁基)-2-羥基乙酸(BB2)

將化合物BB2-j(1 g)溶解於6 N HCl(40 mL)中，並加熱至回流24小時，其後TLC顯示反應已達到完全。在真空下濃縮反應混合物並將殘餘物溶解於THF:H₂O(7:3，50 mL)中，並添加TEA(1.8 mL，0.012 mol)與Boc酐(2.6 g，0.012 mol)。在室溫下攪拌混合物8小時，此時TLC證實反應已達到完全。在真空下濃縮反應混合物並藉由管柱層析使用含5%甲醇之氯仿純化殘餘物，獲得標題化合物。TLC系統：MeOH:CHCl₃(1:9)， $R_F=0.4$ 。產量：0.6 g，72%。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7.30 (br s, 1H), 4.11 (s, 1H), 2.90 (br m, 2H), 2.61 (br m, 2H), 1.35 (s, 9H); ms ES⁺ m/z 281 (100%)。

製備構築嵌段3(BB3)，P1構築嵌段



步驟a) ((1-溴-3-氯丙-2-基氧基)甲基)苯(BB3-a)

在150℃下將苄基溴(46.0 g，0.269 mol)及表氯醇(24.9

g, 0.269 mol)及氯化亞汞(0.04 g, 0.085 mmol)之混合物加熱12小時。藉由管柱層析(矽膠60-120目, 溶離劑為含1% EtOAc之石油醚)純化粗產物, 得到呈黏性液體狀之標題化合物(50 g, 產率70%)。TLC系統: 含10% EtOAc之石油醚, $R_f=0.6$ 。

步驟b) 3-(苄氧基)環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB3-b)

將含NaH(4.6 g, 0.192 mol)之無水二噁烷(150 mL)置放入裝有攪拌器、加料漏斗及回流冷凝器之三頸燒瓶中。向此攪拌反應混合物中, 經30分鐘逐滴添加丙二酸二乙酯(30.75 g, 0.192 mol)。添加完成後, 經30分鐘之時間逐滴添加化合物BB3-a(50 g, 0.19 mol)。將反應混合物回流24小時。冷卻至室溫之後, 將NaH(4.6 g, 0.192 mol)及無水二噁烷(40 mL)添加至反應混合物中並進一步加熱至回流另外48小時。在減壓下部分移除溶劑, 並用水(150 mL)處理混合物。以乙醚(3×100 mL)萃取產物, 用鹽水洗滌有機層並經無水 Na_2SO_4 乾燥。在真空中濃縮溶劑, 並藉由管柱層析(矽膠60-120目, 溶離劑為含2% EtOAc之石油醚)純化粗產物, 得到呈黏性液體狀之標題化合物(33 g, 產率57%)。TLC系統: 含15% EtOAc之石油醚, $R_f=0.5$ 。

步驟c) 3-羥基環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB3-c)

向化合物BB3-b(33 g, 0.108 mol)於EtOH(300 mL)中之溶液中添加10%鈀/碳(10 g), 並在室溫下在50 psi壓力下將混合物氫化48小時。藉由經由矽藻土床過濾移除催化劑並用EtOAc澈底洗滌。在減壓下移除溶劑。藉由矽膠層析(矽

膠 60-120 目，溶離劑為含 20% EtOAc 之石油醚)純化產物，得到呈黏性液體狀之標題化合物(12 g，產率 51%)。TLC 系統：含 30% EtOAc 之石油醚， $R_f=0.3$ 。

步驟 d) 3-氟環丁烷-1,1-二甲酸二乙酯(BB3-d)

將化合物 BB3-c(0.8 g，0.0037 mol)溶解於無水 DCM(16 mL)中並冷卻至 0°C。逐滴添加 DAST(1.8 g，0.011 mol)至冷溶液中。將反應混合物升溫至室溫，攪拌 12 小時。以冷飽和 NaHCO₃ 溶液淬滅反應混合物。以 DCM(100 mL)萃取粗產物。用 10% NaHCO₃ 溶液、水隨後用鹽水洗滌有機層並經無水 Na₂SO₄ 乾燥。在真空中濃縮溶劑，並藉由管柱層析(矽膠 60-120 目，溶離劑為含 1% 至 2% EtOAc 之石油醚)純化粗產物，得到呈淺黃色液體狀之標題化合物(460 mg，產率 57%)。TLC 系統：含 10% EtOAc 之石油醚， $R_f=0.4$ 。

步驟 e) 1-(乙氧羰基)-3-氟環丁烷甲酸(BB3-e)

將化合物 BB3-d(0.46 g，0.0021 mol)溶解於經冰冷卻之 0.5 M 氫氧化鉀於 EtOH(4.2 mL)及水(1.4 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌混合物隔夜。添加水並在減壓下移除大部分乙醇。用 2 N HCl 酸化混合物並以 EtOAc(3×50 mL)萃取。有機相經無水 Na₂SO₄ 乾燥。在真空中濃縮溶劑，得到粗標題化合物(0.35 g，粗)，其以原樣用作下一步驟。TLC 系統：含 50% EtOAc 之石油醚， $R_f=0.3$ 。

步驟 f) 1-(第三丁氧羰基胺基)-3-氟環丁烷甲酸乙酯(BB3-f)

向化合物 BB3-e(0.35 g，0.0018 mol)於無水二噁烷(6 mL)中之溶液中添加第三丁醇(1.8 mL)、二苯基磷醯基疊

氮化物(0.56 g, 0.002 mol)及三乙胺(0.2 g, 0.002 mol), 並將混合物回流5小時。反應完成後, 添加EtOAc(60 mL)至反應混合物中, 並用5%檸檬酸(2×20 mL)隨後用飽和NaHCO₃(50 mL)洗滌反應混合物。在減壓下蒸發有機溶劑。向殘餘物中添加EtOAc(100 mL)並用鹽水洗滌有機層並經無水Na₂SO₄乾燥。在真空中濃縮溶劑, 並藉由管柱層析(矽膠60-120目, 溶離劑為含5%至10% EtOAc之石油醚)純化粗產物, 得到呈白色晶體狀之標題化合物(0.27 g, 產率56%)。TLC系統: 含20% EtOAc之石油醚, R_f=0.4。

步驟g) 3-氟-1-(羥甲基)環丁基胺基甲酸第三丁酯(BB3-g)

向經冰冷卻之化合物BB3-f(0.27 g, 0.001 mol)於無水THF(10 mL)中之溶液中緩慢添加2 M硼氫化鋰溶液(2 mL, 0.004 mol), 並使混合物升溫至室溫。在室溫下攪拌混合物3小時。以冰水(2 mL)及5%檸檬酸(5 mL)淬滅反應混合物, 並以DCM(2×50 mL)萃取粗產物。用鹽水洗滌有機層並經Na₂SO₄乾燥。在真空中濃縮溶劑, 並藉由管柱層析(矽膠60-120目, 溶離劑為含15%至18% EtOAc之石油醚)純化粗產物, 得到呈白色固體狀之標題化合物(90 mg, 產率39%)。TLC系統: 含50% EtOAc之石油醚, R_f=0.5。

步驟h) 3-氟-1-甲醯基環丁基胺基甲酸第三丁酯(BB3-h)

向經脫氣之化合物BB3-g(90 mg, 0.0004 mol)於無水DCM(4.5 mL)中之溶液中添加戴斯-馬丁高碘烷(0.21 g, 0.0005 mol), 並在室溫下攪拌混合物3小時。添加EtOAc(30 mL)並用10%硫代硫酸鈉溶液(2×10 mL)、0.5 M

NaOH(20 mL)及鹽水洗滌有機層。有機層經無水Na₂SO₄乾燥。在真空中濃縮溶劑，並藉由管柱層析(矽膠60-120目，溶離劑為含10%至15% EtOAc之石油醚)純化粗產物，得到呈白色結晶固體狀之標題化合物(75 mg，產率87%)。TLC系統：含20% EtOAc之石油醚，R_f=0.4。

步驟i) 1-(2-(第三丁基胺基)-1-羥基-2-側氧基乙基)-3-氟環丁基胺基甲酸第三丁酯(BB3-i)

向經冰冷卻之化合物BB3-h(1.3 g，0.0059 mol)於無水DCM(25 mL)中之溶液中添加第三丁基肼(0.75 g，0.0089 mol)及無水吡啶(2.6 mL)。保持溫度在0℃下，經十分鐘之時間添加三氟乙酸(0.9 mL，0.0118 mol)。將反應混合物緩慢升溫至室溫並攪拌16小時。添加EtOAc(50 mL)並用5%檸檬酸及鹽水洗滌有機相兩次。蒸發有機相並將粗產物溶解於THF(25 mL)中。添加1 M LiOH於MeOH-H₂O(3:2體積比)中之溶液(2.6 mL)並在室溫下攪拌混合物2小時。以5%檸檬酸淬滅反應混合物，並以乙酸乙酯(2×25 mL)萃取混合物。用鹽水洗滌有機層並經Na₂SO₄乾燥。在真空中蒸發溶劑，得到足夠純以用於下一步驟中之標題化合物(1.6 g，產率84%)。TLC系統：含20% EtOAc之石油醚，R_f=0.3。

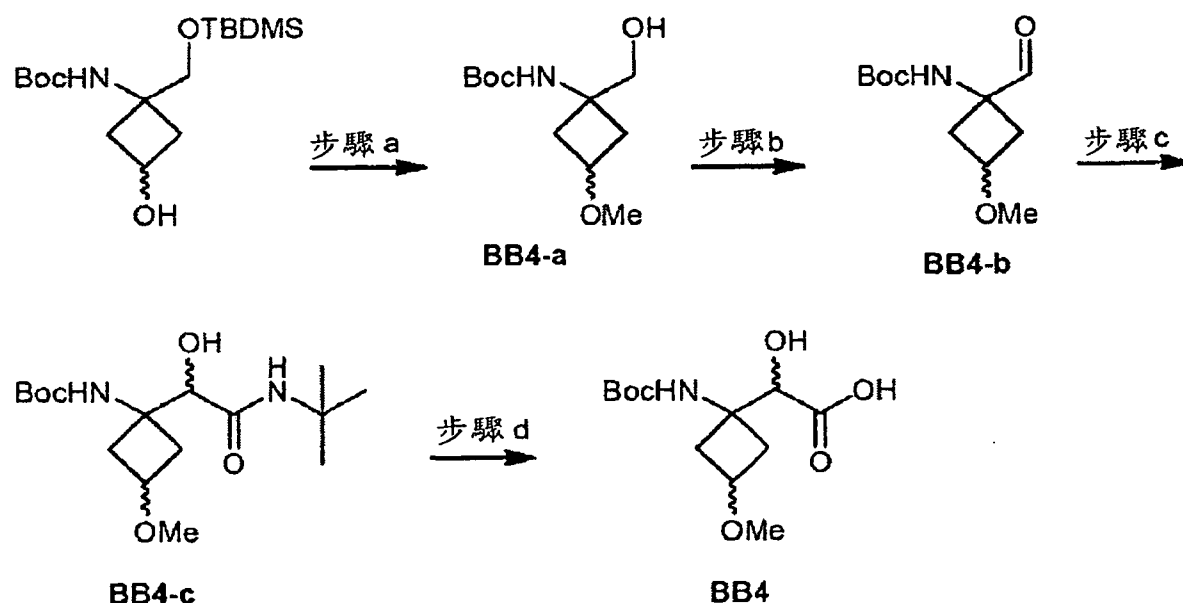
步驟j) 2-(1-(第三丁氧羰基胺基)-3-氟環丁基)-2-羥基乙酸(BB3)

使化合物BB3-i(1.6 g，0.005 mol)與6 N HCl(60 mL)一起回流16小時直至醯胺水解完全。在減壓下蒸發溶劑並與水

共蒸發若干次。將產物溶解於 THF:H₂O(7:3 體積比, 50 mL)中, 冷卻至 0°C 並添加 Et₃N(2.1 mL, 0.015 mol), 隨後添加二碳酸二第三丁酯(2.18 g, 0.01 mol)。在室溫下攪拌混合物隔夜(以一定時間間隔監測 pH 值並在整個反應期間保持為約 11)。以 1 N HCl 中和反應混合物並以 EtOAc(2×50 mL)萃取產物。用鹽水洗滌有機層並經 Na₂SO₄ 乾燥。在減壓下蒸發溶劑, 隨後藉由管柱層析(矽膠 60-120 目, 溶離劑為含 5% MeOH 之 CHCl₃)純化, 得到呈固體狀之標題 P1 構築嵌段(0.65 g, 產率 50%)。TLC 系統: 含 30% MeOH 之 CHCl₃, R_f=0.3。

¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7.01 (br s, 1H), 5.16 (br m, 1H), 4.97 (br m, 1H), 2.49 (br m, 5H), 1.36 (s, 9H); ms ES⁺ m/z 262 (100%)。

構築嵌段 4(BB4), P1 構築嵌段



步驟 a) 1-(羥甲基)-3-甲氧基環丁基胺基甲酸第三丁酯 (BB4-a)

將 500 mg (1.51 mmol) 1-((第三丁基二甲基矽烷氧基)甲基)-3-羥基環丁基胺基甲酸第三丁酯 (如 J. Med. Chem., 1990 33(10)2905-2915 中所述藉由還原 1[[[(第三丁氧基)羰基]胺基]-3-羥基環丁烷-1-甲酸乙酯而製備) 及質子海綿體 (proton sponge) (N,N,N',N'-四甲基萘-1,8-二胺) (1.63 g, 6.04 mmol) 溶解於 DCM (18 mL) 中，冷卻至 0°C，並在劇烈攪拌下整份添加 447 mg (3.02 mmol) 呈固體狀之四氟硼化三甲基氧鎗 (trimethyloxonium borontetrafluoride)。攪拌反應混合物 3 小時且用在劇烈攪拌下添加之 DCM (50 mL) 及鹽水 (20 mL) 稀釋。用碳酸氫鈉、鹽水洗滌有機相，用硫酸鈉乾燥，蒸發並在短二氧化矽管柱上純化 (DCM 作為溶離劑)。將所得產物溶解於 THF (5 mL) 中，並添加氟化四丁銨於 THF 中之溶液 (1 M, 4.5 mL)，並在室溫下攪拌反應物 4.5 小時。藉由 TLC 監測反應，且一旦認為已達到完全，即將其吸收至二氧化矽上，並在二氧化矽上純化 (EtOAc-己烷 1:1 至純 EtOAc) 以獲得標題化合物 (251 mg, 72%)。LC/MS 232(M+1)。

步驟 b) 1-甲鹽基-3-甲氧基環丁基胺基甲酸第三丁酯 (BB4-b)

將醇 BB4-a 溶解於 DCM (20 mL) 中並整份添加戴斯-馬丁試劑。攪拌反應物 2.5 小時。一旦認為反應已達到完全，即將其以 50 mL DCM 稀釋並添加 20 mL 10% Na₂S₂O₃。攪拌混合物，用碳酸氫鈉、鹽水洗滌，且有機相經硫酸鈉乾燥。在二氧化矽上純化 (EtOAc-己烷 1:1 至純 EtOAc)，獲得標題化合物 (500 mg, 59%)。

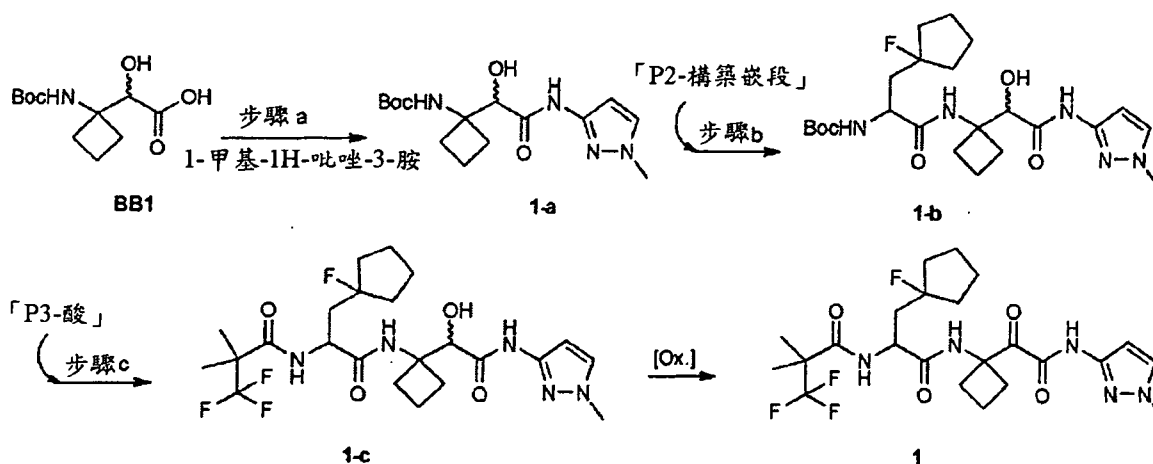
步驟 c) [1-(第三丁基胺甲醯基-羥甲基)-3-甲氧基環丁基]-胺基甲酸第三丁酯 (BB4-c)

將醛 BB4-b (4.45 mmol) 溶解於無水 DCM (11 mL) 中。在攪拌條件下添加吡啶 (2 mL)，隨後添加第三丁基肼 (6.68 mmol)。將反應物置於冰浴中，並在 20 分鐘內逐滴添加 TFA (0.68 mL)。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。接著認為反應已達到完全並在減壓下移除溶劑。將殘餘物再溶解於 EtOAc 中並用 1 M HCl (2×)、碳酸氫鈉、鹽水洗滌，且有機相經硫酸鈉乾燥並蒸發。將殘留殘餘物溶解於二噁烷中並與氫氧化鋰溶液一起攪拌隔夜並以檸檬酸中和。以 EtOAc 自所得溶液中萃取產物，並在二氧化矽上純化 (EtOAc-己烷 1:3 至 1:1)，獲得 850 mg 標題化合物 (58%)。

步驟 d) (1-第三丁氧羰基胺基-3-甲氧基-環丁基)-羥基乙酸 (BB4)

將化合物 BB4-c (850 mg, 2.57 mmol) 與 6 N HCl (60 mL) 一起回流 16 小時直至醯胺水解完全。在減壓下蒸發溶劑並與水共蒸發。將產物溶解於 THF:H₂O (7:3 體積比, 50 mL) 中，冷卻至 0°C 並添加 Et₃N (1.4 mL, 10.2 mmol)，隨後添加二碳酸二第三丁酯 (2.25 g, 10.2 mol)。在室溫下攪拌混合物隔夜。用 EtOAc 洗滌反應混合物，隨後用 1 N HCl 酸化至 pH 3 並以 EtOAc (2×50 mL) 萃取。用鹽水洗滌有機層並經 Na₂SO₄ 乾燥。在減壓下蒸發溶劑，得到呈固體狀之標題化合物 (360 mg, 產率 51%)。

實例 1



步驟 a) (1-(1-羥基-2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙基)環丁基)胺基甲酸第三丁酯 (1-a)

將 1-甲基-1H-吡唑-3-胺 (1 當量) 及 DIEA (4 當量) 添加至 P1 構築嵌段 BB1 (1 當量) 溶解於 DMF 中之溶液中。將溶液冷卻至 0°C 並在 10 分鐘後添加 HATU (1 當量)。在室溫下約 2 小時後 LC-MS 顯示產物且無起始物質，並藉由旋轉蒸發移除溶劑。將粗產物溶解於 40 mL EtOAc 中並用 25 mL 飽和 NaHCO₃ (水溶液) 洗滌。有機相經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾並蒸發至乾燥。粗產物在 Biotage Flashmaster 上之 25 g 二氧化矽柱上純化，獲得標題產物。

步驟 b) (3-(1-氟環戊基)-1-((1-(1-羥基-2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙基)環丁基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸第三丁酯 (1-b)

將化合物 1-a (1.06 mmol) 在室溫下保持於 4 M HCl 於二噁烷中之溶液 (4 mL) 中 2 小時。接著在真空下濃縮溶液並與甲苯共沸。將所得之粗殘餘物溶解於 DCM (10 mL) 中並添加至「P2-構築嵌段」2-((第三丁氧羰基)胺基)-3-(1-氟環戊基)丙酸 (如 WO 2006/064286 之實例 8 中所述製備) (1.2 當

量)、HATU(1.2當量)及二異丙基乙胺(DIEA, 4當量)於DCM(5 mL)中之溶液中, 該溶液已在室溫下攪拌5分鐘。在室溫下攪拌混合物直至LC/MS分析指示完全醯胺形成(約30分鐘)。添加DCM至反應物中並用0.1 M HCl(水溶液)(2×)及10% NaHCO₃(水溶液)(2×)洗滌有機相。使有機相乾燥並在真空下濃縮, 並藉由二氧化矽急驟層析純化所得之粗化合物, 獲得標題化合物[M+H]⁺ 482.2。

步驟c) 3,3,3-三氟-N-(3-(1-氟環戊基)-1-((1-(1-羥基-2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙基)環丁基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-2,2-二甲基丙醯胺(1-c)

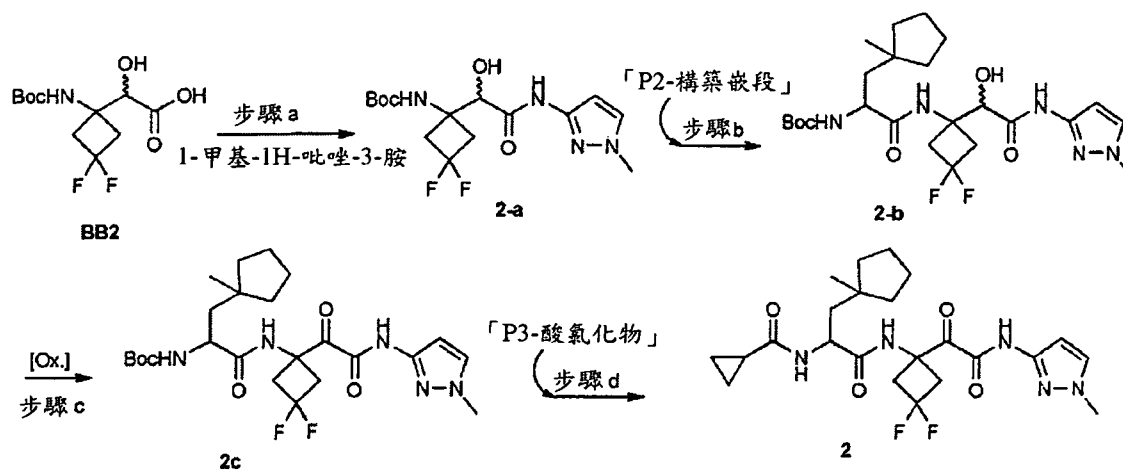
將Boc保護之胺1-b(0.11 mmol)保持於4 M HCl於二噁烷中之溶液(3 mL)中4小時, 接著將溶液濃縮至乾燥, 獲得呈鹽酸鹽形式之胺。將所得之粗化合物(33 mg, 83 μmol)添加至經攪拌之「P3-酸」3,3,3-三氟-2,2-二甲基丙酸(18 mg, 0.11 mmol)、HATU(42 mg, 0.11 mmol)及DIEA(77 μl, 0.44 mmol)於DMF(2.5 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌反應物16小時, 隨後將溶液濃縮至乾燥, 並使用急驟層析二氧化矽柱用DCM-MeOH 0%至10%純化殘餘物, 獲得標題化合物(19.3 mg)。MS: [M+1]⁺=519.9。

步驟d) 3,3,3-三氟-N-(3-(1-氟環戊基)-1-((1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙基)環丁基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-2,2-二甲基丙醯胺(1)

在室溫下將步驟c中得到之殘餘物再溶解於DCM(1.5 mL)中並整份添加戴斯-馬丁高碘烷(1.4當量)。在室溫下攪

拌反應物2小時，其後LC/MS分析指示完全氧化。以DCM稀釋反應混合物並用10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (水溶液)與10% NaHCO_3 (水溶液)之1:1混合物洗滌溶液。在真空中濃縮有機層，並藉由製備型LC/MS純化所得到之殘餘物，獲得標題化合物，產率為47%。MS: 517.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

實例 2



步驟 a) {3,3-二氟-1-[羥基-(1-甲基-1H-吡唑-3-基胺甲酰基)-甲基]-環丁基}-胺基甲酸第三丁酯(2-a)

將1-甲基-1H-吡唑-3-胺(158 mg, 1.63 mmol)及DIEA(1.08 mL, 6.52 mmol)添加至P1-構築嵌段BB2(1.63 mmol)溶解於DMF(20 mL)中之溶液中。將溶液冷卻至0℃並在10分鐘後添加HATU(620 mg, 1.63 mmol)。在室溫下約2小時後LC-MS顯示產物且無起始物質，並藉由旋轉蒸發移除溶劑。將粗產物溶解於40 mL EtOAc中並用25 mL飽和 NaHCO_3 (水溶液)洗滌。有機相經 Na_2SO_4 乾燥，過濾並蒸發至乾燥。粗產物在二氧化矽柱上純化，獲得呈白色固體狀之標題產物。

步驟 b) [1-{3,3-二氟-1-[羥基-(1-甲基-1H-吡唑-3-基胺甲酰基)-甲基]-環丁基}-胺基甲酸第三丁酯(2-a)]

基)-甲基]-環丁基胺甲鹽基}-2-(1-甲基-環戊基)-乙基]-胺基
甲酸第三丁酯(2-b)

在冰浴上將2-a(200 mg, 0.56 mmol)溶解於MeOH(5 mL)中。添加乙醯氯(0.5 mL)。在室溫下攪拌溶液隔夜，接著濃縮。將所得到之殘餘物溶解於無水DMF(5 mL)中，冷卻至0°C，並添加2-胺基-3-(1-甲基環戊基)丙酸(如WO 2006/064286之實例1中所述製備)(172 mg, 0.63 mmol)、HATU(234 mg, 0.62 mmol)及DIEA(0.40 mL)。在0°C下攪拌反應混合物30分鐘，接著在室溫下攪拌6小時。在真空下濃縮溶液，並藉由二氧化矽急驟層析(DCM:丙酮8:2)純化所得到之殘餘物，獲得呈白色固體狀之標題化合物。MS m/z 514 $[M+H]^+$ 。

步驟c) (1-((3,3-二氟-1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙鹽基)環丁基)胺基)-3-(1-甲基環戊基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸第三丁酯(2-c)

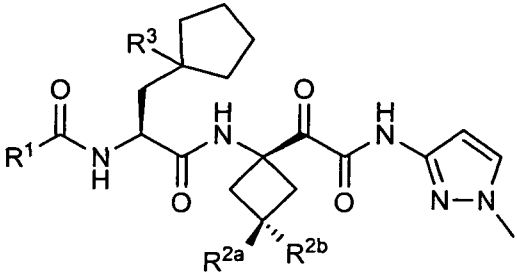
根據實例1步驟d中所述之方法氧化 α -羥基鹽胺2-b。藉由二氧化矽急驟層析純化獲得標題化合物。MS m/z 512 $[M+H]^+$ 。藉由分析型LCMS評估純度>90%。

步驟d) N-(1-((3,3-二氟-1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙鹽基)環丁基)胺基)-3-(1-甲基環戊基)-1-側氧基丙-2-基)環丙烷甲鹽胺(2)

將Boc保護之胺2-c(0.339 mmol)溶解於二噁烷(4.2 ml)中，並添加4 M HCl於二噁烷中之溶液(4.2 ml)。攪拌混合物隔夜，隨後在高真空下移除溶劑。在0°C下將粗產物溶

解於DMF(1.5 mL)中，並添加環丙烷甲醯氯(15 mL)，隨後添加DIEA(75 μ L)。在室溫下3.5小時後藉由旋轉蒸發移除溶劑。在二氧化矽上純化粗產物，獲得標題化合物(20.2 mg，產率50%)。[M+H]⁺ 480.3。藉由LCMS評估純度>98%。

以下化合物根據實例1中所述之方法使用適當構築嵌段製備：

					
實例	R ¹	R ^{2a}	R ^{2b}	R ³	[M+H] ⁺
3 ^{1,2}	環丙基	F	H	CH ₃	462.19
4 ^{1,2}	環丙基	F	H	F	466.07
5 ³	2,2-二氟環丙基	F	F	F	520.07
6 ⁴	2,2-二氟環丙基	F	F	CH ₃	516.30
7 ⁴	2,2-二氟環丙基	F	F	CH ₃	516.28
8	環己基	H	H	CH ₃	486.46
9	2-氟丙-2-基	H	H	F	467.86
10	1-三氟甲基-環戊基	H	H	F	543.9
11	1-三氟甲基-環己基	H	H	F	557.9
12	1-三氟甲基-環丁基	H	H	F	529.9
13	1-三氟甲基-環丙基	H	H	F	517.9
14	1,1-二氟乙基	H	H	F	471.9
15	1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基	F	F	F	554.3
16	新戊基	H	H	F	478.2

¹ 步驟b中之Boc基團移除係使用TFA-H₂O-TIS進行。

² 步驟c中之P3部分引入係使用P3-酸氯化物替代P3-酸及HATU進行。

³ 該化合物以非對映異構體混合物之形式分離。

⁴ 該化合物以單一非對映異構體之形式分離。分離係藉由製備型HPLC達成。

生物學實例

測定組織蛋白酶K蛋白水解催化活性

組織蛋白酶K之便利分析係使用人類重組酶(諸如PDB所述者)進行。

ID BC016058 標準；mRNA；HUM；1699 BP。

DE 智人組織蛋白酶K(密骨發育障礙)，mRNA(cDNA純系MGC:23107。

RX MEDLINE；RX PUBMED；12477932。

DR RZPD；IRALp962G1234。

DR SWISS-PROT；P43235。

重組組織蛋白酶K可在多種可購得之表現系統中表現，該等可購得之表現系統包括大腸桿菌(E coli)、畢赤酵母(Pichia)及桿狀病毒(Baculovirus)系統。經純化之酶可藉由用習知方法移除前序列來活化。

測定動力學常數之標準分析條件使用螢光肽受質(通常為H-D-Ala-Leu-Lys-AMC)且在以下液體中測定：100 mM Mes/Tris，pH 7.0，含有1 mM EDTA及10 mM 2-巰基乙醇；或100 mM磷酸鈉、1 mM EDTA、0.1%PEG 4000，pH 6.5；或100 mM乙酸鈉，pH 5.5，含有5 mM EDTA及20 mM半胱胺酸，在各情況下視情況使用1 M DTT作為穩定劑。所用之酶濃度為5 nM。儲備受質溶液係以10 mM製備於DMSO中。篩選係在60 μ M之固定受質濃度及自250 μ M二倍稀釋受質之詳細動力學研究下進行。分析中之總DMSO濃度保持低於3%。所有分析均在周圍溫度下執行。

產物螢光(390 nm下激發，460 nm下發射)係用 Labsystems Fluoroskan Ascent 螢光板讀取器監測。產物發展曲線係在產生 AMC 產物之後經 15 分鐘產生。

組織蛋白酶 S K_i 測定

分析使用於 384 孔板格式中之桿狀病毒表現之人類組織蛋白酶 S 及可購自 Bachem 的 boc-Val-Leu-Lys-AMC 螢光受質，其中 7 種測試化合物可與包含已知組織蛋白酶 S 抑制劑比較物之陽性對照並行測試。

受質稀釋

按每孔 280 μ L 將 12.5% DMSO 添加至 96 深孔聚丙烯板兩行之 B 列至 H 列中。按每孔 70 μ L 將受質添加至 A 列中。按每孔 2 $\times$ 250 μ L 將分析緩衝液(100 mM 磷酸鈉，100 mM NaCl，pH 6.5)添加至 A 列中，混合，且沿板向下二倍稀釋至 H 列。

抑制劑稀釋

按每孔 100 μ L 將分析緩衝液添加至 96 孔 V 形底聚丙烯板 4 列的第 2-5 行及第 7-12 行中。按每孔 200 μ L 將分析緩衝液添加至第 1 行及第 6 行中。

將製備於 DMSO 中之第一測試化合物通常以提供起初測定之大致 K_i 之 10 至 30 倍的體積添加至頂列之第 1 行中。大致 K_i 係由初步試驗來計算，其中按每孔 10 μ l 將 1 mM boc-VLK-AMC(於 DMSO 中之 10 mM 儲備液稀釋於分析緩衝液中的 1/10 稀釋液)分配至 B 列至 H 列中且按每孔 20 μ l 分配至 96 孔 MicrofluorTM 板之 A 列中。將 2 μ l 各 10 mM 測試化合物

添加至A列、第1行至第10行之各別孔中。將90 μl 含有1 mM DTT及2 nM組織蛋白酶S之分析緩衝液添加至B列至H列之各孔中並添加180 μl 至A列之各孔中。使用多注式吸液管混合A列，並二倍稀釋至G列。混合H列並在螢光分光光度計中讀數。讀數為擬合成競爭性抑制方程式的Prism數據，設定 $S=100\text{ }\mu\text{M}$ 且 $K_M=100\text{ }\mu\text{M}$ 以獲得最大值可達100 μM 之 K_i 估計值。

將第二測試化合物添加至頂列之第6行中，將第三測試化合物添加至第二列之第1行中等。將1 μL 比較物添加至底列之第6行中。混合第1行並二倍稀釋至第5行。混合第6行並二倍稀釋至第10行。

使用設定為 $5\times 10\text{ }\mu\text{l}$ 之8通道多步移液管，將每孔10 μl 之受質分配至384孔分析板。將受質稀釋板之第一行分配至分析板起始於行A的所有行。多注式吸液管之尖端間距將恰當地跳過間隔列。將第二行分配至起始於B列之所有行。

使用設定為 $4\times 10\text{ }\mu\text{l}$ 之12通道多步移液管，將每孔10 μl 之抑制劑分配至384孔分析板。將抑制劑稀釋板之第一列分配至分析板起始於A1的間隔列。多注式吸液管之尖端間距將恰當地跳過間隔行。類似地，將第二列、第三列及第四列分別分配至起始於A2、B1及B2之間隔列及間隔行。

將20 mL分析緩衝液與20 μL 1 M DTT混合。添加足夠之組織蛋白酶S以獲得2 nM最終濃度。

使用諸如Multidrop 384之分配器，每孔添加30 μL 至分

析板之所有孔中並在諸如 Ascent 之螢光分光光度計中讀數。

對於各孔，反映螢光受質之酶裂解程度(儘管存在抑制劑)的螢光讀數(激發波長及發射波長分別為 390 nm 及 460 nm，使用帶通過濾器設定)以線性速率擬合。

使用 SigmaPlot 2000 將各抑制劑之所有孔的擬合速率擬合成競爭性抑制方程式以確定 V、Km 及 Ki 值。

組織蛋白酶 L Ki

使用具有以下修改之上述程序確定組織蛋白酶 L 之 Ki。

酶為市售之人類組織蛋白酶 L(例如 Calbiochem)。該受質為可購自 Bahcem 之 H-D-Val-Leu-Lys-AMC。分析緩衝液為 100 mM 乙酸鈉(1 mM EDTA，pH 5.5)。DMSO 儲備液(10 mM 於 100% DMSO 中之溶液)係在分析緩衝液中稀釋至 10%。酶係在臨使用前以 5 nM 濃度製備於分析緩衝液加上 1 mM 二硫蘇糖醇中。將 2 µl 於 100% DMSO 中製成之 10 mM 抑制劑分配至 A 列中。10 µl 之 50 µM 受質(=於 DMSO 中之 10 mM 儲備液在分析緩衝液中之 1/200 稀釋液)。

抑制研究

使用以上分析用不同濃度之測試化合物來篩選潛在抑制劑。藉由將酶添加至受質及抑制劑之經緩衝溶液中來引發反應。根據方程式 1 計算 Ki 值。

$$v_0 = \frac{VS}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S} \quad (1)$$

其中 v_0 為反應速度， V 為最大速度， S 為麥卡里斯常數 (Michaelis constant) 為 K_M 之受質濃度，且 I 為抑制劑濃度。

一系列本發明化合物所展示之對組織蛋白酶S、組織蛋白酶K及組織蛋白酶L的抑制以nM量測表示為Ki值，在表1中呈現。

表 1

實例	Ki組織蛋白酶S (nM)	Ki組織蛋白酶K (nM)	Ki組織蛋白酶L (nM)
1	0.45	220	2100
3	0.24	360	1700
6	0.14	1100	5200
9	2.6	280	2000
10	1	2900	9500
13	1.1	210	1600
14	0.65	130	970
15	2.5	400	2200
16	0.65	230	1300

因此，式I化合物為組織蛋白酶S之有效抑制劑且相較於密切相關之組織蛋白酶K及組織蛋白酶L具選擇性。

滲透率

此實驗量測抑制劑穿過人類胃腸道細胞之轉運。該分析使用繼代數在40與60之間的熟知Caco-2細胞。

頂端至底外側轉運

通常每一化合物將在2至4個孔中測試。底外側及頂端孔將分別含有1.5 mL及0.4 mL轉運緩衝液(TB)，且測試物質之標準濃度為10 μ M。此外，所有測試溶液及緩衝液將含有1% DMSO。在實驗之前，將轉運板以含有10%血清之培

養基預塗佈30分鐘以避免與塑膠材料之非特異性結合。在過濾器支撐物上培養21天至28天後，細胞預備用於滲透率實驗。

1號轉運板包含各3列，各具有4個孔。第1列指定為「洗滌」列，第2列指定為「30分鐘」列且第3列指定為「60分鐘」列。2號轉運板包含3列，各具有4個孔，其中一列指定為第4列「90分鐘」列，第5列「120分鐘」列，且其餘列未指定。

移除頂端孔之培養基，並將插入物轉移至2個不含插入物之板中的轉運板(1號板)之洗滌列(第1列)，其已於第1列至第5列中使用1.5 mL轉運緩衝液(HBSS, 25 mM HEPES, pH 7.4)製備。在A→B篩選中，底外側孔中之TB亦含有1%牛血清白蛋白。

將0.5 mL轉運緩衝液(HBSS, 25 mM MES, pH 6.5)添加至插入物中且在polymix震盪器中將細胞單層在轉運緩衝液系統中在37°C下平衡30分鐘。在相對於緩衝液系統平衡之後，藉由EVOM簇型儀器在各孔中量測跨上皮電阻值(Transepithelial electrical resistance value, TEER)。TEER值通常在每孔400 Ω 至1000 Ω 之間(視所用繼代數而定)。

自頂側移除轉運緩衝液(TB, pH 6.5)且將插入物轉移至30分鐘列(第2列)且將包括測試物質之425 μ L新鮮TB(pH 6.5)添加至頂端(供體)孔。在37°C下在polymix震盪器中培育該分析板，震盪速度較低，為約150 rpm至300 rpm。

在第2列中培育30分鐘後，每30分鐘將插入物移至新的

預加溫之底外側(受體)孔；第3列(60分鐘)、第4列(90分鐘)及第5列(120分鐘)。

約2分鐘後及實驗結束時，自頂端溶液取25 μ L樣品。該等樣品代表實驗起始及結束時之供體樣品。

在每一預定時間點自底外側(受體)孔取300 μ L且在實驗結束時量測TEER之後值。向所收集之所有樣品中添加乙腈直至樣品中達到50%之最終濃度。將所收集之樣品在-20°C下儲存，直至藉由HPLC或LC-MS分析。

底外側至頂端轉運

通常在2至4個孔中測試每一化合物。底外側及頂端孔將分別含有1.55 mL及0.4 mL TB，且測試物質之標準濃度為10 μ M。此外，所有測試溶液及緩衝液將含有1% DMSO。在實驗之前，以含有10%血清之培養基預塗佈轉運板30分鐘，以避免與塑膠材料之非特異性結合。

在過濾器支撐物上培養21天至28天之後，細胞預備用於滲透率實驗。自頂端孔中移除培養基且將插入物轉移至不具有插入物之新板(轉運板)中的洗滌列(第1列)。

轉運板包含具有4個孔之3列。第1列表示「洗滌」且第3列為「實驗列」。轉運板先前已在洗滌列第1列中以1.5 mL TB(pH 7.4)且在實驗列第3列(供體側)中以包括測試物質之1.55 mL TB(pH 7.4)製備。

將0.5 mL轉運緩衝液(HBSS，25 mM MES，pH 6.5)添加至第1列中之插入物中且在polymix震盪器中將細胞單層於轉運緩衝液系統中在37°C下平衡30分鐘。在相對於緩衝液

系統平衡之後，藉由EVOM簇型儀器在各孔中量測TEER值。

自頂側移除轉運緩衝液(TB, pH 6.5)且將插入物轉移至第3列且將400 μL 新鮮TB(pH 6.5)添加至插入物中。30分鐘後，自頂端(受體)孔抽取250 μL 並將更換為新鮮轉運緩衝液。其後，每30分鐘抽取250 μL 樣品並將更換為新鮮轉運緩衝液直至在120分鐘時實驗結束，最後在實驗結束時量測TEER之後值。約2分鐘後及實驗結束時自底外側(供體)區取25 μL 樣品。該等樣品代表實驗起始及結束時之供體樣品。

向所收集之所有樣品中添加乙腈直至樣品中達到50%之最終濃度。將所收集之樣品在 -20°C 下儲存直至藉由HPLC或LC-MS分析。

計算

相對於時間累積吸收分率 FA_{cum} 之測定。 FA_{cum} 係由下式計算：

$$\text{FA}_{\text{cum}} = \sum \frac{C_{Ri}}{C_{Di}}$$

其中 C_{Ri} 為間隔 i 結束時之受體濃度且 C_{Di} 為間距 i 開始時之供體濃度。應獲得線性關係。

滲透係數(P_{app} , cm/s)之測定係由下式計算：

$$P_{\text{app}} = \frac{(k \cdot V_R)}{(A \cdot 60)}$$

其中 k 為轉運速率(min^{-1})，定義為由累積吸收分率(FA_{cum})隨時間(分鐘)的線性回歸所獲得之斜率， V_R 為受體腔室中

之體積(mL)，且A為過濾器面積(cm^2)。

參考化合物

於人體內之吸收類別	標記物	於人體內之吸收率(%)
被動轉運		
低(0-20%)	甘露醇甲胺喋呤	16 20
中(21-75%)	阿昔洛韋(Acyclovir)	30
高(76-100%)	普萘洛爾(Propranolol) 咖啡鹼(Caffeine)	90 100
主動轉運		
胺基酸轉運體	L-苯丙胺酸	100
主動外排(active efflux)		
PGP-MDR1	地高辛(Digoxin)	30

穿過胃腸組織之較大滲透率之有利之處在於其允許使用較小劑量來達成與以較高劑量投與之滲透率較小化合物類似的暴露程度。低劑量之有利之處在於其將每日劑量之商品成本降至最低，每日劑量之商品成本為長時間服用藥物之關鍵參數。

本申請案中所提及之所有參考文獻(包括專利及專利申請案)均在最大可能程度上以引用的方式併入本文中。

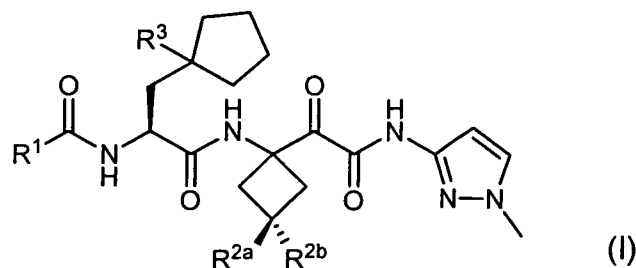
在整篇說明書及下文之申請專利範圍中，除非上下文另有要求，否則『包含』一詞及其變體應理解為暗示包括所陳述之整體、步驟、整體群或步驟群，但不排除任何其他整體、步驟、整體群或步驟群。

包含該說明書及申請專利範圍之申請案可用作對於任何

後續申請案而言優先之基礎。該後續申請案之申請專利範圍可針對本文中所描述之任何特徵或特徵組合。其可採用產物、組合物、方法或用途請求項之形式且可包括(例如但不限於)以下請求項。

七、申請專利範圍：

1. 一種式I化合物：



其中

R^1 為 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 鹵烷基或 C_3 - C_6 環烷基，其中 C_3 - C_6 環烷基視情況經 CF_3 、甲基、乙基或一或兩個 F 取代；

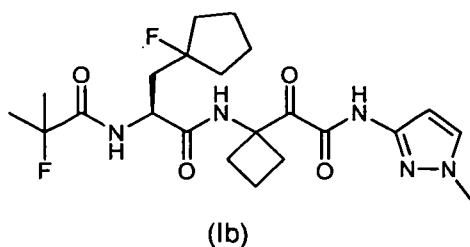
R^{2a} 及 R^{2b} 係獨立地選自 H、F 及 CH_3O ；

R^3 為 F 或 CH_3 ；

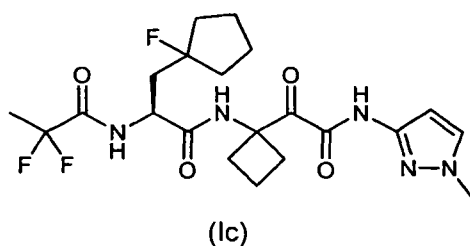
或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或 N-氧化物。

2. 如請求項 1 之化合物，其中 R^{2a} 及 R^{2b} 皆為 H。
3. 如請求項 1 之化合物，其中 R^{2a} 及 R^{2b} 皆為 F。
4. 如請求項 1 之化合物，其中 R^{2a} 與 R^{2b} 中之一者為 H，且另一者為 F 或 CH_3O 。
5. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其中 R^1 為 C_3 - C_6 環烷基，其視情況經甲基或 CF_3 取代。
6. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其中 R^1 為經 CF_3 取代之環丙基或丙丁基。
7. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其中 R^1 為 C_1 - C_6 烷基。
8. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其中 R^1 為單氟 C_1 - C_6 烷基、二氟 C_1 - C_6 烷基或三氟 C_1 - C_6 烷基。
9. 如請求項 1 至 4 中任一項之化合物，其中 R^3 為 F。

10. 如請求項1之化合物，其表示(S)-2-氟-N-(3-(1-氟環戊基)-1-((1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙醯基)環丁基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-2-甲基丙醯胺，具有結構1b：



11. 如請求項1之化合物，其表示(S)-2-(2,2-二氟丙醯胺基)-3-(1-氟環戊基)-N-(1-(2-((1-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基)-2-側氧基乙醯基)環丁基)-丙醯胺，具有結構1c：



12. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至11中任一項之化合物及其醫藥學上可接受之媒劑。
13. 一種如請求項1至11中任一項之化合物的用途，其係用於製造用於治療以組織蛋白酶S之不恰當表現或活化為特徵之病症的藥物。
14. 如請求項13之用途，其中該病症係選自

- a) 牛皮癬；
- b) 自體免疫適應症，包括特發性血小板減少性紫癜(ITP)、類風濕性關節炎(RA)、多發性硬化(MS)、重症肌無力(MG)、休格連氏症候群(Sjögrens syndrome)、格雷

夫斯氏病 (Grave's disease) 及全身性紅斑狼瘡 (SLE)；或

c) 非自體免疫適應症，包括過敏性鼻炎、哮喘、動脈粥樣硬化、慢性阻塞性肺病 (COPD) 及慢性疼痛。