



(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 I702954 B

(45) 公告日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

- (21) 申請案號：108105130 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 15 日
- (51) Int. Cl. : *A61K31/513 (2006.01)* *A61K31/501 (2006.01)*
C07D403/04 (2006.01) *C07D237/12 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
- (30) 優先權：2018/03/01 美國 62/636,978
 2018/12/05 美國 62/775,553
- (71) 申請人：美商美國禮來大藥廠 (美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)
 美國
- (72) 發明人：達利 羅伯 狄恩 DALLY, ROBERT DEAN (US)；嘉西亞 帕瑞迪斯 瑪莉亞 克莉絲提娜 GARCIA PAREDES, MARIA CRISTINA (ES)；裘洛吉 法蘭克 喬治 NJOROGÉ, FRANK GEORGE (US)；漢茲 勞倫斯 喬瑟夫 二世 HEINZ, LAWRENCE JOSEPH, II (US)；霍威爾 珍尼佛 瑪麗 HOWELL, JENNIFER MARIE (US)；王 延 WANG, YAN (US)；趙 健石 ZHAO, GENSHI (US)
- (74) 代理人：陳長文
- (56) 參考文獻：
 WO 2017/120508A1
- 審查人員：詹季蓁
- 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：0 共 86 頁

(54) 名稱

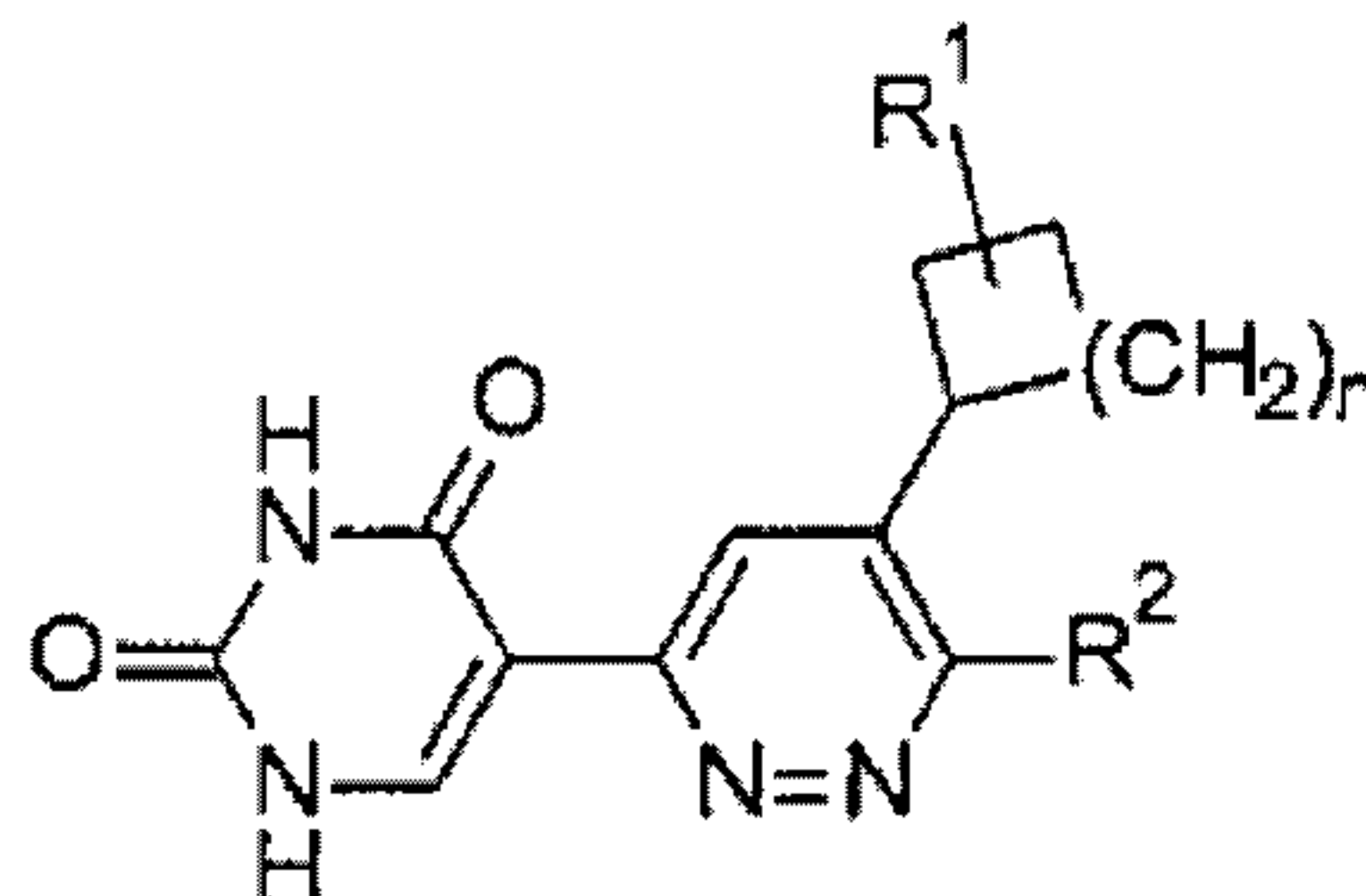
CD73 抑制劑

(57) 摘要

本發明提供 5-[5-[2-環烷基]-6-噁嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其抑制 CD73 之活性且可用於治療癌症。

The present invention provides 5-[5-[2-cycloalkyl]-6-pyridazin-3-yl]-1H-pyrimidine-2,4-dione compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, that inhibit the activity of CD73 and are useful in treating cancer.

特徵化學式：





I702954

【發明摘要】

【中文發明名稱】

CD73抑制劑

【英文發明名稱】

CD73 INHIBITORS

【中文】

本發明提供5-[5-[2-環烷基]-6-噁嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其抑制CD73之活性且可用於治療癌症。

【英文】

The present invention provides 5-[5-[2-cycloalkyl]-6-pyridazin-3-yl]-1H-pyrimidine-2,4-dione compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, that inhibit the activity of CD73 and are useful in treating cancer.

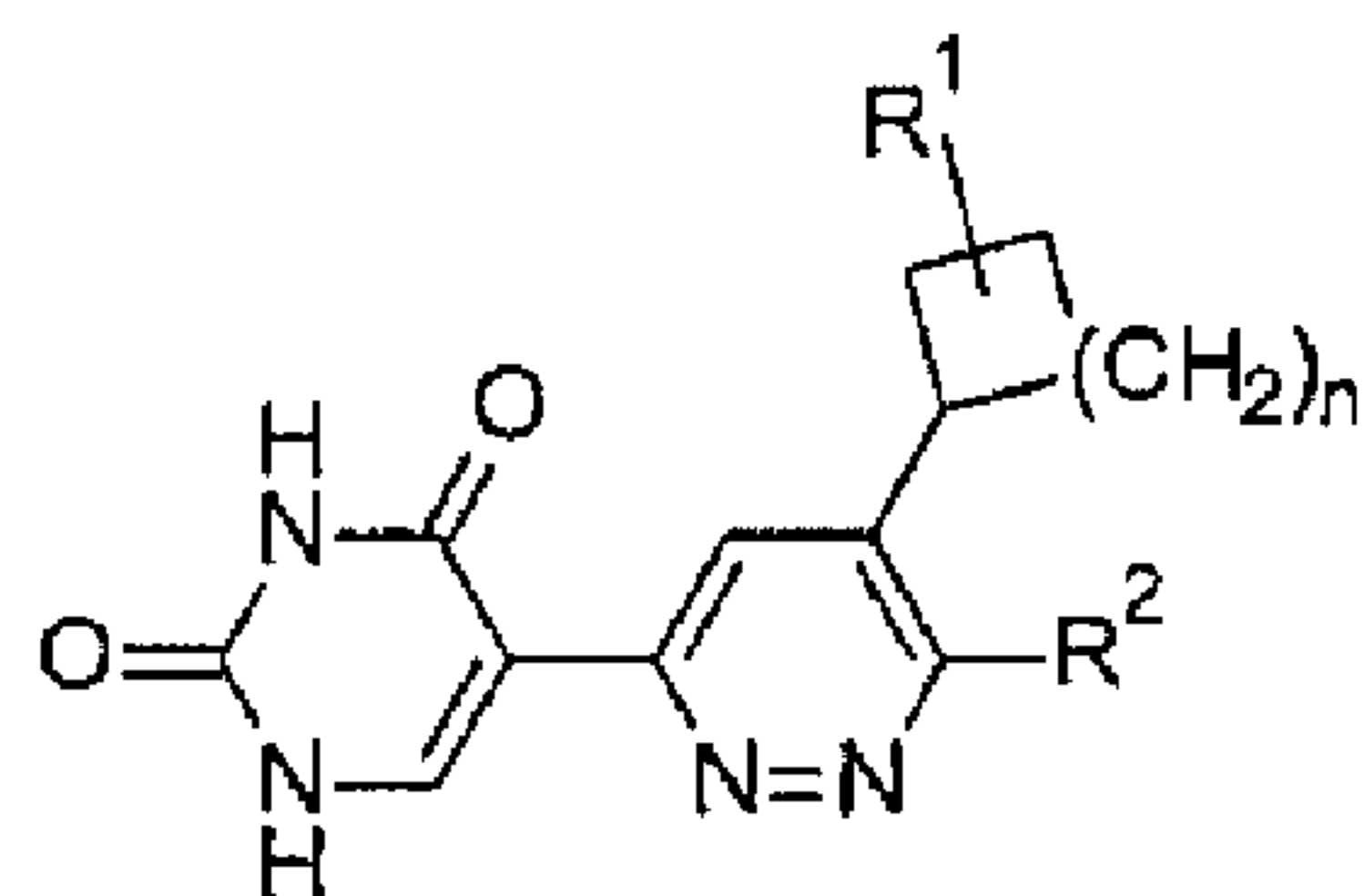
【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

CD73抑制劑

【英文發明名稱】

CD73 INHIBITORS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於5-[5-[2-環烷基]-6-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽以及包含該等化合物之醫藥組合物，其等抑制CD73之活性及可適用於治療癌症。

【先前技術】

【0002】 CD73 (亦稱為5'-核苷酸酶或胞外-5'核苷酸酶(EC 3.1.3.5)) 為將5'單核苷酸轉化為核苷之酶。CD73在許多組織中表現且在癌組織中上調，且CD73路徑藉由限制抗腫瘤T細胞免疫性經由腺苷受體信號傳導促進腫瘤生長(Zhang B, *Cancer Research* 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L等人, *Drug Discovery Today* 2017; 22: 1686-1696)。

【0003】 CD73缺陷型小鼠增加了抗腫瘤免疫性且對實驗性轉移具有抗性(Stagg J等人, *Cancer Research* 2011; 71: 2892-2900)。由腫瘤CD73產生之細胞外腺苷積聚於腫瘤微環境中，損害抗腫瘤T細胞免疫性(Zhang B, *Cancer Research* 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L等人, *Drug Discovery Today* 2017; 22: 1686-1696)，且與腫瘤免疫逃逸、增殖、遷移、新血管生成、轉移及腫瘤細胞之化學抗性有關(Inoue Y等人, *Oncotarget* 2017; 8: 8738-8751)。

【0004】 亦已報導升高的CD73表現與增加的免疫抑止相關聯(Jin D

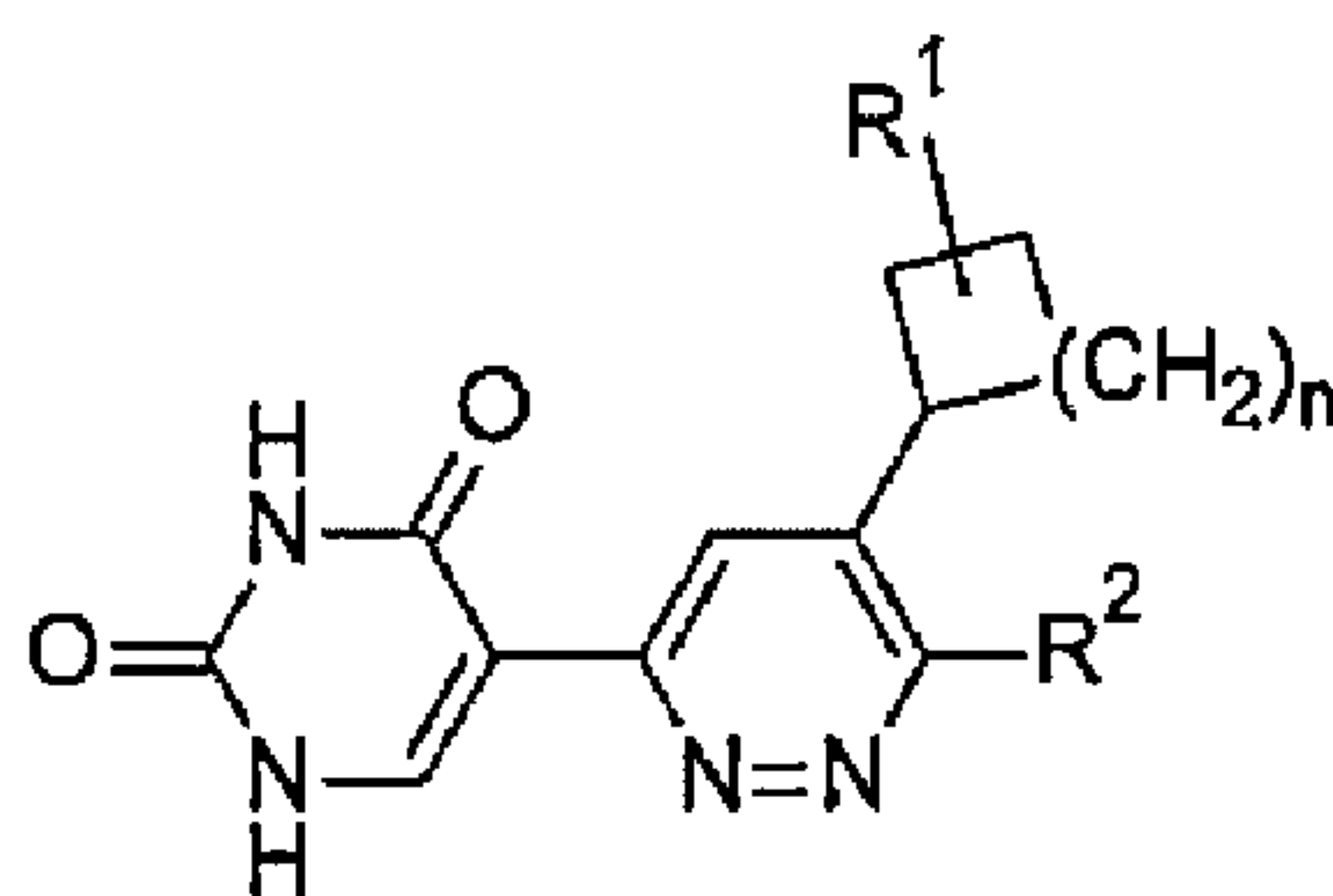
等人, *Cancer Res.* 70: 2245-2255 (2010); Beavis PA等人, *Trends Immunol* 33: 231-7 (2012); Beavis, PA等人, *Cancer Immunol Res.* 3: 506-17 (2015); Loi S等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 11091-11096 (2013))。

【0005】 因此，CD73路徑發揮免疫抑止作用，並且已表明阻斷CD73路徑可適用於治療癌症(Antonioli L等人, *Oncoimmunol.* 2016; 5: e1216292, doi: 10.1080/2162402X.2016.1216292; Antonioli L等人, *Trends in Cancer* 2016; 2: 95-109; Allard D等人, *Immunotherapy* 2016; 8: 145-163)。CD73抑制劑在臨床試驗中用於治療癌症(Hay CM等人, *Oncoimmunol.* 2016; 5(8): e1208875; Allard D等人, *Immunotherapy* 2016; 8: 145-163)。

【0006】 仍需要提供替代性CD73抑制劑，更特定言之，以用於治療癌症。特定言之，仍需要口服可用小分子CD73抑制劑，且其在腫瘤微環境中呈現更全面的標靶抑制。

【發明內容】

【0007】 因此，本發明提供可適用於治療癌症之CD73抑制劑化合物。本發明提供式I化合物：



其中n為0-3；

其中R¹為-H、-F、-偕-二氟、-偕-二甲基、-C₁₋₄烷基、-CHF₂、-CHF₂CH₃或-CH₂CH₂F；

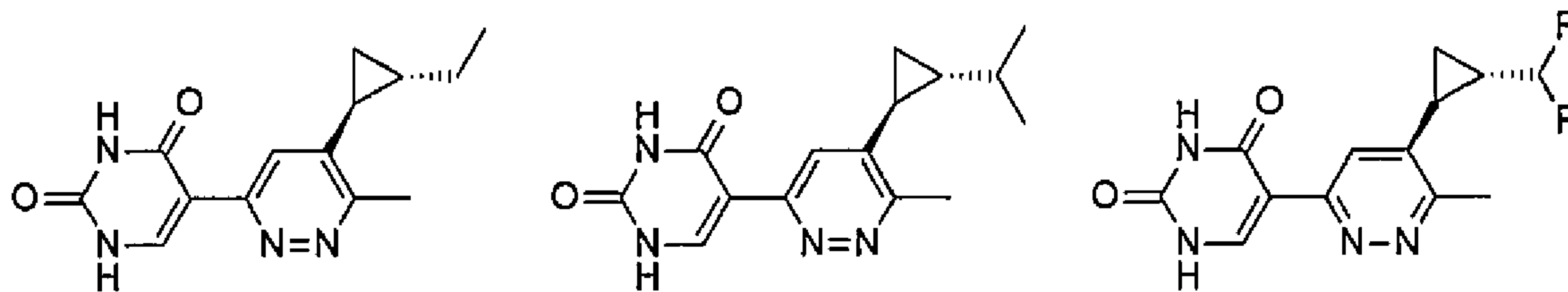
且

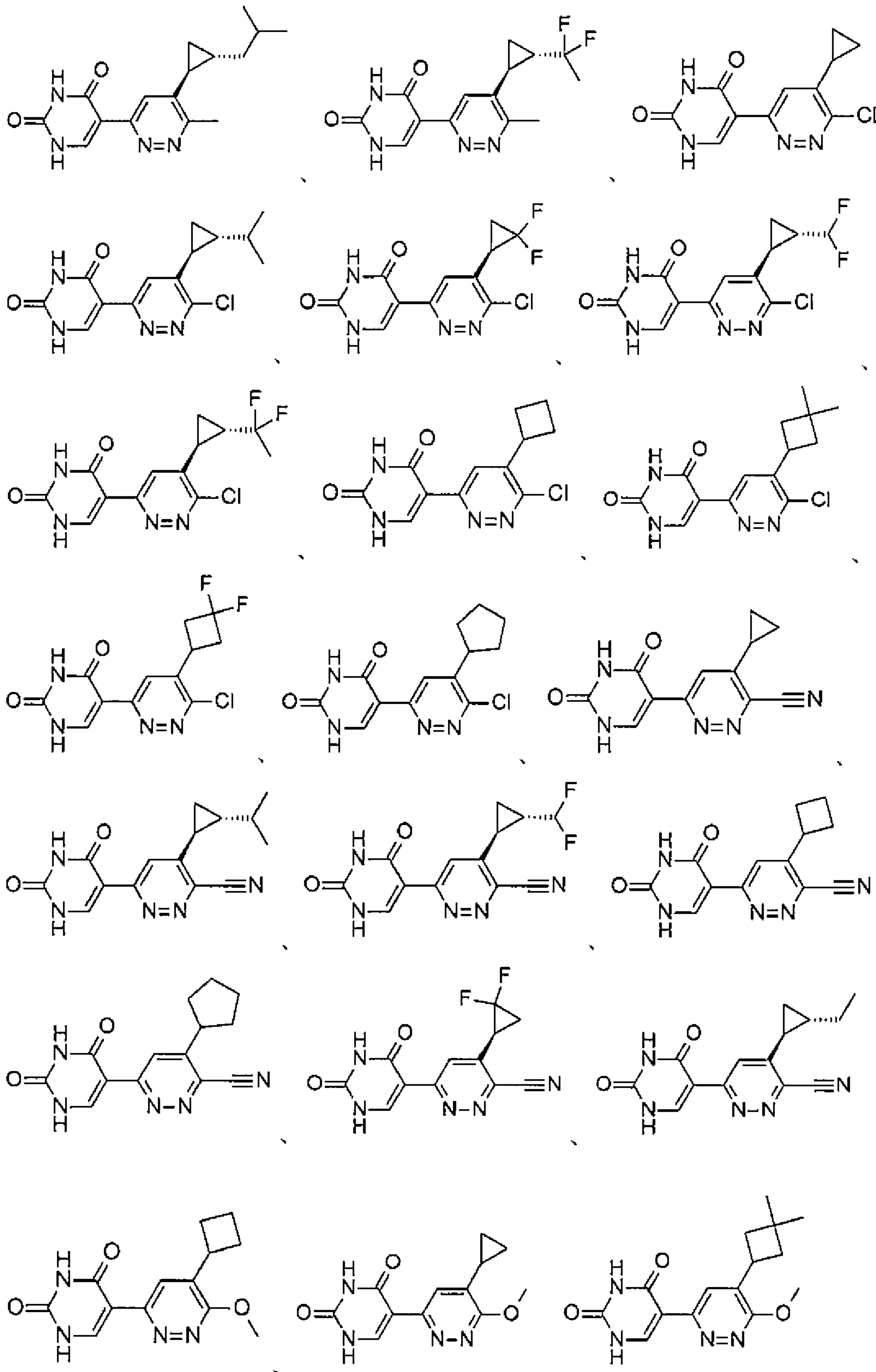
R^2 選自 -H、-CH₃、-F、-Cl、-CN 或 -OCH₃；

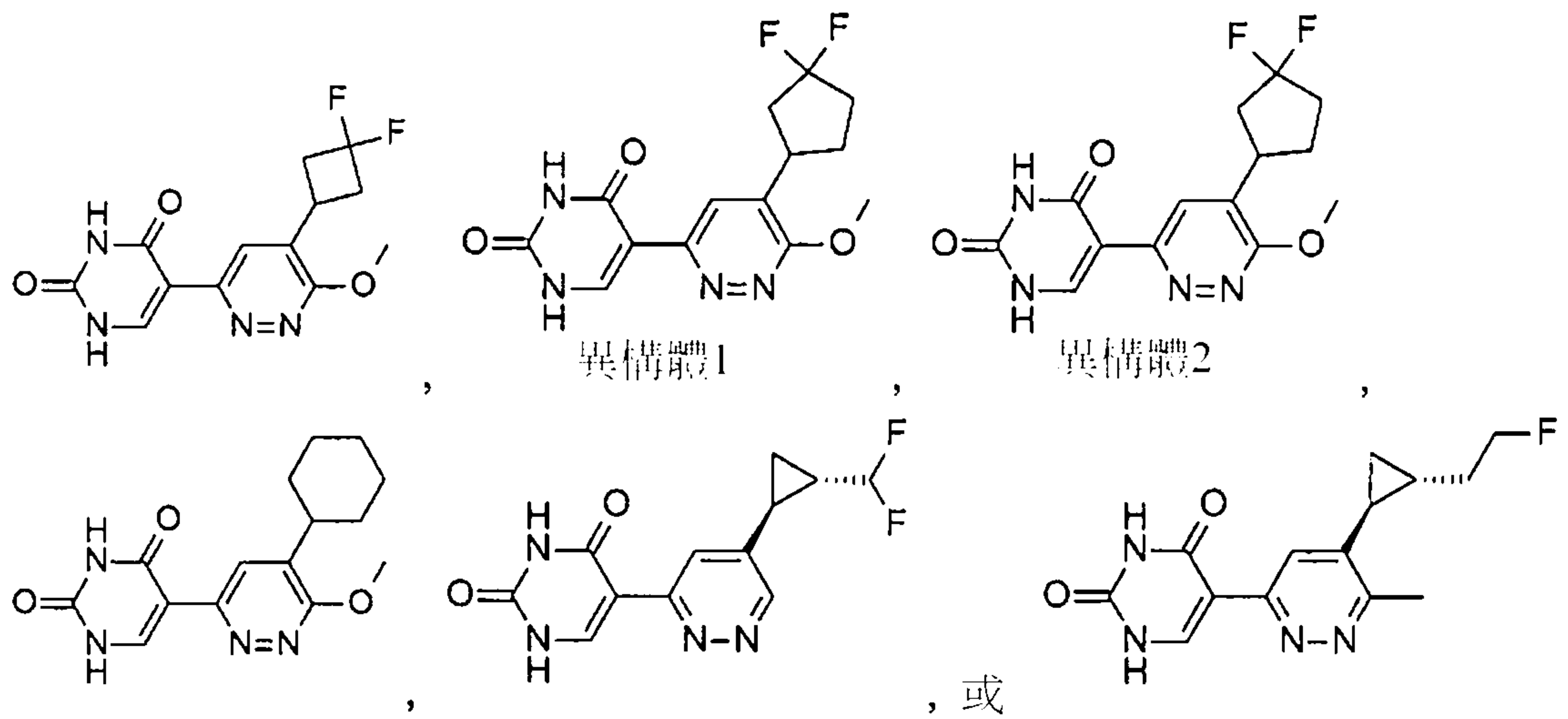
或其醫藥學上可接受之鹽。

【0008】 在另一實施例中，本發明提供式I化合物，其中n為0， R^1 為 -C₁₋₄ 烷基，且 R^2 為 -CH₃；或其醫藥學上可接受之鹽。

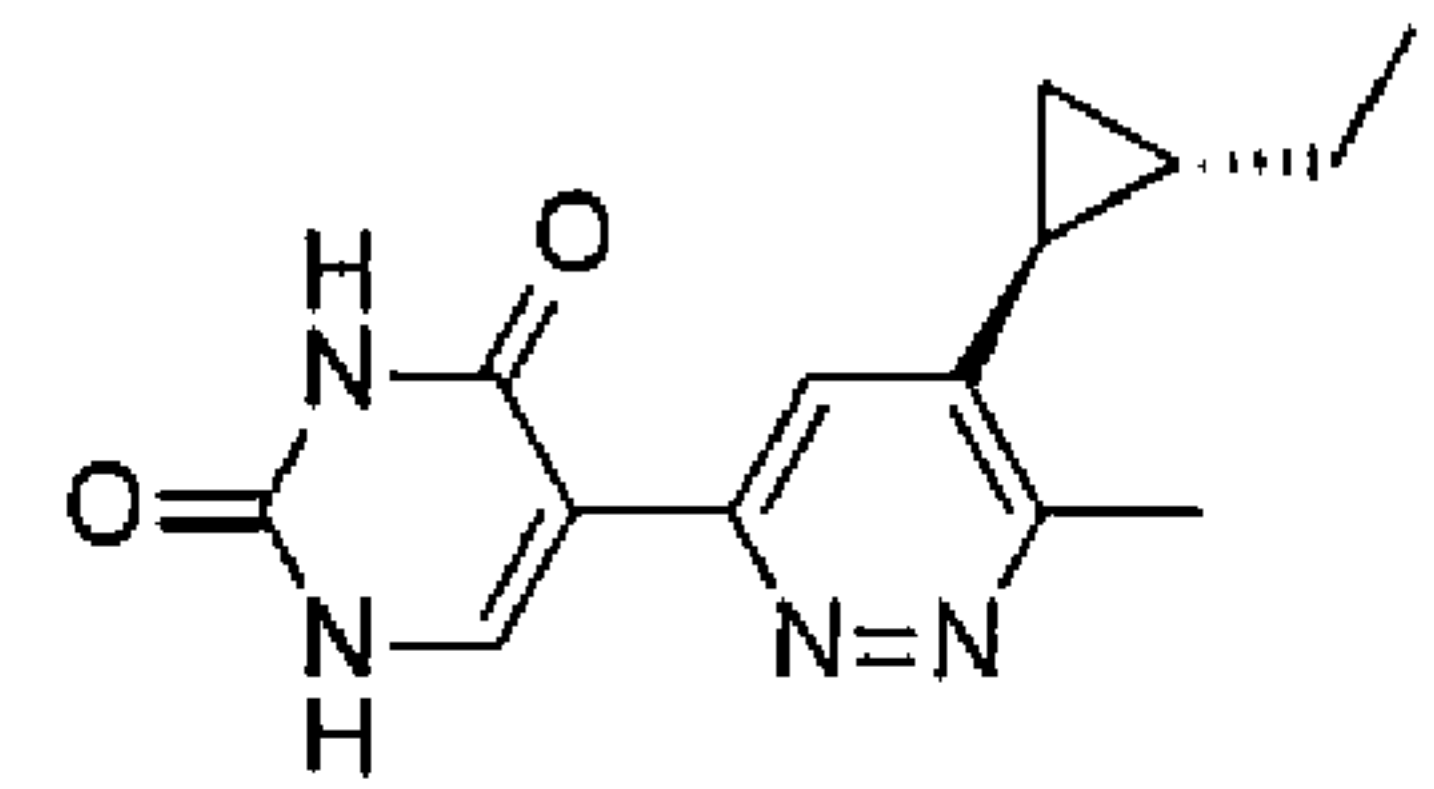
【0009】 在另一實施例中，化合物為



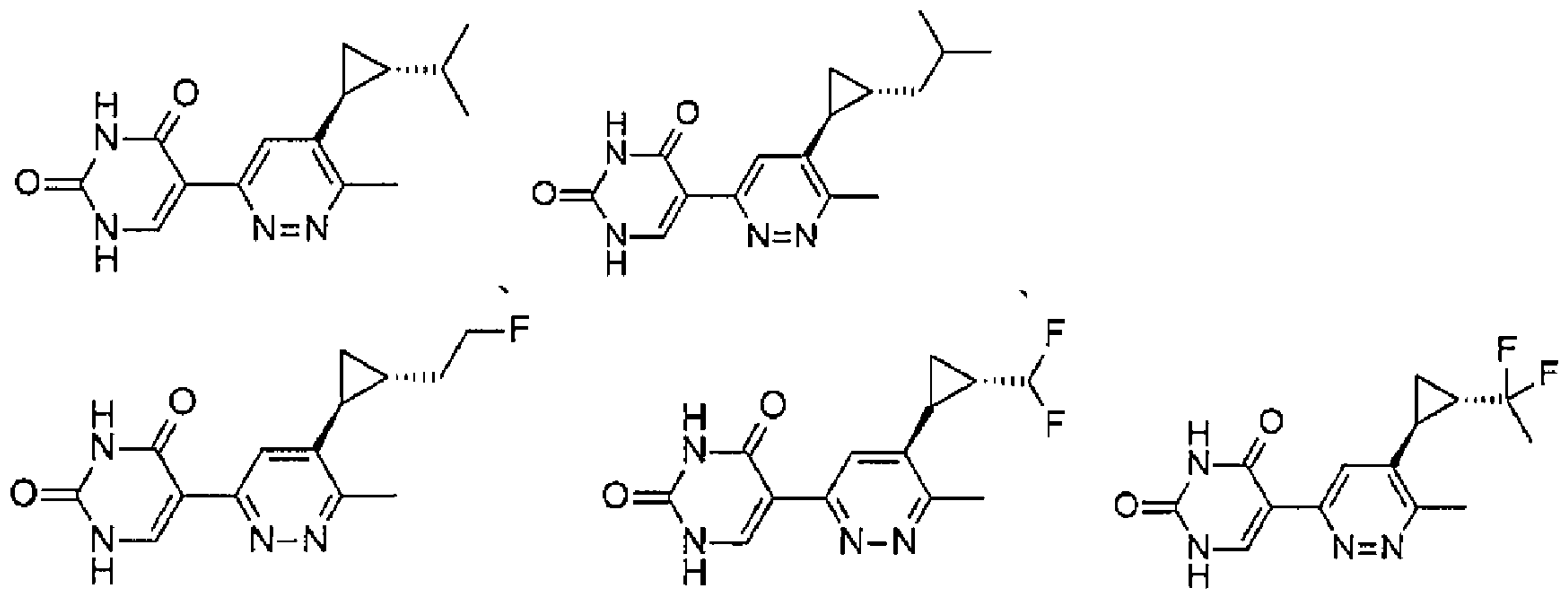




或其醫藥學上可接受之鹽。



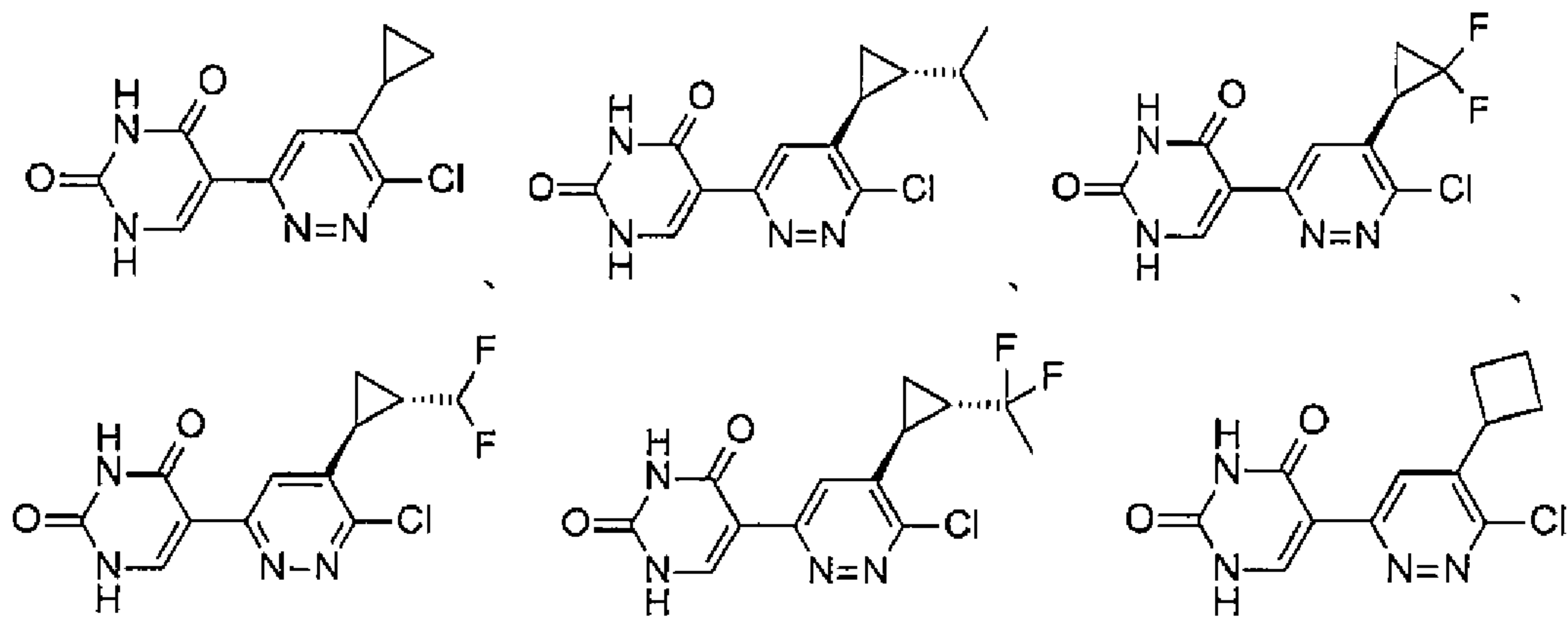
【0010】在另一實施例中，化合物為

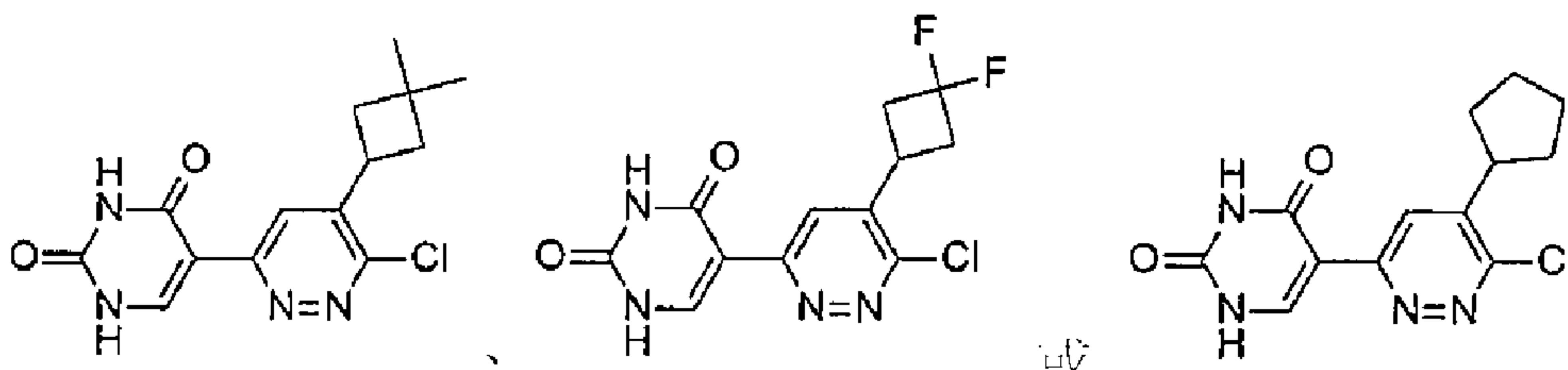


，或其醫

藥學上可接受之鹽。

【0011】在另一實施例中，化合物為



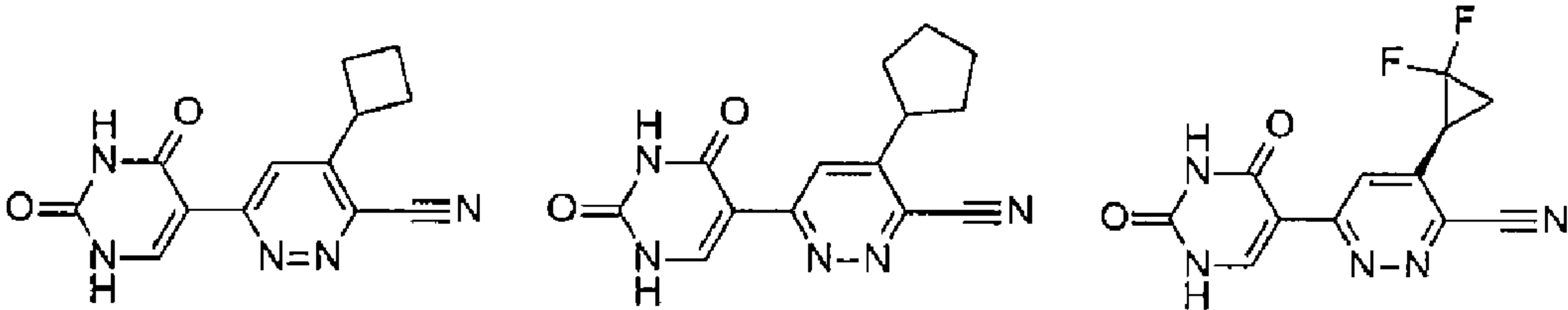
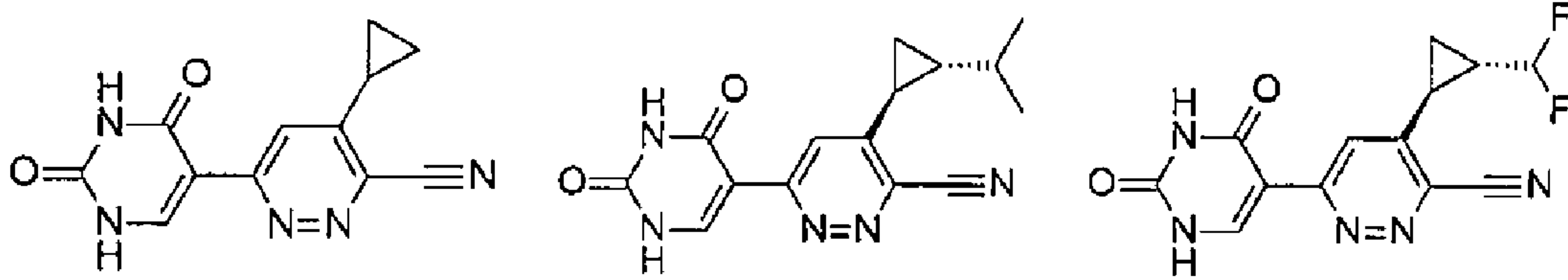


或

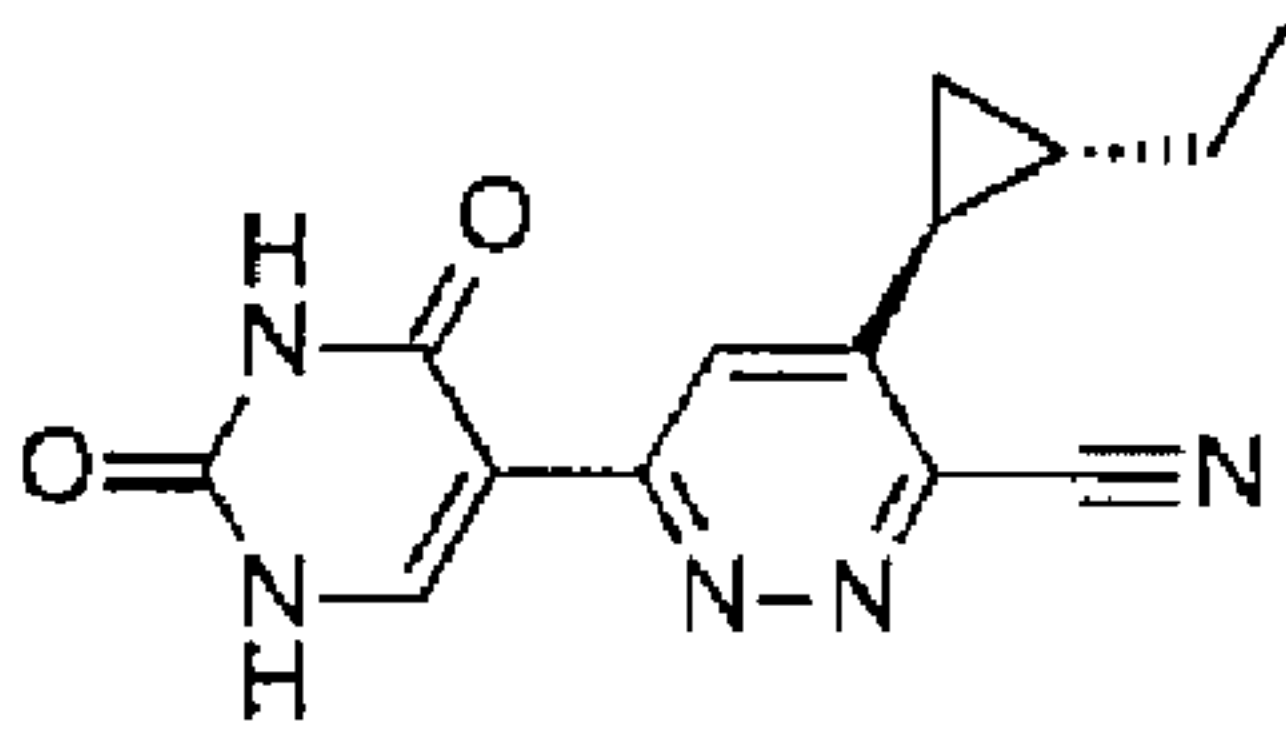
，或其醫藥學上可

接受之鹽。

【0012】 在另一實施例中，化合物為

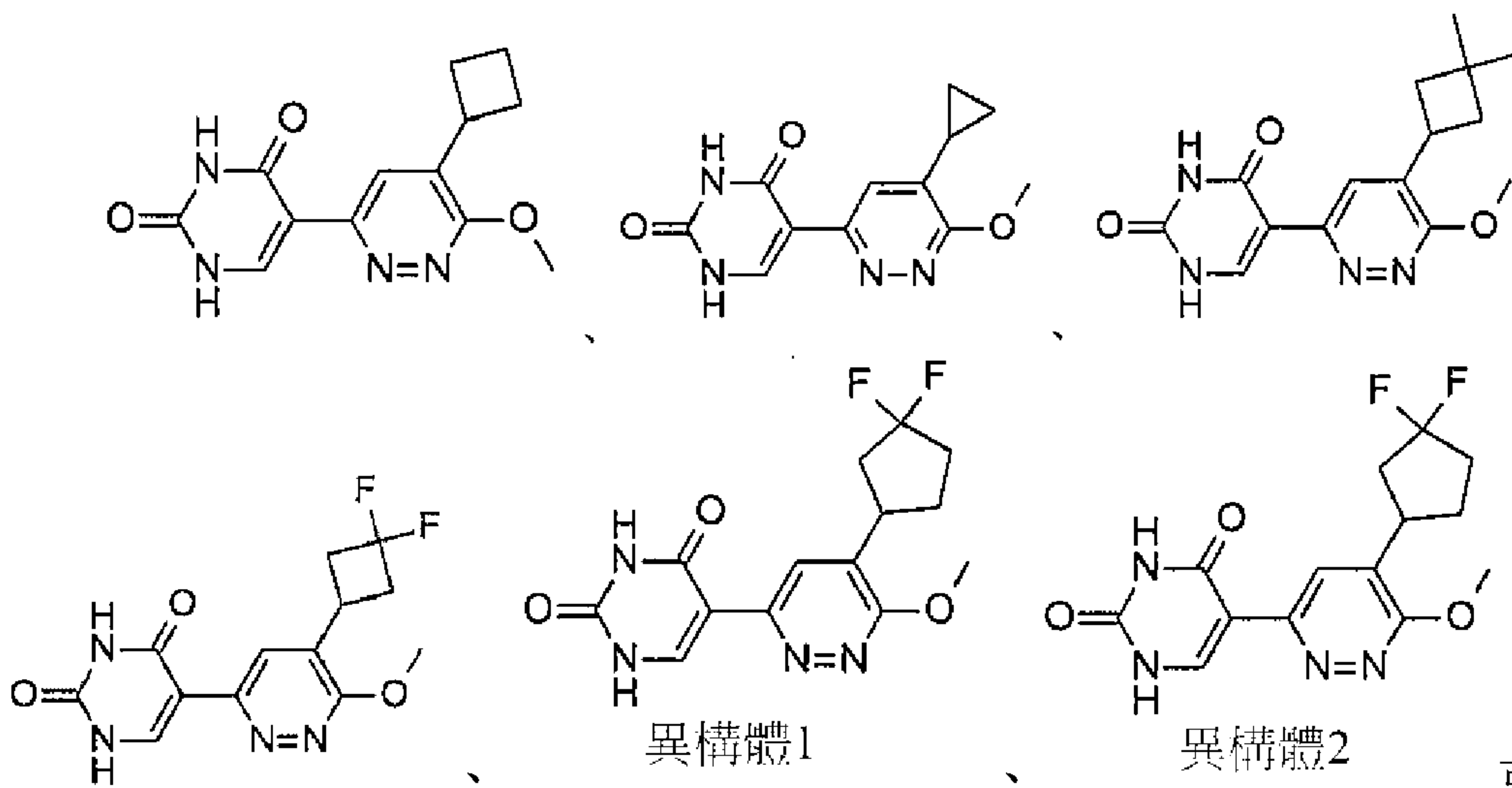


或

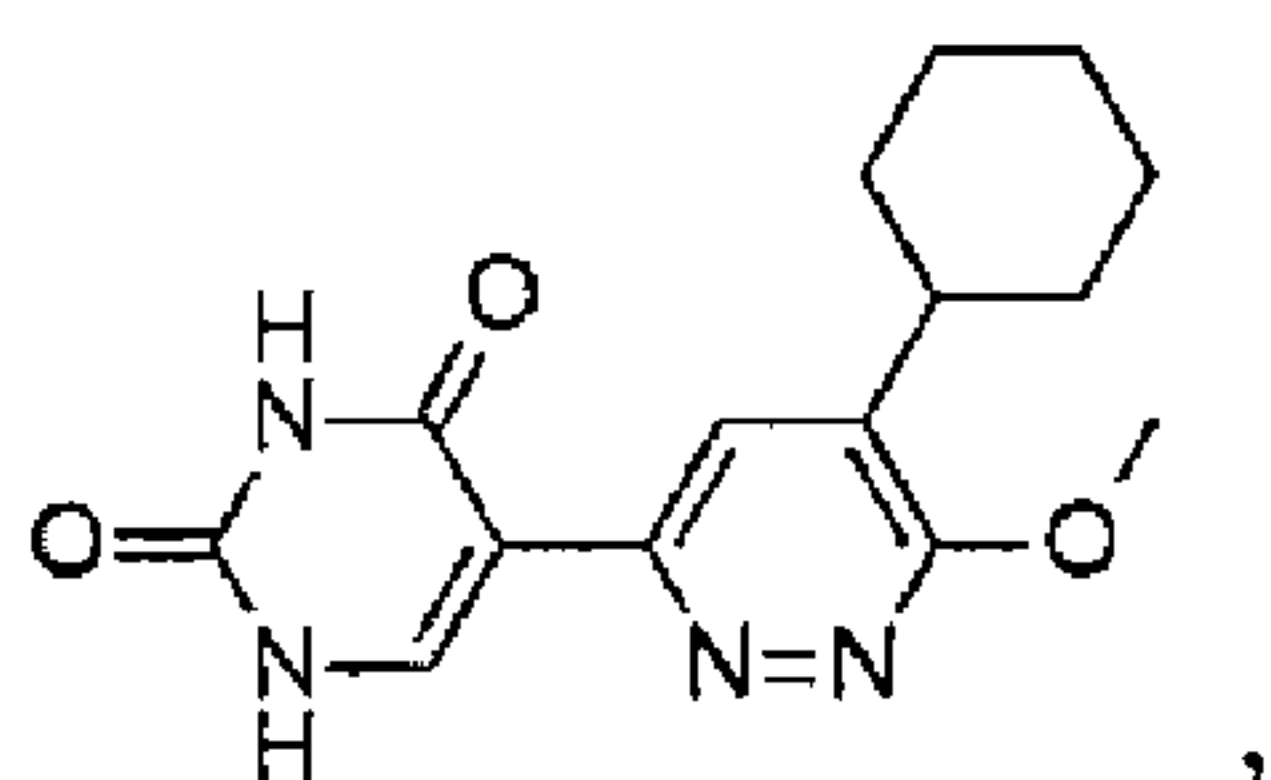


或其醫藥學上可接受之鹽。

【0013】 在另一實施例中，化合物為

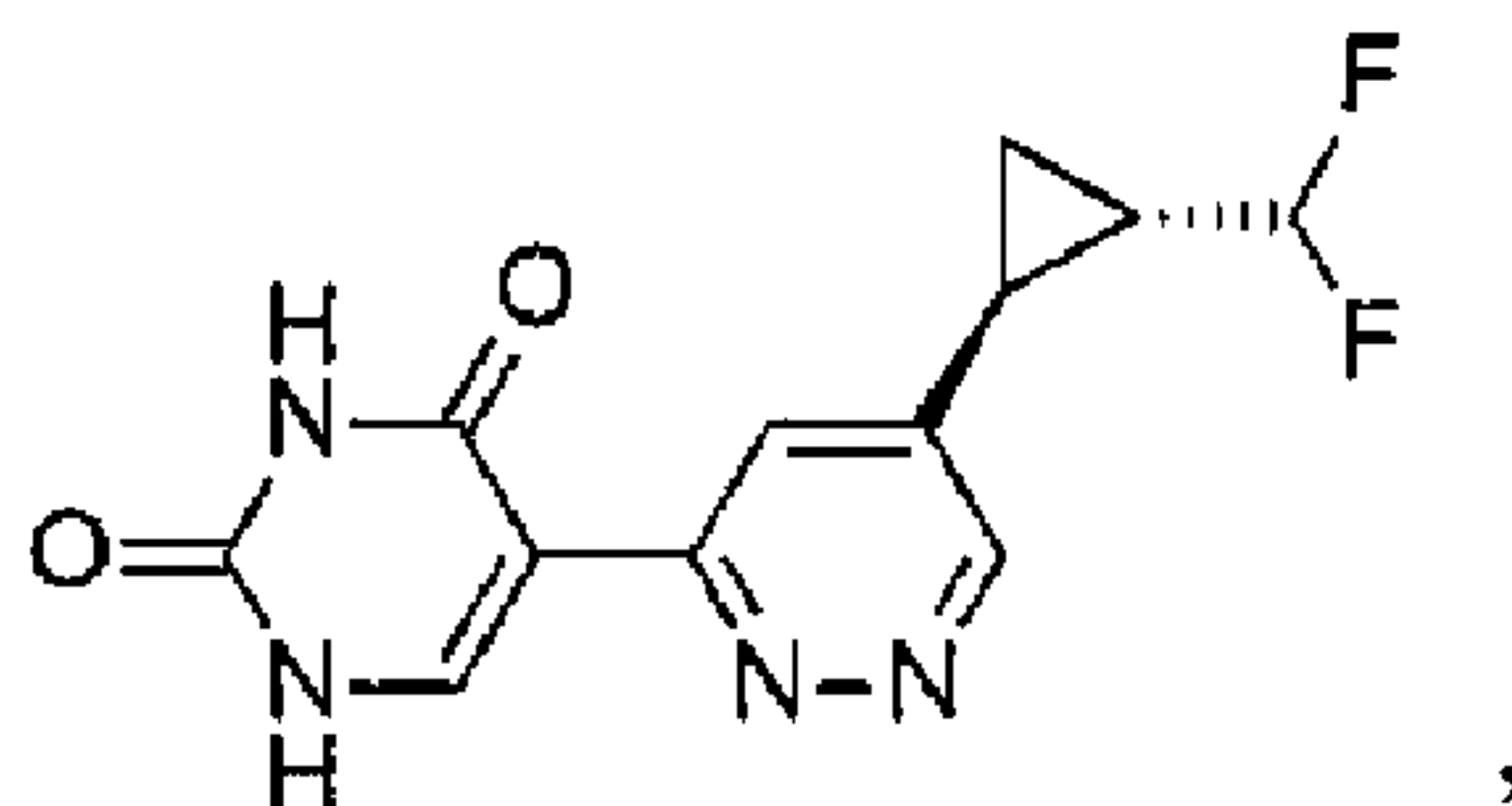


或



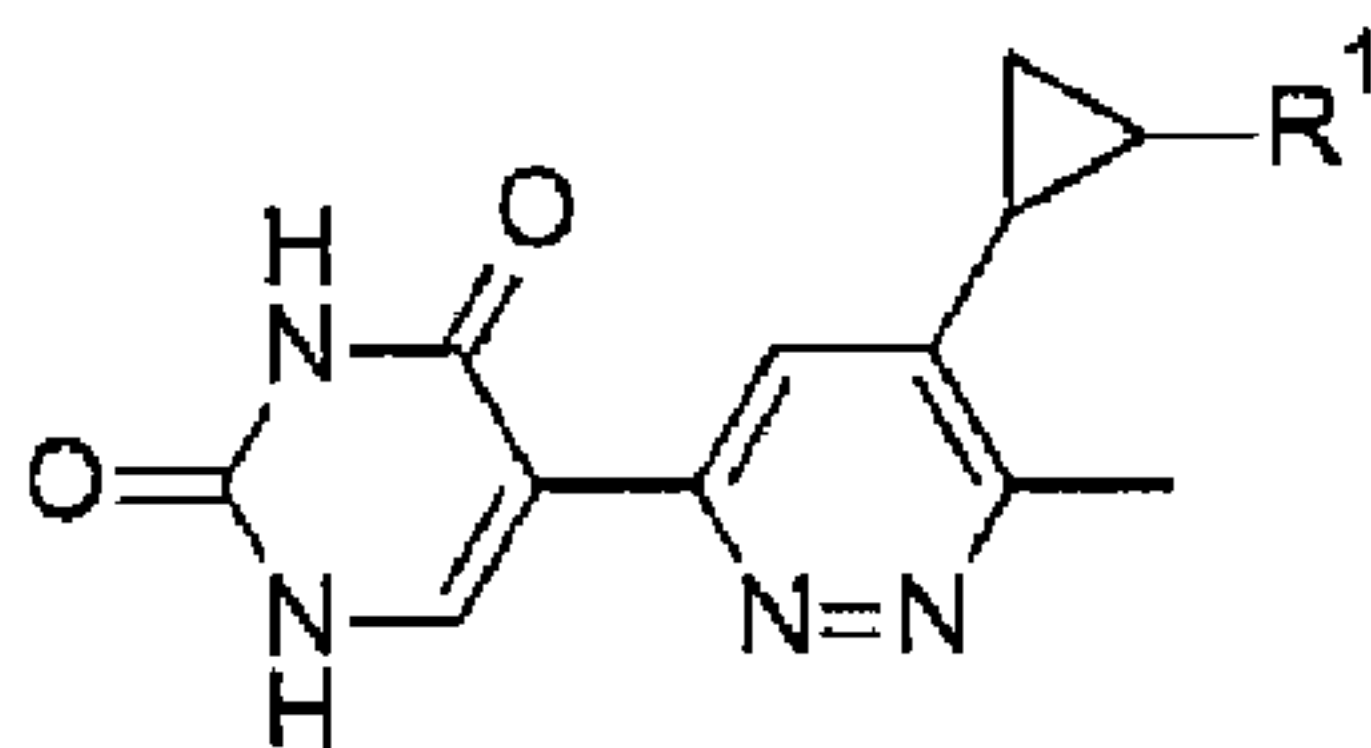
或其醫藥學上可接受之鹽。

【0014】 在另一實施例中，化合物為



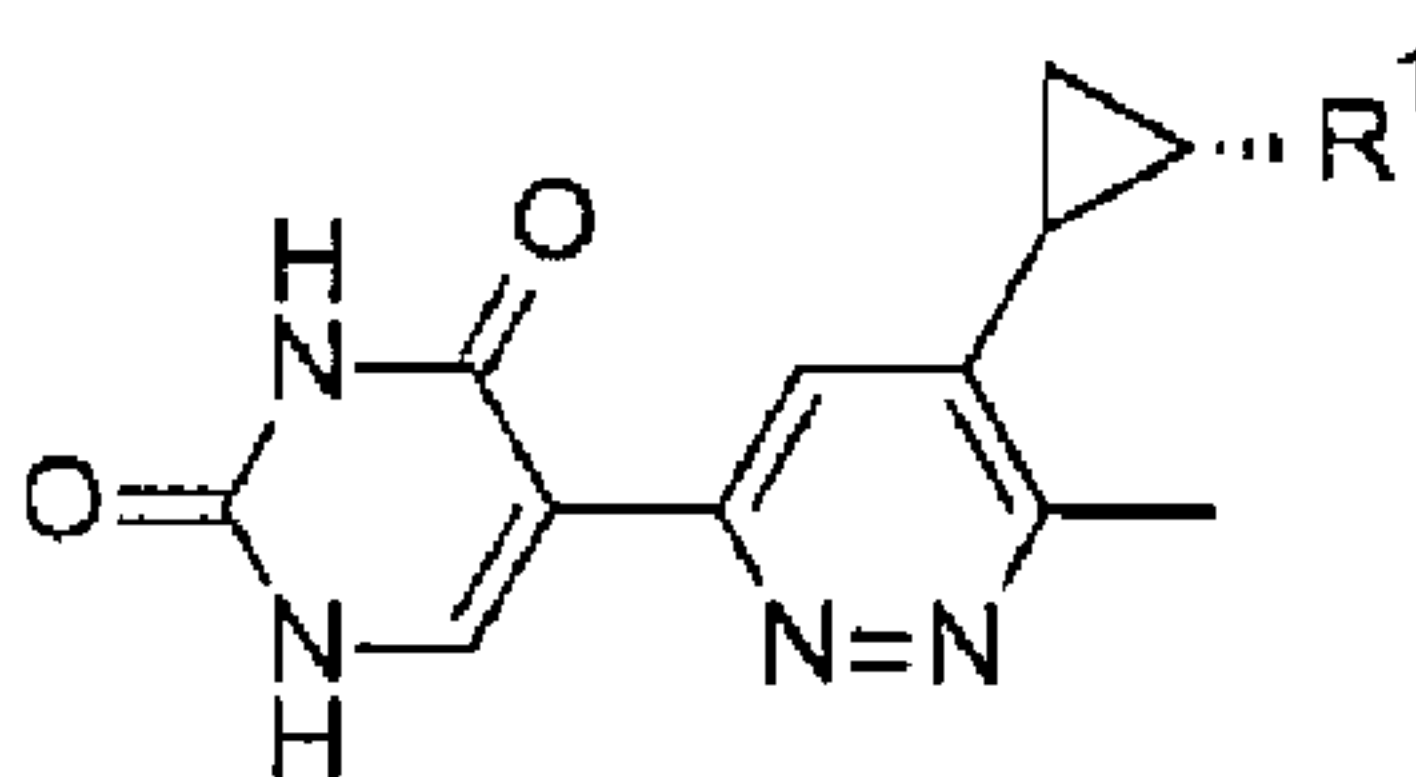
或其醫藥學上可接受之鹽。

【0015】 在一個實施例中，式I化合物具有下式：

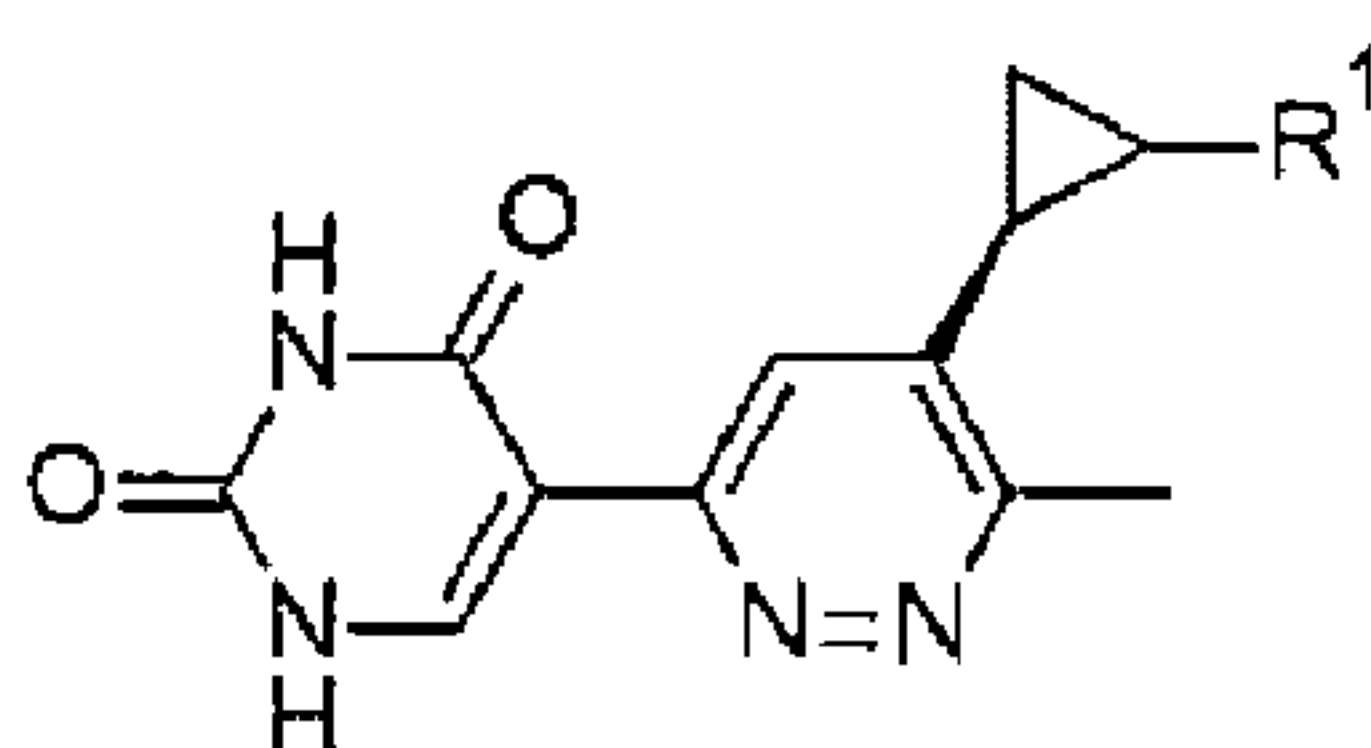


其中R¹為-CH₂CH₃或-CH(CH₃)₂，或其醫藥學上可接受之鹽。在另一實施例中，R¹為-CH₂CH₃，或其醫藥學上可接受之鹽。在另一實施例中，R¹為-CH(CH₃)₂，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0016】 在另一實施例中，式I化合物具有下式：

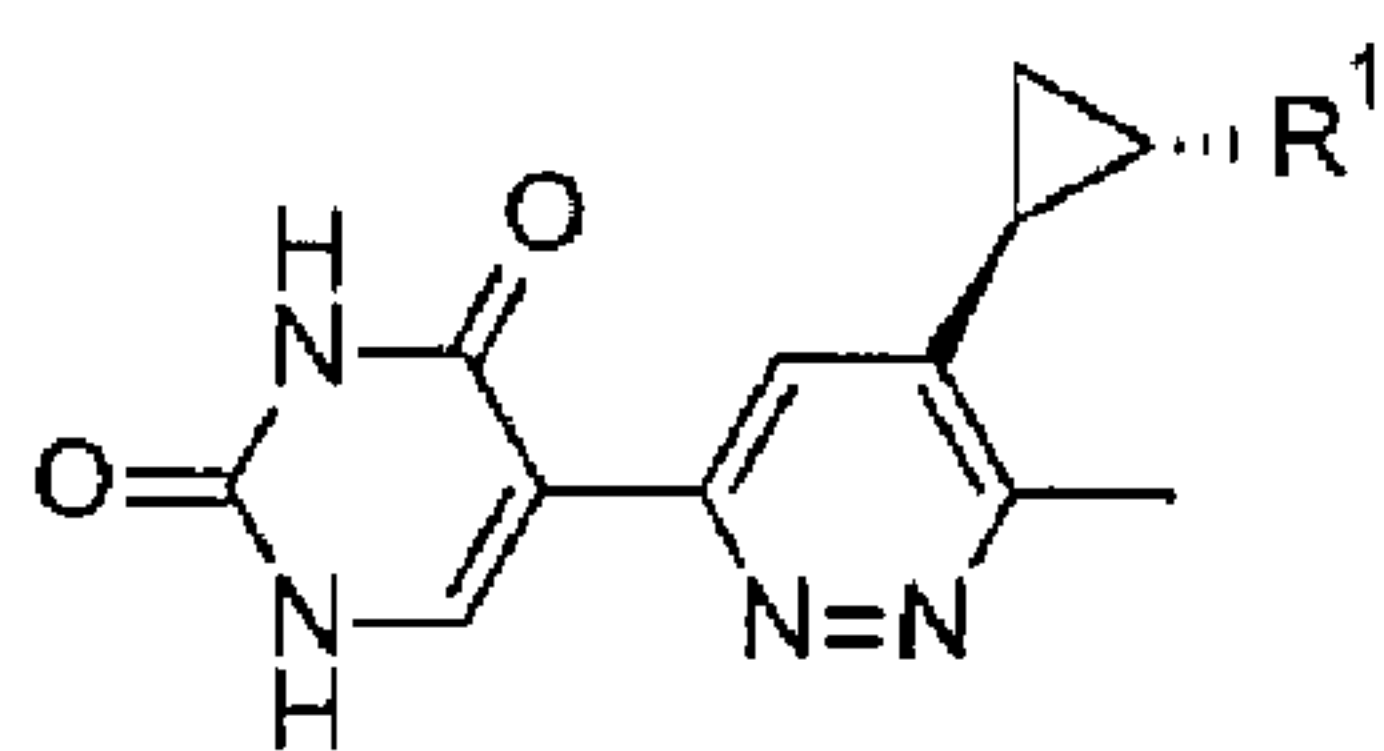


或



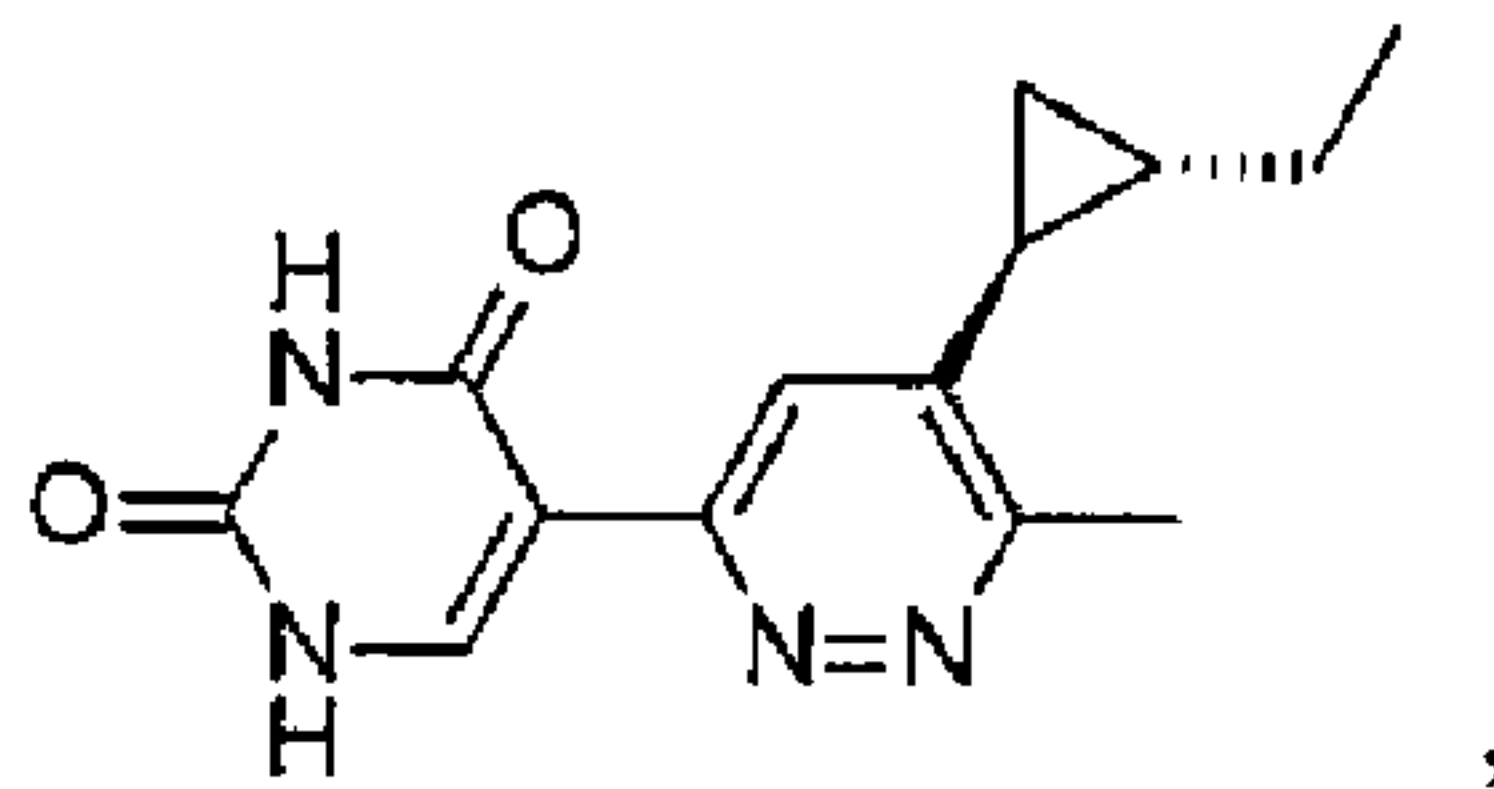
其中R¹為CH₂CH₃或CH(CH₃)₂，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0017】 在另一實施例中，式I化合物具有下式：



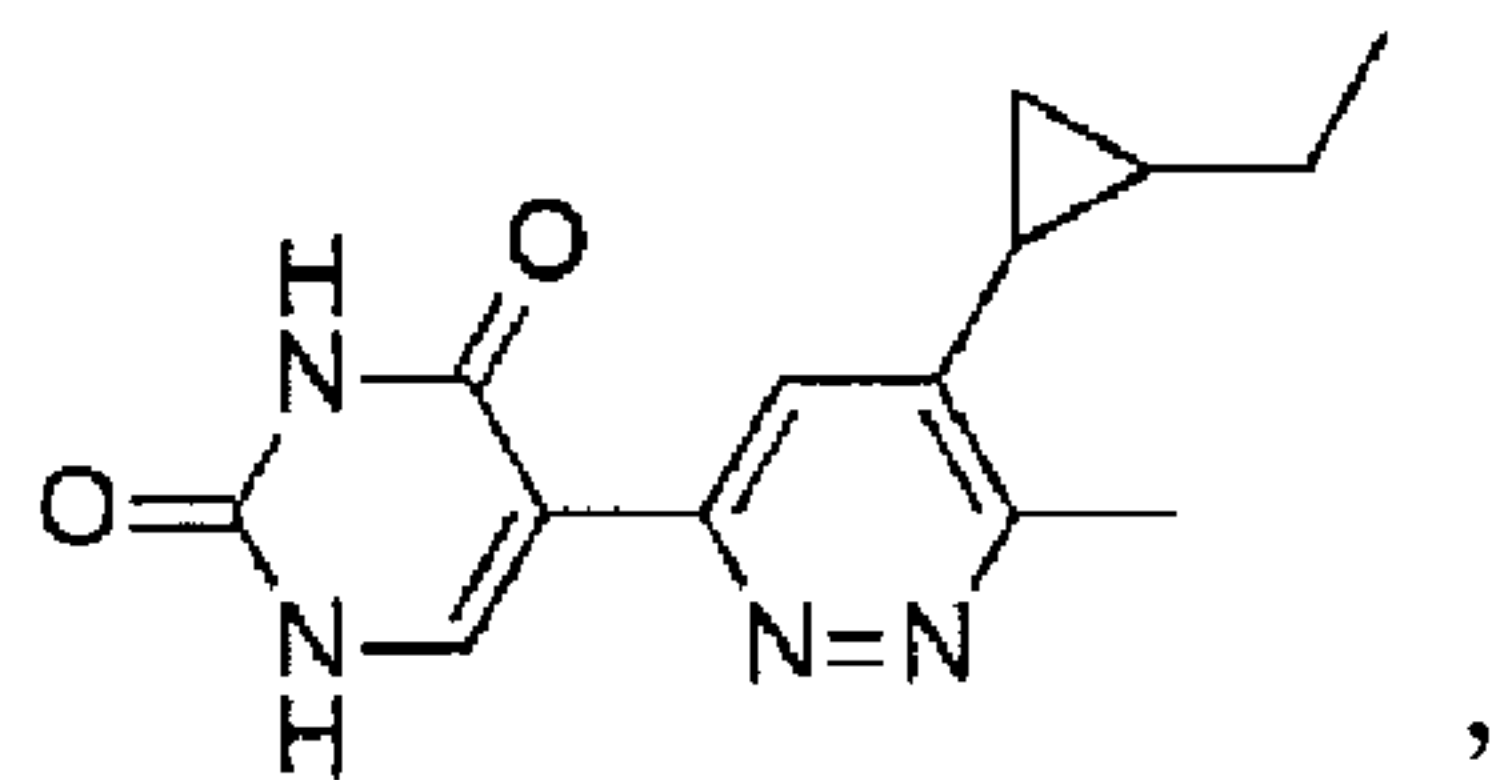
其中R¹為-CH₂CH₃或-CH(CH₃)₂，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0018】 在另一實施例中，本發明提供以下化合物：



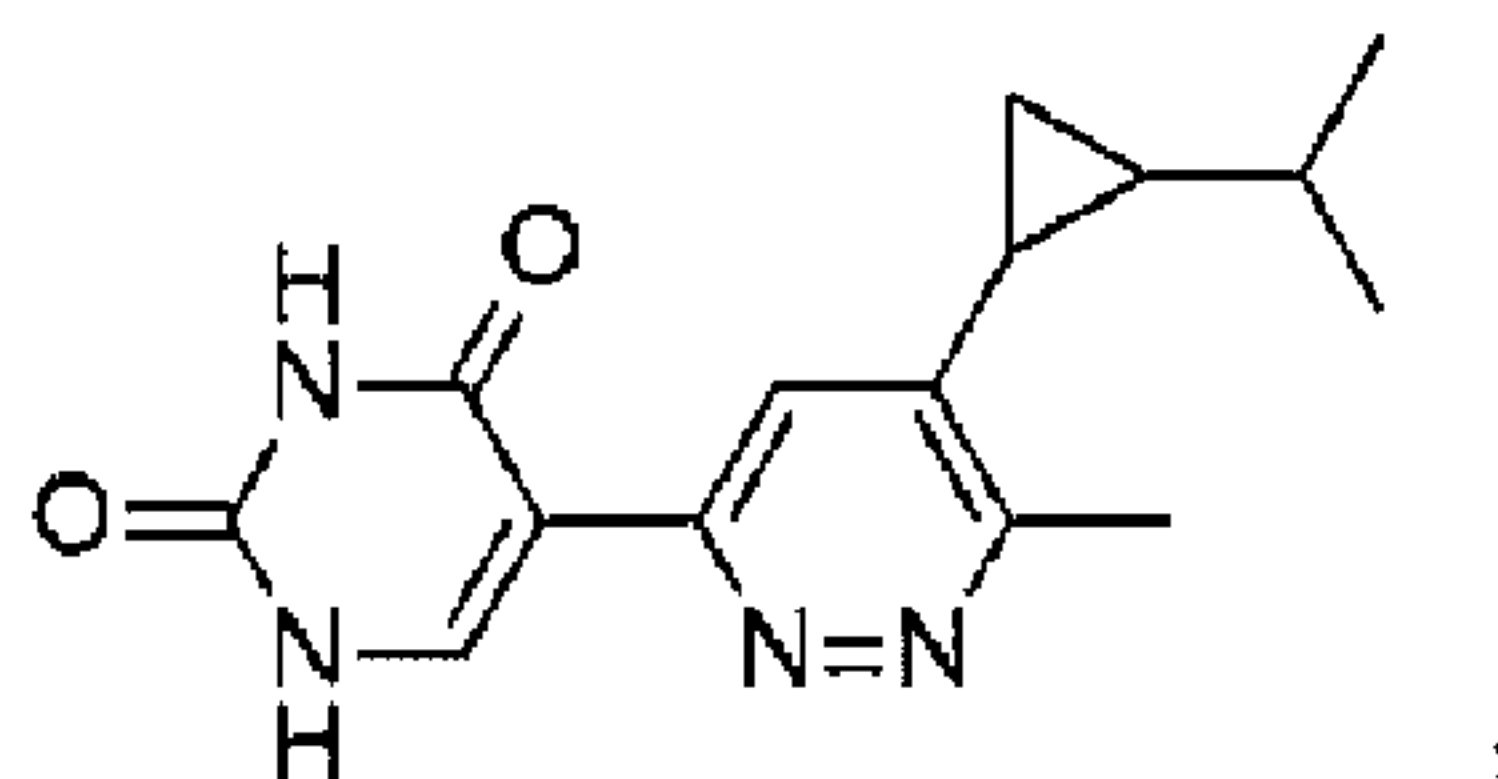
或其醫藥學上可接受之鹽。

【0019】 在一個實施例中，本發明提供以下化合物：



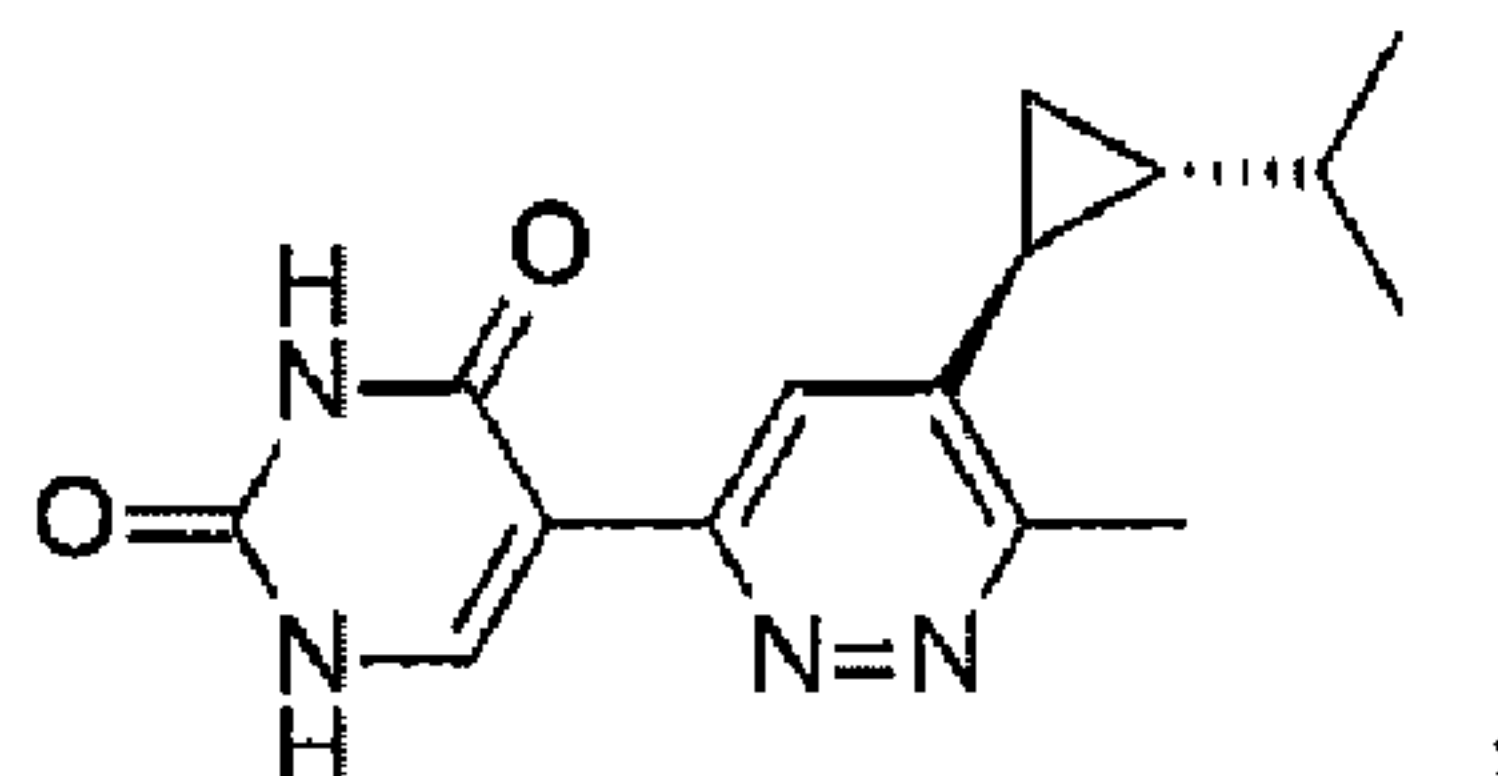
或其醫藥學上可接受之鹽。

【0020】 在另一實施例中，本發明提供以下化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【0021】 在另一實施例中，本發明提供以下化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【0022】 在一個實施例中，本發明提供一種化合物5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受

之鹽。

【0023】 在另一實施例中，本發明提供一種化合物5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0024】 在一個實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，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。

【0025】 在另一實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，以及一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0026】 在一個實施例中，本發明提供一種用於治療癌症之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0027】 在另一實施例中，本發明提供一種用於治療癌症之方法，其包含向有需要之患者投與有效量之5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0028】 在一個實施例中，本發明提供用於療法中之5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0029】 在另一實施例中，本發明提供用於療法中之5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0030】 在一個實施例中，本發明提供用於治療癌症之5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0031】 在另一實施例中，本發明提供用於治療癌症之5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

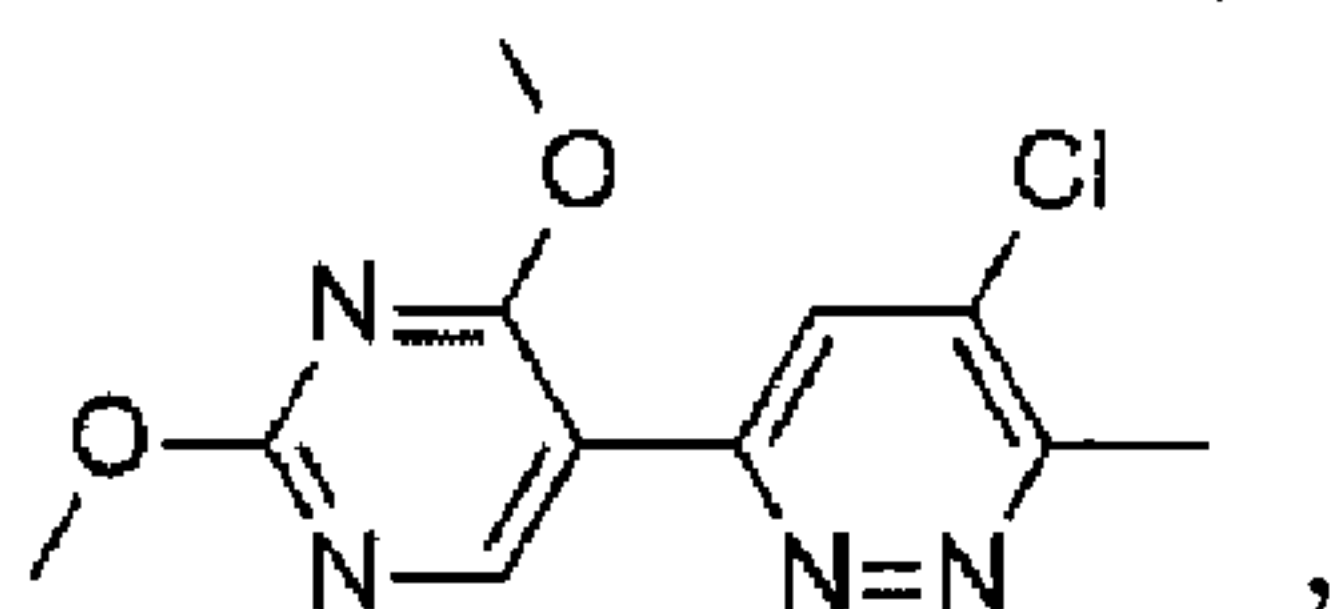
【0032】 在一個實施例中，本發明提供一種用於治療癌症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0033】 在另一實施例中，本發明提供一種用於治療癌症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0034】 在一個實施例中，本發明提供5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽在製造用於治療癌症之藥物中的用途。

【0035】 在另一實施例中，本發明提供5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽在製造用於治療癌症之藥物中的用途。

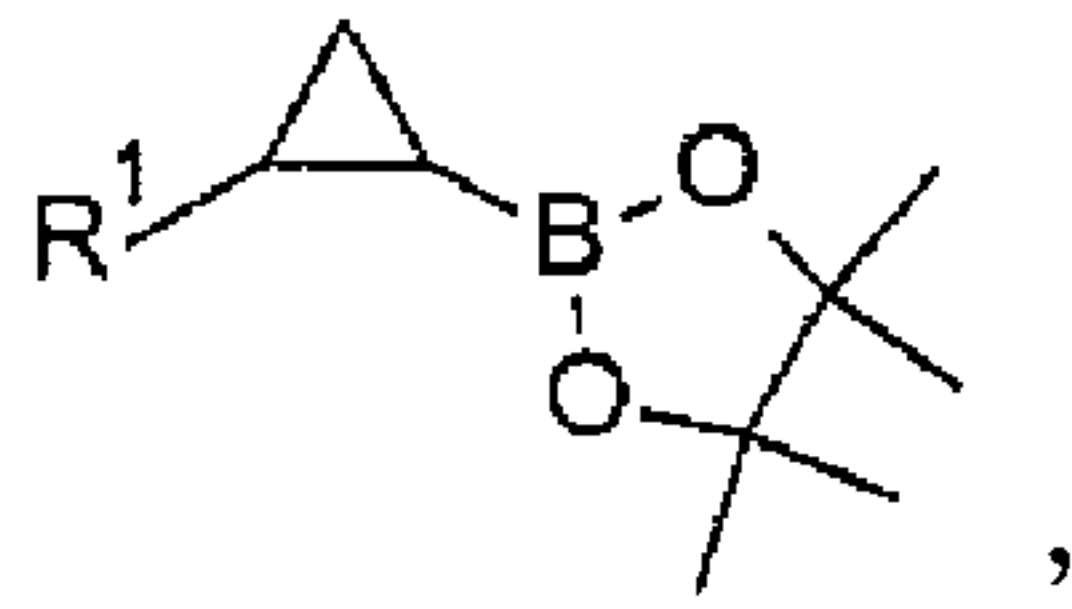
【0036】 在一個實施例中，本發明提供4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪之製備及用途，其可在結構上表示為：



其適用於製造用於治療癌症之化合物或藥物。在另一實施例中，本

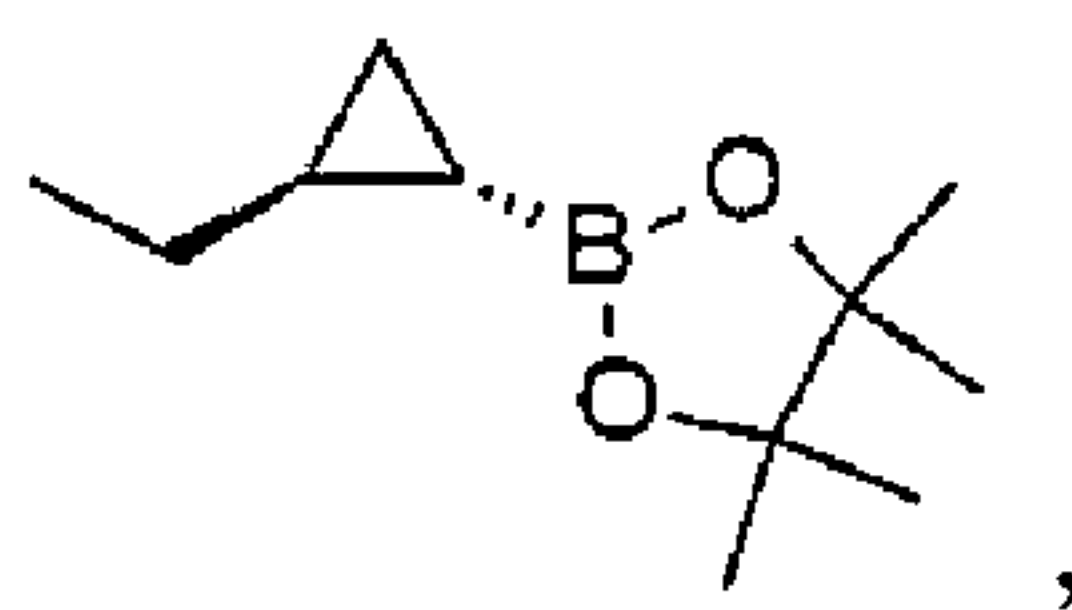
發明提供用於製造化合物或藥物之4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪。

【0037】 在一個實施例中，本發明提供4,4,5,5-四甲基-2-(2位取代的環丙基)-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷之製備及用途，其可在結構上表示為：



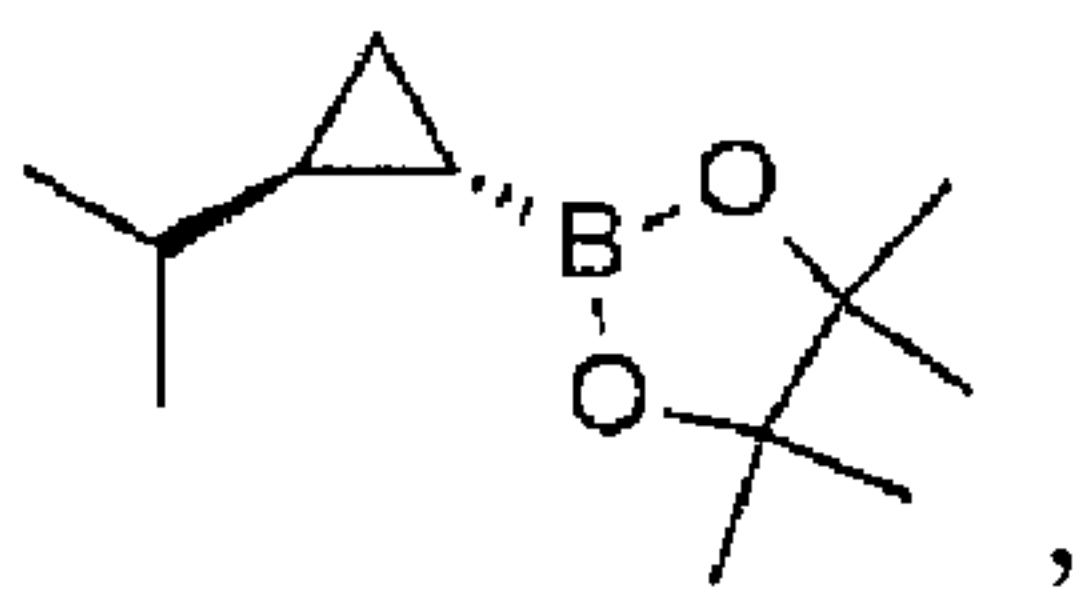
其中 $R^1 = CH_2CH_3$ 或 $CH(CH_3)_2$ ，其適用於製造用於治療癌症之藥物。在一個實施例中， $R = CH_2CH_3$ 。在另一實施例中， $R = CH(CH_3)_2$ 。在另一實施例中，本發明提供用於製造化合物或藥物之4,4,5,5-四甲基-2-(2位取代的環丙基)-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷。

【0038】 在一個實施例中，本發明提供2-[(1S,2S)-2-乙基-環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷之製備及用途，其可在結構上表示為：



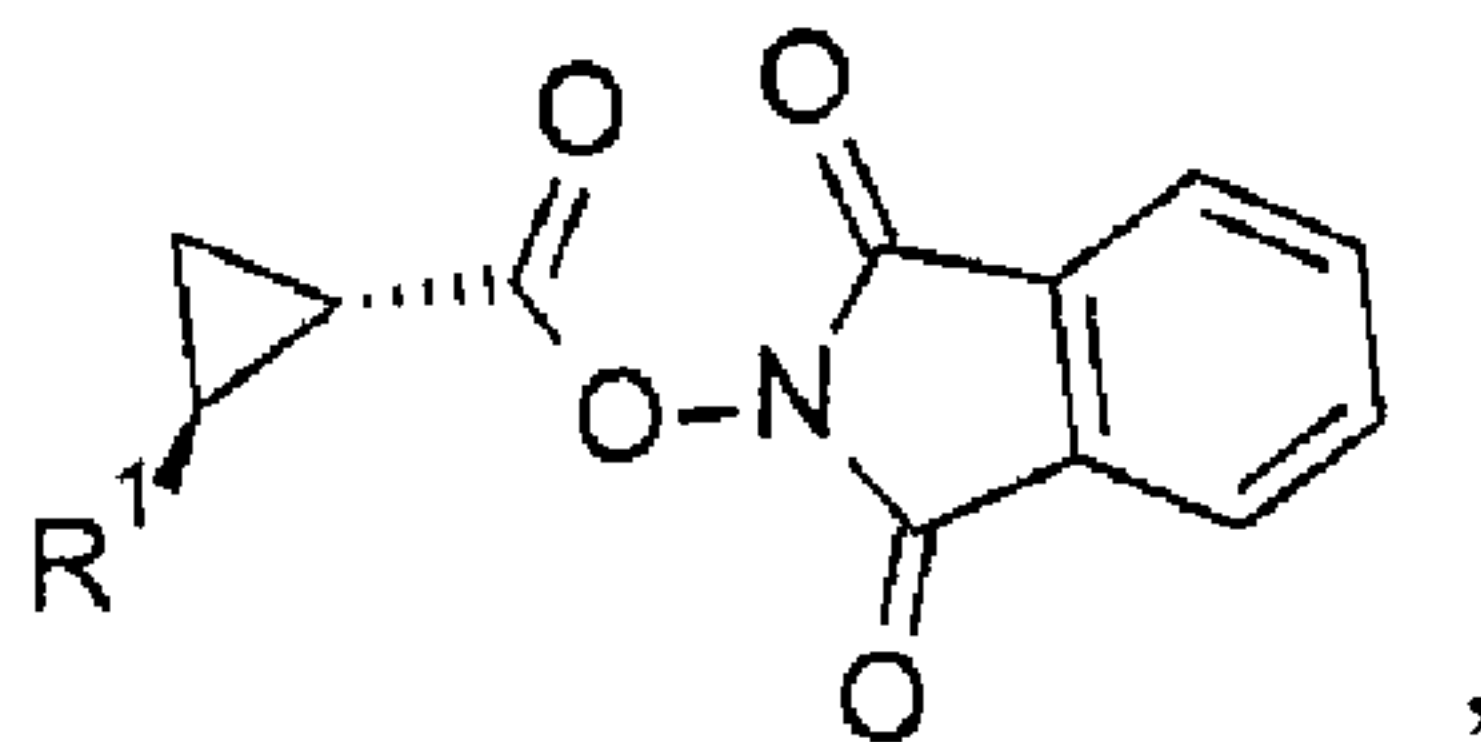
其適用於製造用於治療之癌症化合物或藥物。在另一實施例中，本發明提供用於製造化合物或藥物之2-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷。

【0039】 在一個實施例中，本發明提供2-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷之製備及用途，其可在結構上表示為：



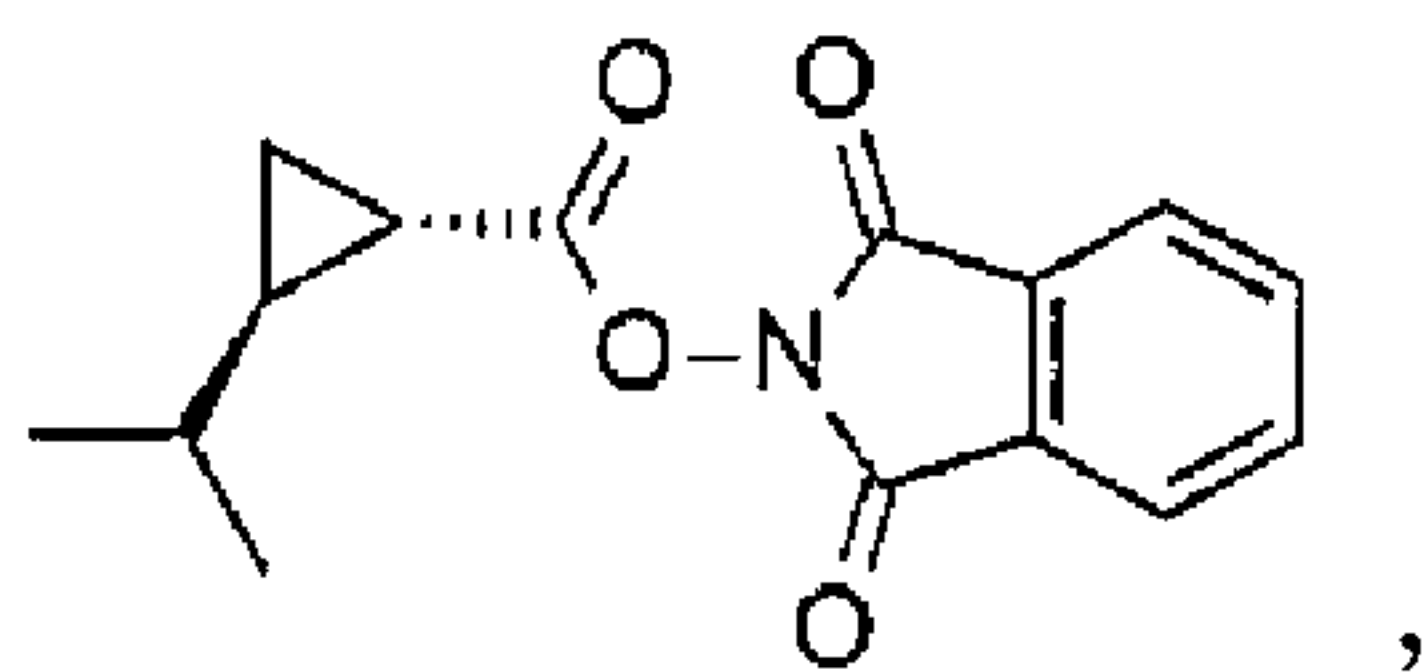
其適用於製造用於治療癌症之化合物或藥物。在另一實施例中，本發明提供用於製造化合物或藥物之2-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷。

【0040】 在一個實施例中，本發明提供使用(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基酯)對掌性合成2-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷，其可在結構上表示為：



其中 $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ，其適用於製造用於治療癌症之化合物或藥物。在另一實施例中，本發明提供用於製造化合物或藥物之(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基酯)。

【0041】 在一個實施例中，本發明提供使用(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基酯)對掌性合成2-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷，其可在結構上表示為：



其適用於製造用於治療癌症之化合物或藥物。在另一實施例中，本發明提供用於製造化合物或藥物之(1S,2S)-2-異丙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基酯)。

【0042】 CD73蛋白在許多組織中表現，包括大腦、甲狀腺、骨

髓、淋巴結、扁桃體、脾臟、心肌、平滑肌、肺、鼻咽、肝、膽囊、胰腺、唾液腺、口腔黏膜、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸、腎臟、膀胱、睪丸、前列腺、輸卵管、陰道、乳房、子宮頸、子宮、子宮內膜、卵巢、軟組織及皮膚(proteinatlas.org/ENSG00000135318-NT5E/tissue)。CD73在多種類型之腫瘤中過度表現(Antonioli L等人, *Nat. Rev. Cancer* 13, 842-857 (2013); Antonioli L等人, *Trends Cancer* 2: 95-109 (2016)。CD73亦在正常及病理性人類肝膽胰臟組織中表現，包括肝細胞、胰管腺癌及肝外膽管細胞癌(Sciarra, A.等人, *Cancer Immunol Immunother* 2019; doi.org/10.1007/s00262-018-2290-1)。

【0043】 升高的CD73表現及活性與腫瘤侵襲性及轉移性相關聯，且與較短的患者存活時間相關聯(Jin D等人, *Cancer Research* 2010; 70: 2245-2255)。增加的CD73表現與不良預後相關聯(Inoue K等人, *Oncotarget* 8: 8738-8751 (2017); Turcotte K等人, *Cancer Res.* 5: 4494-4503 (2015); Lu YT等人, *World J. Gastroenterol.* 19: 1912-1918 (2013); Wu XR等人, *J. Surg. Oncol.* 106: 130-137 (2012); Buisseret S等人, *Ann. Oncol.* 29: 1056-1062 (2017); Leclerc R等人, *Clin. Cancer Res.* 22: 158-66 (2016))。

【0044】 三陰性乳癌中之CD73表現與較糟的臨床結果及增加的對蔥環黴素化療之抗性相關聯(Allard B等人, *Expert Opin. Ther. Targets* 2014; 18: 863-881)。CD73與頭頸部鱗狀細胞癌之不良預後相關聯(Ren Z-H等人, *Oncotargets* 2016; 7: 61690-61702)。CD73表現亦與腎細胞癌之進展相關聯(Yu Y等人, *Oncol. Lett.* 2015; 9: 2485-2494)。

【0045】 CD73在子宮內膜腫瘤(Aliagas E等人, *Mediators of*

Inflammation 2014; doi: 10.1155/2014/509027)、前列腺腫瘤組織 (Leclerc BG等人, *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 158-166)、非小細胞肺癌組織(Inoue Y等人, *Oncotarget* 2017; 8: 8738-8751)中過度表現。已報導CD73在腫瘤中過度表現, 該等腫瘤包括乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌、胃癌及膽囊癌(Gao Z-W及Zhang H-Z, *Biomed Res. Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654)。已報導CD73在癌細胞株中過度表現, 該等癌細胞株包括神經膠母細胞瘤、黑素瘤、乳癌、卵巢癌、神經管母細胞瘤及膀胱癌細胞株(Gao Z-W及Zhang H-Z, *Biomed Res.Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654)。

【0046】 已報導CD73-腺苷減小卵巢癌患者之免疫反應及存活率 (Gaudreau P-O等人, *Oncoimmunology* 2016; 5(5): e1127496)。

【0047】 已報導用選擇性CD73抑制劑 α,β -亞甲基腺苷5'-二磷酸酯在活體內進行之CD73阻斷在皮下注射有EG7 (淋巴瘤)、MC38 (結腸)、AT-3 (乳房)及B16F10 (黑素瘤)腫瘤細胞之同基因型小鼠中減少腫瘤生長 (Stagg J等人, *Cancer Research* 2011; 71: 2892-2900 ; Forte G等人, *J. Immunol.* 2012; 189: 2226-2233)。已報導抗CD73抗體療法抑制乳房腫瘤生長及轉移(Stagg J等人, *PNAS* 2010; 107: 1547-1552 ; Terp MG, *J. Immunol.* 2013; 191: 4165-4173)。

【0048】 另外, 已報導腺苷及CD73酶活性在癌症患者中增加 (Huang N等人, *Cancer Res.*75:1538 (2015), 且已報導對免疫檢查點抑制劑無反應之患者比有反應之患者具有更高的腺苷含量(Giannakis HX, et al., *J. Clin. Oncol.* 35: 15 Suppl. 3036-3036 (2017))。

【0049】 已報導致癌活化及雌激素受體喪失與增加的CD73表現相

關聯(Reinhardt J等人, *Cancer Res.* 77: 4697-4709 (2017); Spychala J等人, *Clin. Cancer Res.* 10:708-17 (2004); Ascierto及McArthur J., *Transl. Med.* 15: 173 (2017); Young A等人, *Cancer Res.* 77:4684-4696 (2017))。

【0050】 可受益於CD73抑制劑治療之個體包括：具有對抗PD1/PDL-1抑制劑具有抗性或難以用該等抑制劑治療之腫瘤的個體，該等腫瘤諸如非小細胞肺癌、膀胱癌及黑素瘤；患有EGFR/BRAF/Kras突變型癌症之個體，該等癌症諸如非小細胞肺癌、膀胱癌、黑素瘤、結腸及胰腺；患有雌激素受體(-)癌症之個體，該等癌症諸如三陰性乳癌；具有高表現量之CD73之個體，諸如胰臟癌及結腸直腸癌。視需要，此類個體可經選擇以供基於如藉由IHC分析所量測到的其腫瘤中高CD73表現量之存在；或基於如藉由RT-PCR分析所偵測到的其腫瘤中EGFR及BRAF突變之存在；或基於如藉由IHC或RT-PCR所分析所偵測到的其腫瘤中雌激素受體之損失；或基於如藉由LC-MS分析所偵測到的其腫瘤或血漿中高含量腺苷及AMP之存在而用本文中所揭示之化合物或其醫藥學上可接受之鹽進行治療。對於藥效動力學評估，本文中所描述之基於LC-MS之離體分析可用於量測CD73抑制劑對血液中將AMP轉化為腺苷的影響。

【0051】 本發明亦提供一種治療患者之癌症的方法，其包含向有需要之患者投與有效量的式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0052】 本發明亦提供一種治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該癌症為膀胱癌、乳癌、膽管癌、結腸直腸癌、結腸癌、胃癌、膽囊癌、神經膠母細胞瘤、頭頸癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、神經管母細胞瘤、黑素瘤、

卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌或腎癌。在一個實施例中，乳癌為三陰性乳癌。在另一實施例中，肺癌為非小細胞肺癌。在一個較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮。

【0053】 在一個實施例中，患者為已測定血清CD73活性之患者。在一個較佳實施例中，「測定CD73活性」意謂測定是否存在CD73活性。用於測定CD73表現量或CD73活性之方法為一般熟習此項技術者已知，例如參見S Morello等人, *J. Trans. Med.* 2017; 15:244。在另一較佳實施例中，「測定CD73活性」意謂定量AMP藉由CD73轉化為腺苷之量，且有助於定量CD73活性之量的基於LC-MS之分析提供於本文中。

【0054】 在另一實施例中，患者為已測定組織中之CD73表現之患者。在另一實施例中，組織為腫瘤組織。用於例如使用西方墨點法或免疫組織化學測定組織中之CD73表現量的方法為一般熟習此項技術者已知(X-R Wu等人, *J. Surg. Oncol.* 2012; 106: 130-137)。

【0055】 本發明亦提供一種方法，其包含測定來自己投與如技術方案1至12中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的患者之組織中之CD73表現。在一較佳實施例中，組織為腫瘤組織。

【0056】 本發明亦提供一種方法，其包含測定來自己投與根據本文中之式I化合物的化合物或其醫藥學上可接受之鹽的患者之血清中之CD73活性。此方法係靈敏的，不涉及腫瘤活體組織切片，不涉及抗體或免疫組織化學，有助於定量CD73活性(例如，藉由有助於計算EC₅₀)。在一個較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮。在另一較佳實施例中，該方法進一步包含使用放

射性標記之單磷酸腺苷(AMP)分析CD73活性且使用質譜法測定放射性標記之AMP濃度。在另一較佳實施例中，放射性標記之AMP為 $^{13}\text{C}5_^{15}\text{N}5\text{-AMP}$ 。

【0057】 在另一較佳實施例中，該方法包含(a)將來自患者之血清提供於複數個容器(例如，微量滴定培養盤)中之每一者中，該等容器經組態以含有向患者投與的各種濃度之化合物，(b)將 $^{13}\text{C}10_^{15}\text{N}5_AMP$ 提供於複數個容器中之各容器中，(c)在有助於混合(例如，震盪)的條件下培育複數個容器，(d)使複數個容器離心，(e)將上澄液自各容器轉移至新的各別容器，(f)將含有內部標準物之萃取溶液提供於新的各別容器中之每一者中，(g)使新的各別容器離心，(h)將上澄液自各新的各別容器轉移至各別分析容器，(i)如本文中所描述藉由LC/MS (「用於腺苷及腺苷純化之質譜法(Mass Spectroscopy for Adenosine and Adenosine Purification)」)針對 $^{13}\text{C}10_^{15}\text{N}5_adenosine$ 、 $^{13}\text{C}10_^{15}\text{N}4_inosine$ 及 $^{15}\text{N}4$ 次黃嘌呤分析各各別分析容器中之上澄液，以及(j)計算 EC_{50} 。在一個較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮。在一較佳實施例中，內部標準物為 $^{13}\text{C}5\text{-AMP}$ 、 $^{13}\text{C}5\text{-腺苷}$ 、 $^{15}\text{N}4\text{-肌苷}$ 、及 $^{13}\text{C}5\text{-次黃嘌呤}$ 。

【0058】 本發明亦提供本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽在療法中的用途。在一個實施例中，療法為癌症治療。在另一實施例中，該癌症為膀胱癌、乳癌、膽管癌、結腸直腸癌、結腸癌、胃癌、膽囊癌、神經膠母細胞瘤、頭頸癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、神經管母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌或腎癌。在一個實施例中，乳癌為三陰性乳癌。在另一實施例中，肺癌為非小細胞肺癌。在一個較佳實施例中，化

合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮。

【0059】 本發明亦提供本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽用於製造用於治療癌症之藥物的用途。在一個實施例中，該癌症為膀胱癌、乳癌、膽管癌、結腸直腸癌、結腸癌、胃癌、膽囊癌、神經膠母細胞瘤、頭頸癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、神經管母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌或腎癌。在一個實施例中，乳癌為三陰性乳癌。在另一實施例中，肺癌為非小細胞肺癌。在一個較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮。

【0060】 在一個實施例中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含與一或多種抗腫瘤劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。抗腫瘤劑之非限制性實例包括雷莫蘆單抗(ramucirumab)、萊西單抗(necitumumab)、奧拉單抗(olaratumab)、吉西他濱(gemcitabine)、培美曲塞(pemetrexed)、高倫替布(galunisertib)、阿貝馬昔布(abemaciclib)、吉非替尼(gefitinib)、維羅非尼(vemurafenib)、達拉非尼(dabrafenib)、曲美替尼(trametinib)、順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、達卡巴嗪(dacarbazine)、脂質多柔比星(doxorubicin)、多西他賽(docetaxel)、環磷醯胺(cyclophosphamide)及多柔比星、溫諾平(navelbine)、艾瑞布林(eribulin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、可注射懸浮液之太平洋紫杉醇蛋白結合顆粒、伊沙匹隆(ixabepilone)、卡培他濱(capecitabine)、FOLFOX (甲醯四氫葉酸、氟脲嘧啶及奧沙利鉑(oxaliplatin))、FOLFIRI (甲醯四氫葉酸、氟脲嘧啶及伊立替康(irinotecan))、西妥昔單抗(cetuximab)、EGFR抑制劑、Raf抑制

劑、B-Raf抑制劑、ERK抑制劑、CDK4/6抑制劑、吲哚胺2,3-雙加氧酶抑制劑、TGFβ抑制劑及TGFβ受體抑制劑。

【0061】 在另一實施例中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含與一或多種免疫腫瘤學藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，免疫腫瘤學藥劑為抗PD-1抗體、抗PD-L1抗體、抗CD137促效劑抗體或抗CTLA4抗體。免疫腫瘤學藥劑之非限制性實例包括納武單抗(nivolumab)、伊派利單抗(ipilimumab)、皮立珠單抗(pidilizumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)、曲美木單抗(tremelimumab)、烏瑞魯單抗(urelumab)、利瑞路單抗(lirilumab)、阿特珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)及抗PD-L1抗體LY3300054 (分別於WO 2017/034916及US 2017/0058033中闡述為SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 11之重鏈及輕鏈序列)。在一個較佳實施例中，免疫腫瘤學藥劑為抗PD-1抗體。在另一較佳實施例中，免疫腫瘤學藥劑為抗PD-L1抗體。在另一較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，且免疫腫瘤學藥劑為LY3300054。

【0062】 在一個實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌之方法，其包含與另一種藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，另一種藥劑為奧希替尼(osimertinib)、西妥昔單抗或阿貝馬昔布。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為奧希替尼。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為西妥昔單抗。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為阿貝馬昔布。

【0063】 在另一實施例中，本發明提供一種治療黑素瘤之方法，其

包含與另一種藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，另一種藥劑為BRAF抑制劑、抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為BRAF抑制劑。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為抗PD-1抗體。在另一較佳實施例中，另一種藥劑為抗PD-L1抗體。在另一較佳實施例中，抗PD-L1抗體為LY3300054。在另一較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，且另一種藥劑為抗PD-L1抗體LY3300054。

【0064】 在另一實施例中，本發明提供一種治療結腸直腸癌之方法，其包含與另一種藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，另一種藥劑為阿貝馬昔布。在另一較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，且另一種藥劑為阿貝馬昔布。

【0065】 在另一實施例中，本發明提供一種治療胰臟癌之方法，其包含與另一種藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，另一種藥劑為阿貝馬昔布。在另一較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，且另一種藥劑為阿貝馬昔布。

【0066】 在另一實施例中，本發明提供一種治療三陰性乳癌之方法，其包含與另一種藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一個較佳實施例中，化合物為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮。

【0067】 本發明亦提供一種抑制患者體內之CD73酶活性的方法，其包含向有需要之患者投與有效量的式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。本發明亦提供一種抑制AMP在患者體內轉化為腺苷之方法，其包含向有需要之患者投與有效量的式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0068】 在另一實施例中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含與一或多種調節腺苷之藥劑組合同時、分開或依序投與有效量的本文中 之式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽。調節腺苷之藥劑之非限制性實例包括抗CD73抗體及腺苷受體拮抗劑。

【0069】 本發明亦提供一種醫藥組合物，其包含式I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。本發明進一步提供一種用於製備醫藥組合物之方法，其包含摻合式I化合物或其醫藥學上可接受之鹽與一或多種醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。本發明亦涵蓋合成式I化合物之新穎中間產物及方法。

【實施方式】

【0070】 本申請案根據35 U.S.C. §119(e)規定主張2018年3月1日申請之美國臨時申請案第62/636,978號及2018年12月5日申請之美國臨時申請案第62/775,553號之權益；該等申請案之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0071】 如上文使用且貫穿本發明之描述，除非另有指示，否則以下術語應理解為具有如下含義：

【0072】 「醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑」為此項技術中大體上認可之用於將生物活性劑遞送至哺乳動物(例如，人類)的介質。

【0073】 術語「治療(treatment/treat/treating)」及其類似者意欲包

括減緩或逆轉病症之進展。此等術語亦包括緩解、改善、衰減、消除或減輕病症或病況之一或多個症狀(即使病症或病況未實際上消除及即使病症或病況之進展本身未減緩或逆轉)。

【0074】 「有效量」意謂將引發治療臨床醫師對患者之生物學或醫學反應或所期望治療效果的本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽或含有本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的醫藥組合物的量。在一個實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽在活體外或離體CD73酶分析抑制AMP轉化為腺苷。在另一實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽在來自經不同劑量之化合物治療之動物的小鼠全血抑制AMP轉化為腺苷。

【0075】 「偕-二氟」係指鍵結至同一碳之兩個氟原子。

【0076】 「偕-二甲基」係指鍵結至同一碳之兩個甲基。

【0077】 如本文中所使用，術語「患者」係指人類。

【0078】 有效量可易於由作為熟習此項技術者之主治診斷醫師藉由使用已知技術且藉由觀察在類似情況下得到之結果來測定。在測定用於患者之有效量時，主治診斷醫師考慮多個因素，包括但不限於：患者之物種；其體型、年齡及一般健康狀況；所涉及之特定疾病或病症；涉及程度或疾病或病症之嚴重程度；個別患者之反應；所投與之特定化合物；投與模式；所投與之製劑之生物可用性特徵；所選擇之劑量方案；伴隨藥療之使用；及其他相關情況。

【0079】 本發明化合物可在廣泛劑量範圍內使用。舉例而言，每日劑量通常在約0.01至約50 mg/kg體重之範圍內。

【0080】 本發明化合物較佳調配為藉由使得化合物具有生物可用性

之任何途徑投與的醫藥組合物，該途徑包括經口、靜脈內及經皮途徑。最佳地，此類組合物用於經口投與。此類醫藥組合物及其製備方法為此項技術中所熟知的。參見例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy編，第21版，Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)。

【0081】 熟習此項技術者應理解，本發明化合物能夠形成鹽。本發明化合物含有鹼性雜環，且因此與多種無機酸及有機酸中之任一者反應，以形成醫藥學上可接受之酸加成鹽。此類醫藥學上可接受之酸加成鹽及其常見製備方法為此項技術中所熟知的。參見例如，P. Stahl等人，PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008)。

【0082】 「一或多種醫藥學上可接受之鹽」係指相對無毒的無機鹽及有機鹽或本發明化合物之鹽(S.M. Berge等人，「Pharmaceutical Salts」, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 第66卷, 第1期, 1977年1月)。

【0083】 化合物名中「異構體1」之名稱表示，當一對對映異構體之混合物在下文「製備及實例」中所描述的條件下藉由對掌性層析分離時，本發明對應中間產物或化合物為兩個溶離對映異構體中之第一個。化合物名中「異構體2」之名稱表示，當一對對映異構體之混合物在下文「製備及實例」中所描述的條件下藉由對掌性層析分離時，本發明對應中間產物或化合物為兩個溶離對映異構體中之第二個。

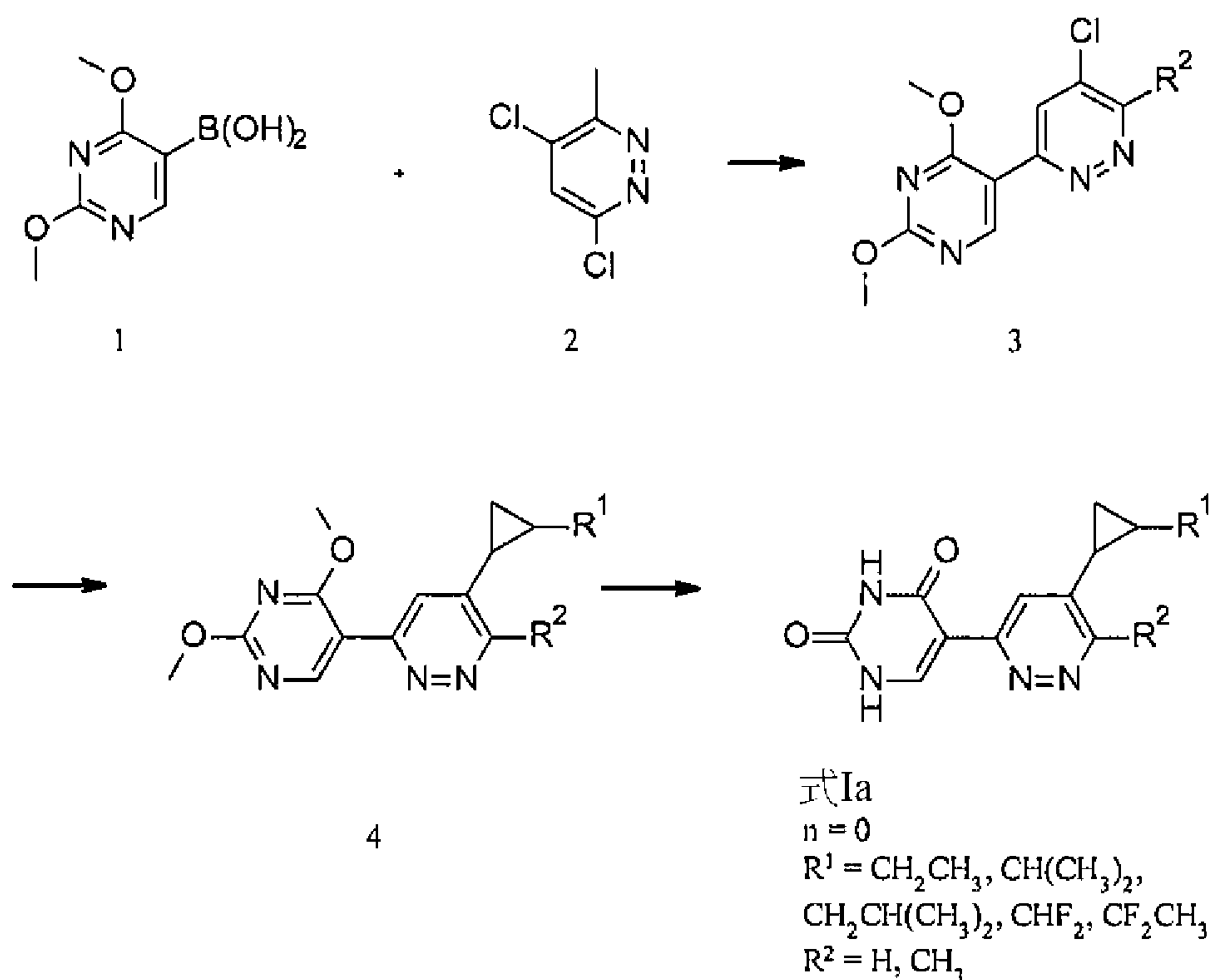
【0084】 可根據此項技術中熟知且瞭解之合成方法來製備本發明化合物。此等反應步驟之適合反應條件係此項技術中熟知的，且合適的替代

溶劑及輔試劑係在技術領域內。熟習此項技術者亦應瞭解，藉由熟知技術視需要或期望可分離及/或純化合成中間產物(且此舉頻繁)，在後續合成步驟中直接使用具有少量或不純化之各種中間產物係有可能的。此外，熟習此項技術者將瞭解，在某些情況下所介紹之部分次序並非至關重要的。如熟練的化學家所充分理解，產生本發明化合物所必需之具體步驟順序取決於具體的合成複合物、起始複合物及經取代部分的相對不利條件。所有取代物(除非另有指示)係皆如先前所定義且所有反應劑皆為此項技術中所熟知及理解。

【0085】 如本文中所使用，以下術語具有指示以下之含義：
「ACN」係指乙腈；「DAST」係指三氟化二乙基胺基硫；「DCM」係指二氯甲烷；「DMAP」係指4-二甲胺基吡啶；「dmsO」或「DMSO」係指二甲亞砜；「ee」係指對映異構體過量；「ES/MS」係指電噴質譜分析；「EtOAc」係指乙酸乙酯；「Et₂O」係指乙醚；「FBS」係指胎牛血清；「GC-MS」係指氣相層析-質譜分析；「HBSS」係指漢克氏平衡鹽溶液(Hank's Balanced Salt Solution)；「IC₅₀」係指半數最大抑制濃度；「LAH」係指氫化鋰鋁；「LC-ES/MS」係指液相層析電噴質譜分析；「MS」係指質譜分析；「MeOH」係指甲醇；「MTBE」係指甲基第三丁基醚；「nBuLi」係指正丁基鋰；「nm」係指奈米；「NMR」係指核磁共振；「OAc」係指乙酸酯；「psi」係指磅/平方吋；「RT」係指室溫或環境溫度；「SCX」係指Strong Cation Exchange；「SFC」係指超臨界流體層析；「S_NAr」係指親核芳族取代；「TEA」係指三乙胺；「THF」係指四氫呋喃；「t_R」係指滯留時間；且「w/w」係指溶液中之重量/重量比例。

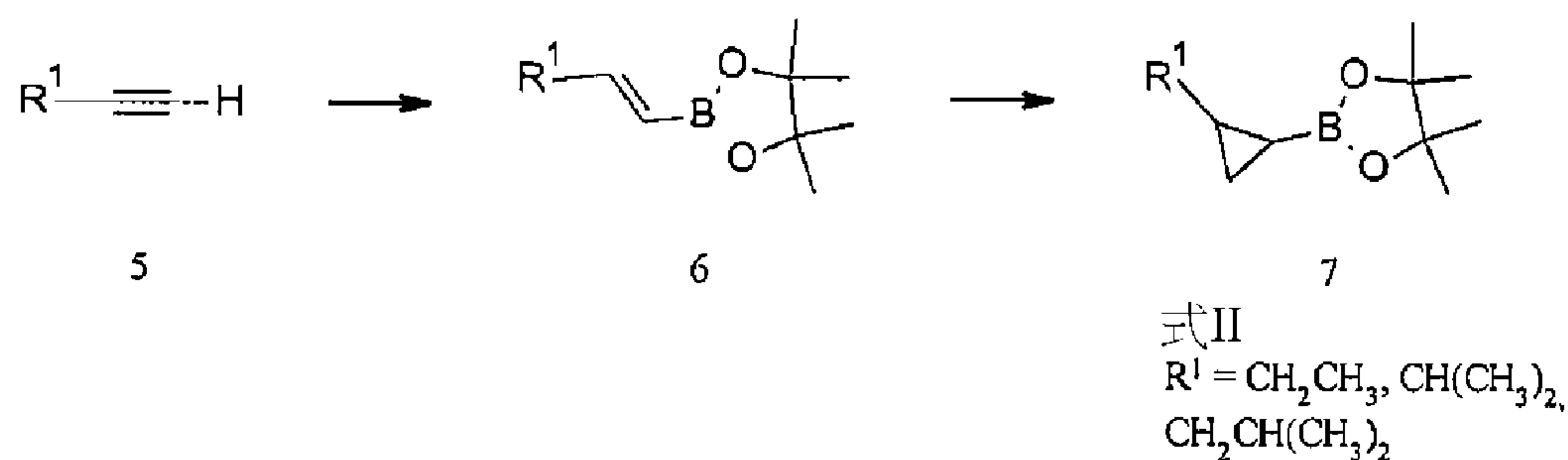
【0086】 本發明化合物可如以下流程所說明來合成。

流程1



【0087】 流程1描繪式Ia之化合物之製備。使用熟知的Suzuki類型條件，市售(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)硼酸1可偶合至4,6-二氯-3-甲基-噁嗪。可實現3的氯部分與經適當取代之反式環丙基硼酸酯的後續Suzuki偶合以獲得4。熟習此項技術者將認識到化合物4之對映異構體可使用此項技術中所熟知的對掌性分離技術來分離。可藉由去保護4中之甲氧基在此項技術中充分描述之一系列去甲基化條件下來製備式Ia之化合物。

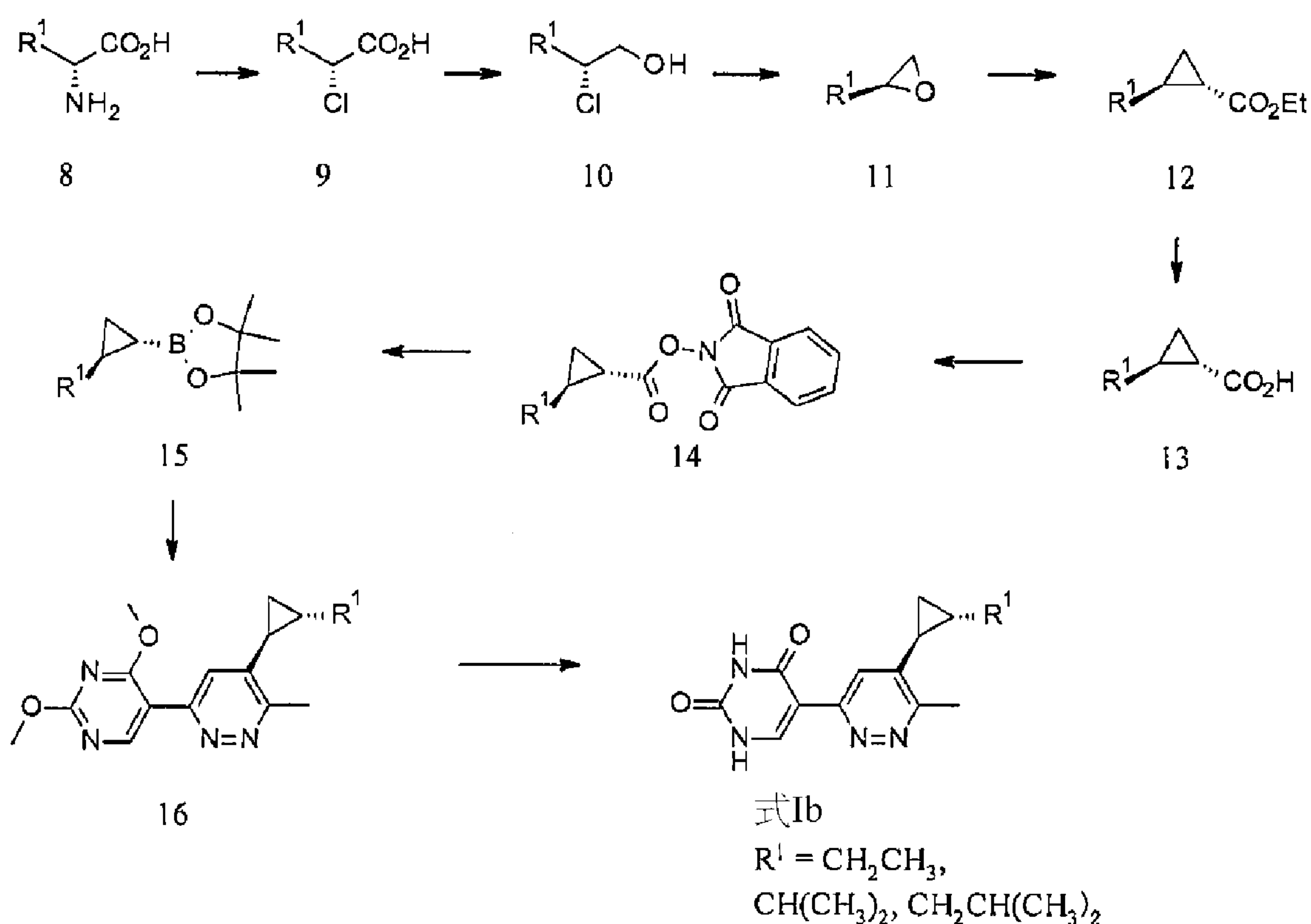
流程2



【0088】 流程2描繪製備式II化合物所需的必備環丙基硼酸酯。熟習

此項技術者將認識到可在一系列條件下，尤其在存在諸如Cu或Zr之過渡金屬催化劑的情況下實現經適當取代之炔烴5之硼氫化，以獲得硼酸烯酯6。硼酸烯酯可在此項技術中所熟知的穩定類碳烯型條件下環丙烷化，諸如西蒙斯-史密斯環丙烷化(Simmons-Smith cyclopropanation)、科里-柴可夫斯基反應(Corey-Chaykovsky reaction)及用具有(例如，Cu、Pd或Ni)及不具有(例如，熱或光化學)過渡金屬催化劑的重氮甲烷(或重氮化合物)進行環丙烷化之方法，以獲得經適當取代之反式-環丙基硼酸酯7。熟習此項技術者將認識到熱力學上有利的環丙烷化產物將為反式對映異構體於7中之混合物。

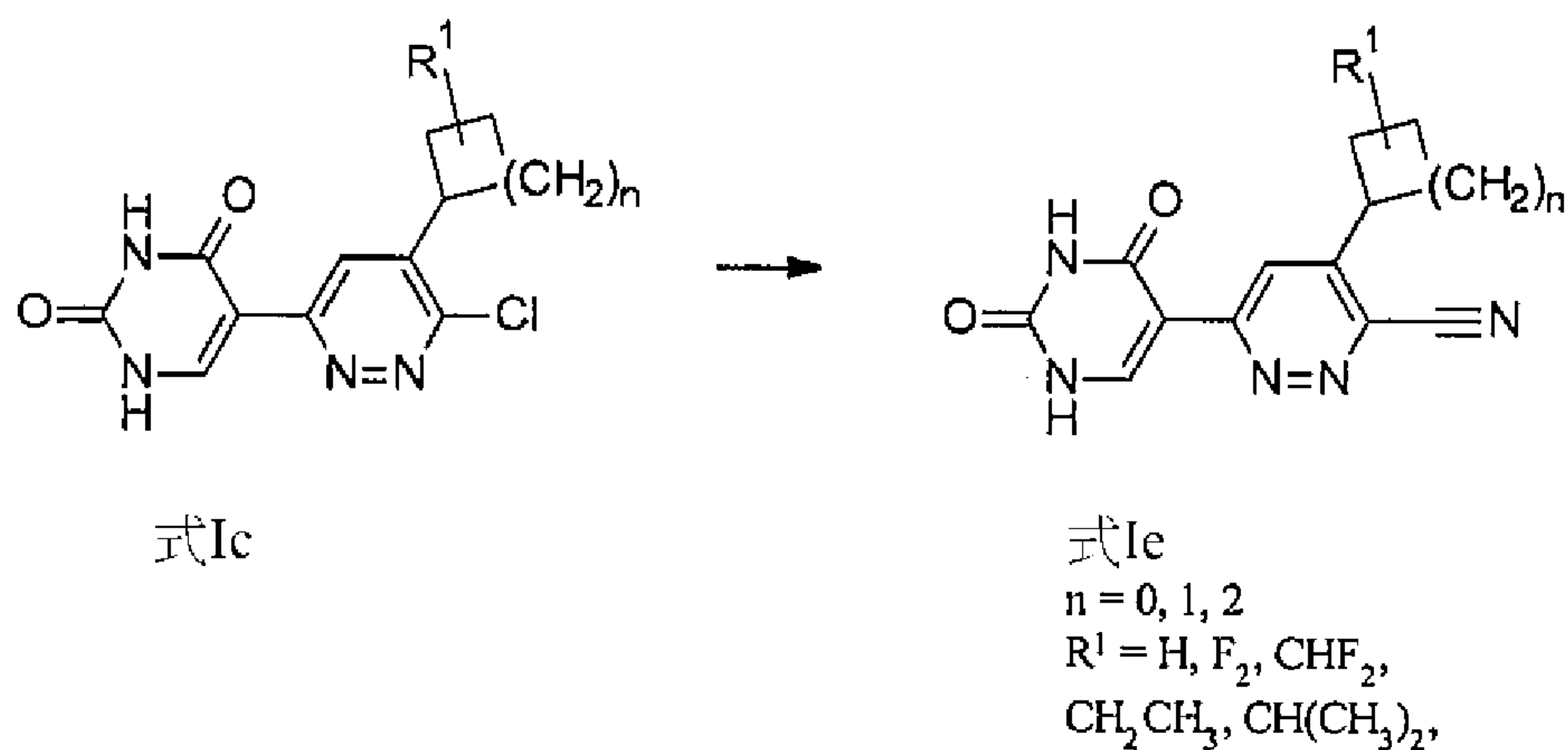
流程3



【0089】 流程3描繪式Ib化合物之對掌性合成。經適當取代之胺基酸8在經修改山德邁耳條件(基團 S_NAr)下重氮化以得到9為此項技術中所熟知。可利用此項技術中所熟知的一系列還原劑(包括氫化鋁及二硼烷作為

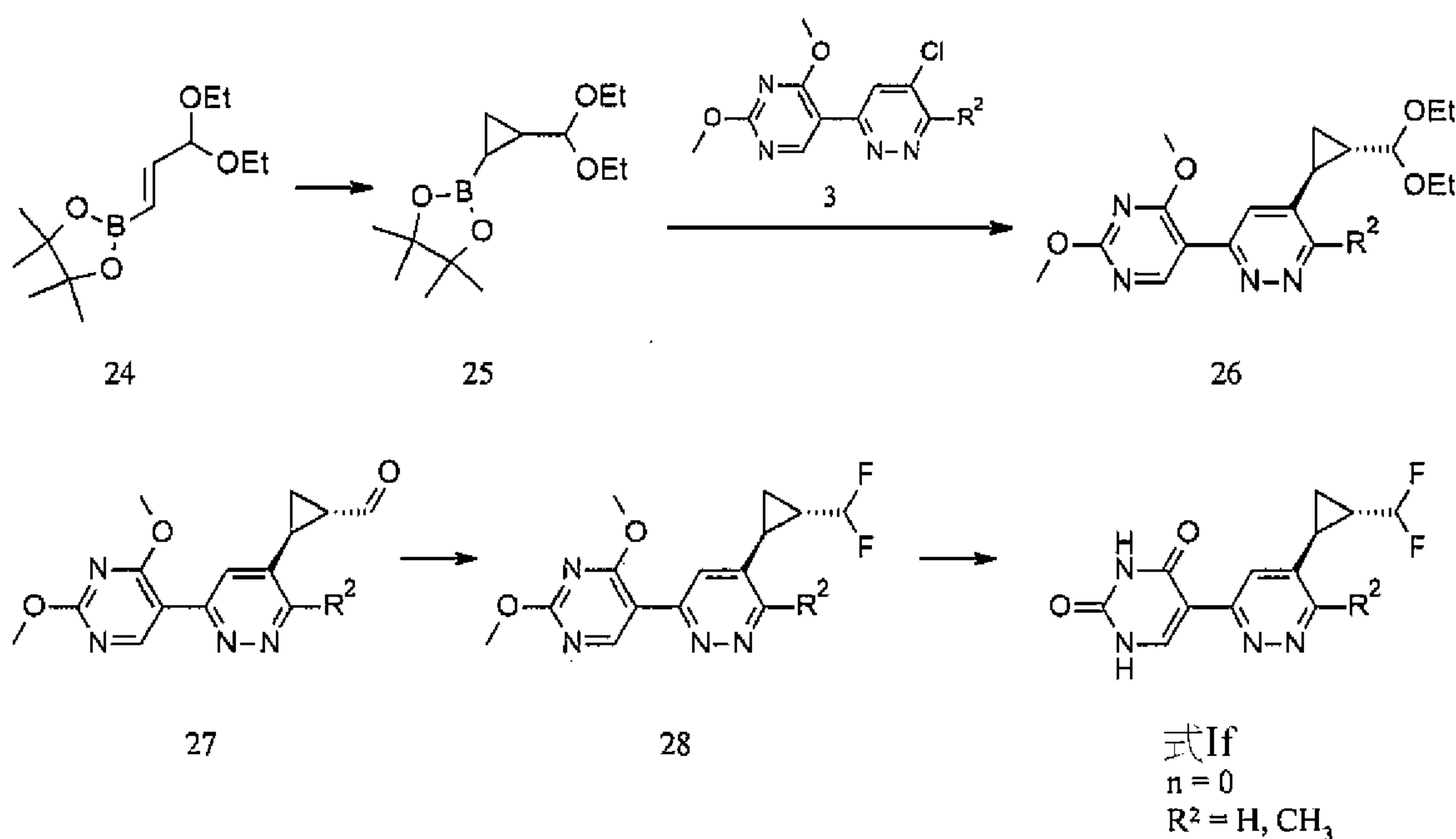
還原劑)實現至醇10的後續還原。在此項技術中充分描述對掌性環氧化物11在鹼性條件下之環化。可藉由用適合膦酸酯(例如，2-二乙氧基膦醯基乙酸乙酯或2-三乙基膦醯基乙酸乙酯)及適合鹼基(例如，烷基鋰、金屬醇鹽或金屬氫化物)處理對掌性環氧化物11來使用立體選擇性霍納-沃茲沃茨-埃蒙斯反應(Horner-Wadsworth-Emmons reaction)，以獲得反式-環丙烷衍生物12 (參見例如，L. Delhaye; A. Merschaert; P. Delbeke; W. Brione. *Org. Proc. Res. & Dev.* **2007**, *11*, 689-692)。可在此項技術中充分描述之各種鹼性條件下實現化合物12至對應酸13之水解。在此項技術中充分描述了利用適合酸活化劑(例如，羰基二咪唑)在存在溫和而非親核鹼的情況下用經適當取代之N-羥基鄰苯二甲醯亞胺進行之酸13的後續偶合，以製備化合物14。可在此項技術中已知之許多條件下，包括在存在過渡金屬催化劑(例如，鈴木-宮浦反應(Suzuki-Miyaura reaction))的情況下，在光解條件下，或藉由單電子轉移反應完成N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯14之去羧硼醯化，包括例如N-羥基鄰苯二甲醯亞胺酯與二硼在由吡啶-硼自由基促進之自由基偶合中的錯合，以獲得反式環丙烷硼酸酯15。(參見例如，W.-M. Cheng; S. Rui; B. Zhao; W.-L. Xing; Y. Fu. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4291-4294。)可與流程1中所描述之流程類似地進行硼酸酯15與芳基氯4之偶合及後續去甲基化，以獲得式Ib之對掌性化合物類型。

流程4



【0092】 流程6描繪式Ie化合物之合成。可在此項技術中已知之各種條件下，包括過渡金屬(例如，Pd、Cu、Rh)催化之反應實現式Ic之氰化，以提供式Ie化合物。

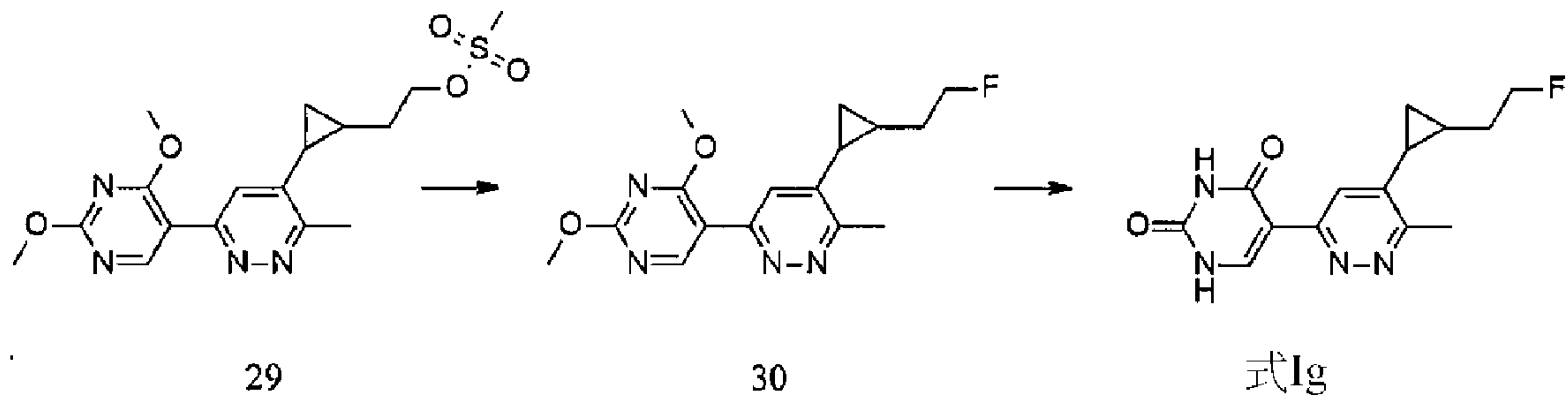
流程7



【0093】 流程7描繪If化合物之合成。硼酸烯酯可與流程2中所描述之流程類似地環丙烷化。可與流程1中所描述之流程類似地進行硼酸酯25與芳基氯3之偶合以獲得對掌性化合物26。可藉由用適合酸處理來實現將二乙醇縮乙醛26解蔽成醛27。用各種氟化試劑(例如，DAST、XtalFluor[®]、Fluolead[™]或Deoxo-Fluor[®])處理醛27可提供二氟甲基28。可

與流程1中所描述之流程類似地進行28之後續去甲基化以獲得式If之化合物類型。

流程8



【0094】 流程8描繪Ig化合物之合成。可使用熟習此項技術者已知之取代技術用諸如氟化鉀或氟化第三丁基銨之試劑將甲磺酸酯29轉化為氟化物30。可與流程1中所描述之流程類似地進行後續去甲基化以獲得式Ig之對掌性化合物。

【0095】

製備及實例

以下製備及實例進一步說明本發明且表示本發明化合物之典型合成，但不應理解為以任何方式限制本發明之範疇。試劑及起始材料易於利用或可易於由一般熟習此項技術者合成。應理解，製備及實例以說明而非限制之方式闡述，且一般熟習此項技術者可進行各種修改。

【0096】 在Agilent HP1100液相層析系統上進行LC-ES/MS。在介接至HP1100 HPLC之質量選擇性偵測器四極質譜儀上進行電噴質譜分析量測(在正及/或負模式中獲得)。LC-MS條件(低pH)：管柱：PHENOMENEX[®] GEMINI[®] NX C-18 2.1 × 50 mm 3.0 μm；梯度：5%-100% B，3分鐘，接著100% B，0.75分鐘；管柱溫度：50°C +/- 10°C；流動速率：1.2 mL/min；溶劑A：具有0.1% HCOOH之去離子水；溶劑

B：具有0.1%甲酸之ACN；波長214 nm。替代LC-MS條件(高pH)：管柱：WATERS™ XTERRA® MSC-18管柱2.1 × 50 mm，3.5 μm；梯度：5% 溶劑A，0.25分鐘，5%至100%溶劑B，3分鐘及100%溶劑B，0.5分鐘或10%至100%溶劑B，3分鐘及100%溶劑B，0.75分鐘之梯度；管柱溫度：50°C +/- 10°C；流動速率：1.2 mL/min；溶劑A：10 mM NH₄HCO₃ pH 9；溶劑B：ACN；波長：214 nm。

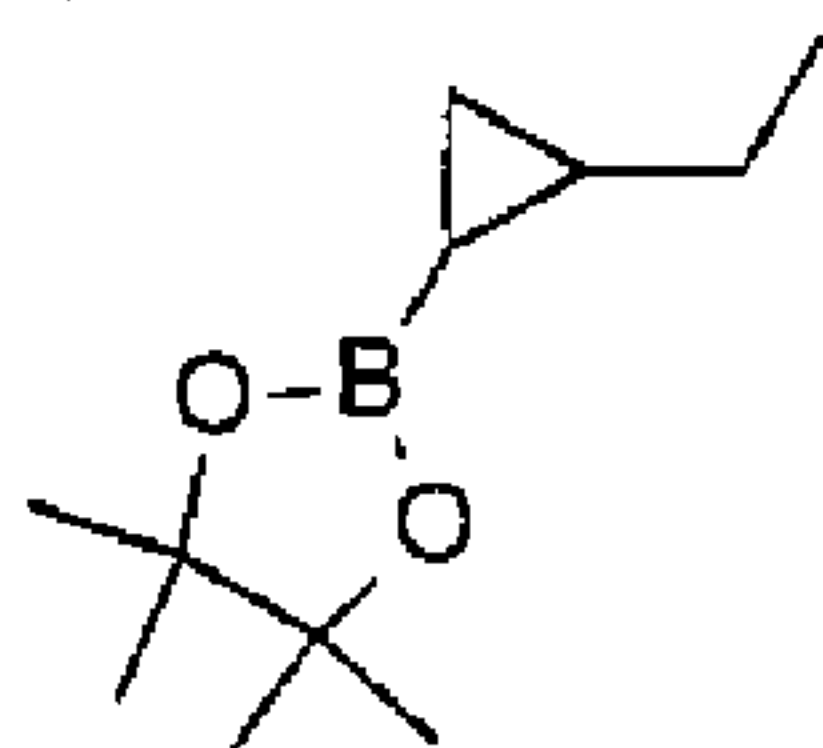
【0097】製備型逆相層析在配備有質量選擇性偵測器質譜儀及Leap自動進樣器/溶離份收集器之Agilent 1200 LC-ES/MS上進行。高pH方法在具有10 × 20 mm保護件之75 × 30 mm PHENOMENEX® GEMINI®-NX，5 μm粒徑管柱上執行。流動速率為85 mL/min。溶離劑為含10 mM碳酸氫銨(pH 10)之ACN。

【0098】NMR光譜在Bruker AVIII HD 400 MHz NMR質譜儀上進行，使用殘餘溶劑[CDCl₃，7.26 ppm；(CD₃)₂SO，2.50 ppm]作為參考標準，獲得如以ppm為單位報導之CDCl₃或(CD₃)₂SO溶液。當報告峰多峰性時，可使用以下縮寫：s (單峰)、d (雙重峰)、t (三重峰)、q (四重峰)、m (多重峰)、br-s (寬單峰)、dd (雙重峰之雙重峰)、dt (三重峰之雙重峰)。在報導時，偶合常數(J)以赫茲(Hz)為單位報導。

【0099】

製備1

外消旋-反-2-(2-乙基環丙基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷



向2-[(E)-丁-1-烯基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(1.65

g, 9.06 mmol)於Et₂O (45.30 mL)中之溶液中添加Pd(OAc)₂ (0.20 g, 0.90 mmol)。音波處理5分鐘且冷卻至-5°C。

【0100】 在250 mL錐形瓶中，添加40% KOH水溶液(162 mL)，隨後添加Et₂O (245 mL)。在冰/飽和NaCl水浴中將雙相混合物冷卻至-5°C。歷經10分鐘逐份添加N-亞硝基-N-甲基脲(36.1 g, 350 mmol)。攪拌15分鐘且置放於乾冰/丙酮浴中。將醚層傾析至量筒中且在-5°C將Et₂O混合物(71 mL, 約10當量CH₂N₂)添加至上文所描述之溶液中。2小時後，經由矽藻土過濾反應內容物，經MgSO₄乾燥，且在真空中濃縮，獲得標題化合物(1.08 g, 58%)。¹H NMR (d₆-DMSO) δ: -0.51 (dt, J = 9.3, 5.7 Hz, 1H), 0.33-0.37 (m, 1H), 0.50-0.54 (m, 1H), 0.76-0.84 (m, 1H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.14 (s, 12H), 1.21-1.30 (m, 2H)。

【0101】

製備1之替代程序

向在氮下於0°C冷卻之雙(五甲基環戊二烯基)二氯化鋯(11.1 g, 25.5 mmol)於THF (3.4 L)中之溶液中添加三乙基硼氫化鋰於THF中之1 M溶液(41.3 mL, 41.3 mmol)。升溫至RT且攪拌1小時，同時用鋁箔保護燒瓶避光。

【0102】 在氮下在-78°C冷卻的另一燒瓶中，冷凝1-丁-1-炔(50.6 g, 936 mmol)且添加頻哪醇硼烷(pinacolborane) (55.0 g, 425 mmol)。在-78°C攪拌所得混合物30分鐘且經由套管添加第一個燒瓶之內容物。添加TEA (5.93 mL, 42.6 mmol)且攪拌反應混合物，同時升溫至RT歷20小時。藉由經由套管添加冰/水混合物(1.5 L)淬滅反應，添加EtOAc (300 mL)，且在RT攪拌30分鐘。分離所得層並用EtOAc (2 × 200 mL)再萃取

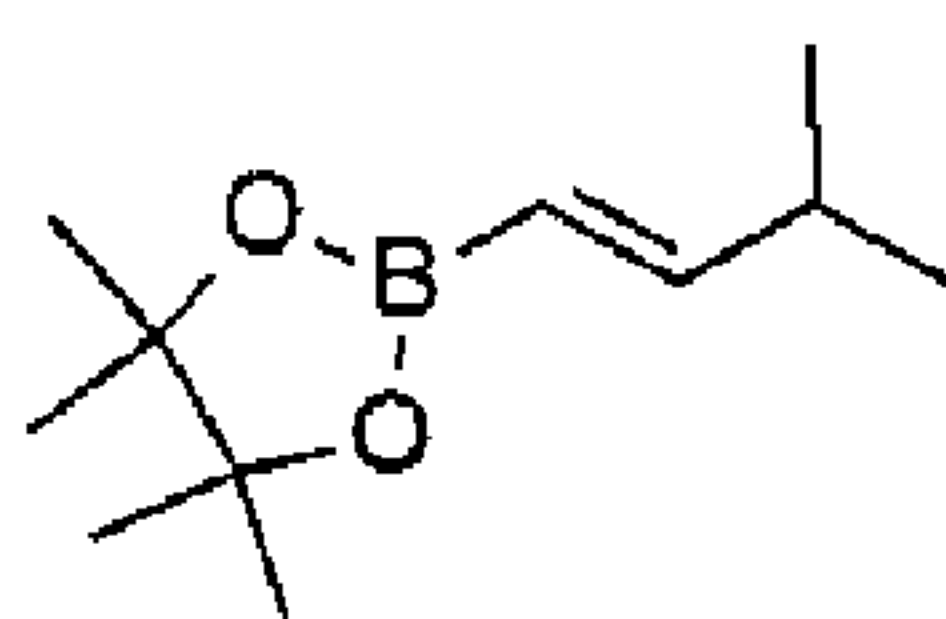
水相。合併有機萃取物，用 Na_2SO_4 乾燥，過濾，且在真空中濃縮，得到呈黃色油狀之2-[(E)-丁-1-烯基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(53 g, 65%)。GC-MS (m/z): 182 (M+)。

【0103】 在 -20°C 歷經10分鐘將二乙基鋅於甲苯中之溶液(15% w/w, 550 mL, 611 mmol)添加至氯碘甲烷(55 mL, 755 mmol)中，且攪拌35分鐘。歷經20分鐘逐滴添加2-[(E)-丁-1-烯基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(53 g, 277 mmol)於甲苯(100 mL)中之溶液，同時將反應之內部溫度保持於 -20°C 。攪拌混合物2小時同時升溫至 0°C 。藉由緩慢添飽和 NH_4Cl 水溶液(750 mL)淬滅反應。分離有機層且用EtOAc (2 × 250 mL)再萃取水相。合併有機萃取物，經 MgSO_4 乾燥，過濾，且蒸發，得到呈油狀之標題化合物(48 g, 84%)，適合不經額外純化即使用。GC-MS (m/z): 180 (M-16)。

【0104】

製備2

4,4,5,5-四甲基-2-[(E)-3-甲基丁-1-烯基]-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷



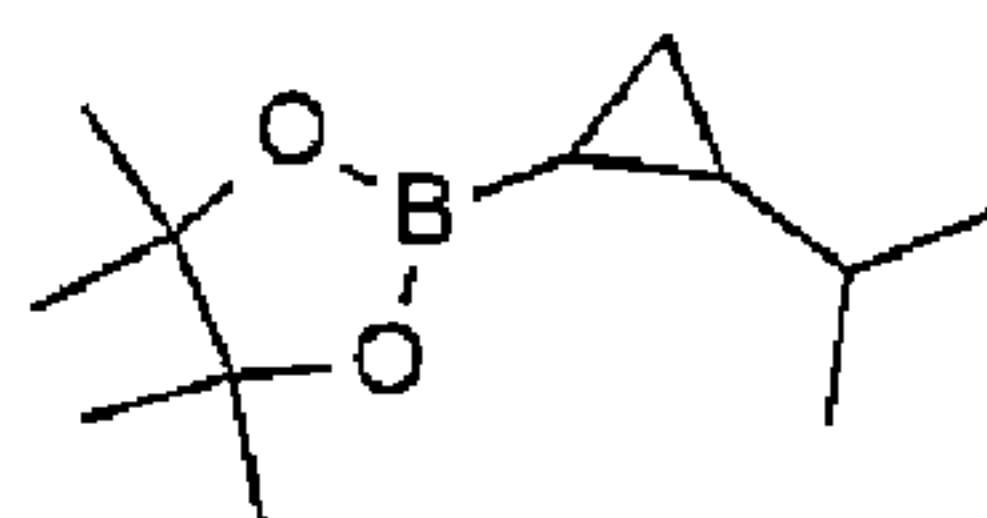
歷經5分鐘將頻哪醇硼烷(9.5 mL, 64 mmol)逐滴添加至冰冷的3-甲基丁-1-炔(4.91 g, 72.0 mmol)中。密封壓力容器，升溫至RT且攪拌18小時。添加氫氯化雙(環戊二烯基)鋯(IV) (2.0 g, 7.4 mmol)及TEA (1.1 mL, 7.9 mmol)。密封壓力容器，置放於 60°C 油浴中，且攪拌10分鐘。將所得紅色溶液冷卻至RT持續2.5小時。用DCM (200 mL)稀釋反應混合物，用飽和 NaHCO_3 水溶液(100 mL)、飽和 NaCl 水溶液(50 mL)洗滌，經

MgSO₄乾燥，經由矽膠墊(150 mL)過濾，用DCM (700 mL)沖洗矽膠，且在真空中濃縮以得到標題化合物(11.5 g, 82%)。ES/MS (m/z): 196 (M+H)。¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.03 (d, J= 6.7 Hz, 6H), 1.29 (s, 12H), 2.37 (m, 1H), 5.40 (dd, 1H), 6.64 (dd, 1H)。

【0105】

製備3

外消旋-反式-2-[2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷

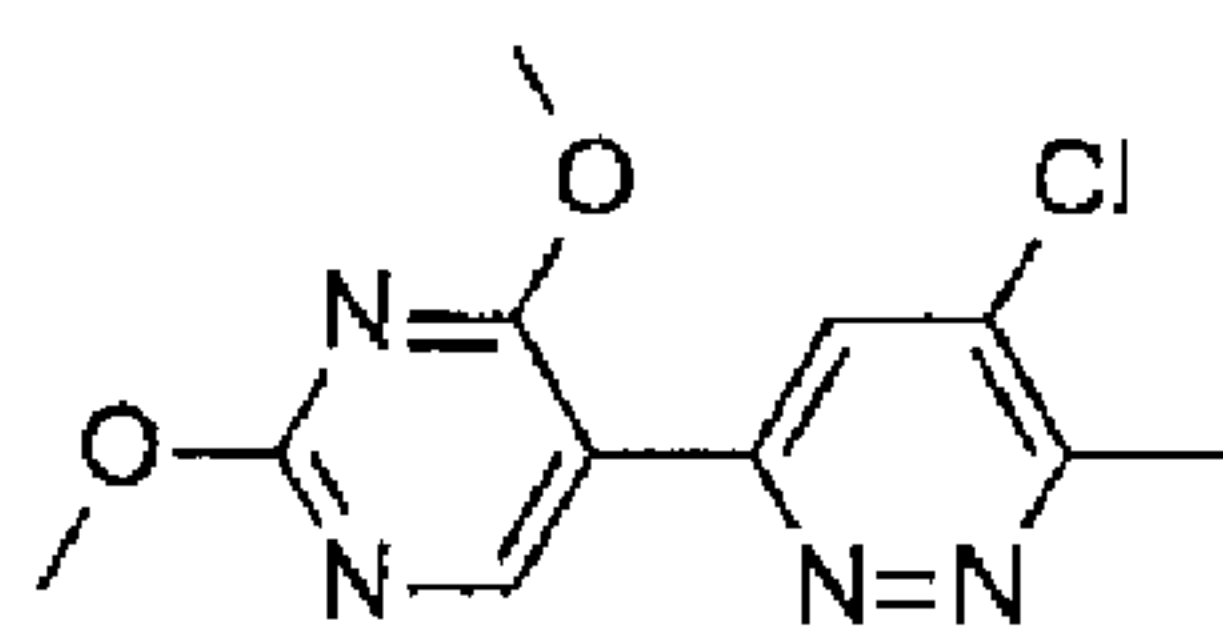


向將N-亞硝基-N-甲基脲逐份添加至Et₂O (70 mL)及KOH水溶液(30.5 g, 435 mmol, 70 mL H₂O)之冰冷雙相混合物中。攪拌直至固體溶解為止(< 5分鐘)。將所得重氮甲烷溶液吸取至快速攪拌之Pd(OAc)₂ (237 mg, 1.05 mmol)及4,4,5,5-四甲基-2-[(E)-3-甲基丁-1-烯基]-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(4.00 g, 20.4 mmol)於Et₂O (70 mL)中之冰冷懸浮液中。在完成添加之後，將反應混合物升溫至RT，經由矽藻土過濾，且在真空中濃縮濾液。將所得殘餘物溶解於DCM中，經由矽膠塞(25 g)過濾，且在真空中濃縮以獲得標題化合物(4.32 g, > 99%)。ES/MS (m/z): 210 (M+H)。¹H NMR (CDCl₃) δ: -0.35 (m, 1H), 0.45 (m, 1H), 0.65 (m, 1H), 0.78 (m, 1H), 0.98 (m, 7H), 1.23 (s, 12H)。

【0106】

製備4

4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪



在壓力瓶中，將2,4-二甲氧基-5-咪啶基硼酸(6.75 g, 36.7 mmol)、4,6-二氯-3-甲基-噻嗪(5.98 g, 36.7 mmol)、[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈣(II) (0.55 g, 0.73 mmol)、Cs₂CO₃ (29.9 g, 91.8 mmol)合併於1,4-二噁烷/H₂O之4:1混合物(151 mL)中。抽空空氣且用N₂回填。密封容器且在70°C下加熱3小時。經由矽藻土過濾殘餘物且用EtOAc沖洗。用水，隨後飽和NaCl水溶液洗滌有機混合物，經MgSO₄乾燥，且蒸乾。藉由層析經由矽膠，使用具有0-30% DCM/(33% MeOH/DCM)之梯度的330 g REDISEP[®]管柱歷經15分鐘以200毫升/分鐘之流動速率純化所得黑色殘餘物，以在蒸發層析溶離份之後得到標題化合物(6.2 g, 63%)。ES/MS (m/z) (³⁵Cl/³⁷Cl) 267/269 [M+1]⁺ H NMR (d₆-DMSO) δ: 2.74 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 4.03 (s, 3H), 8.20 (s, 1H), 8.87 (s, 1H)。

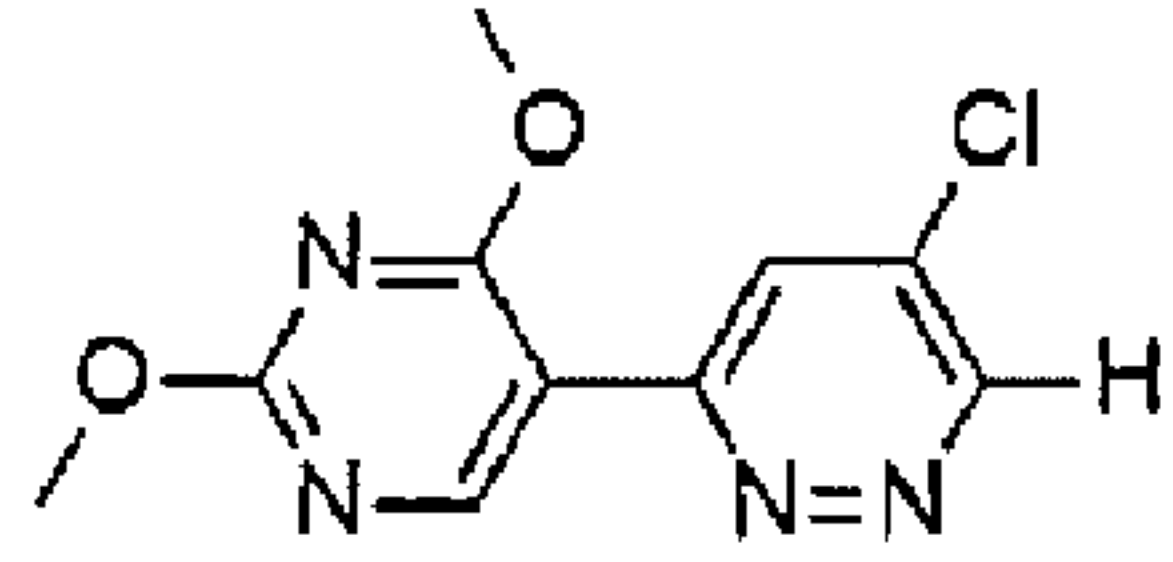
【0107】

製備4之替代程序

使氮氣流通過(2,4-二甲氧基咪啶-5-基)硼酸(85 g, 439 mmol)、4,6-二氯-3-甲基-噻嗪(75 g, 437 mmol)及Cs₂CO₃ (358 g, 1099 mmol)於1,4-二噁烷(1175 mL)及H₂O (340 mL)中之混合物5分鐘。添加[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈣(II) (6.6 g, 8.7 mmol)且在75°C下攪拌所得混合物16小時。冷卻反應至RT，經由矽藻土過濾混合物，且用EtOAc沖洗濾餅。分離所得層並用飽和NaCl水溶液洗滌有機相兩次，經MgSO₄乾燥，過濾，且在真空中濃縮。將水(500 mL)添加至所得殘餘物中，在RT下攪拌16小時，且過濾所得固體。用H₂O洗滌所收集固體且在真空中乾燥16小時

以獲得呈褐色固體狀之所要化合物(70 g, 54%)。ES/MS (m/z) ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 267/269 [M+1]⁺

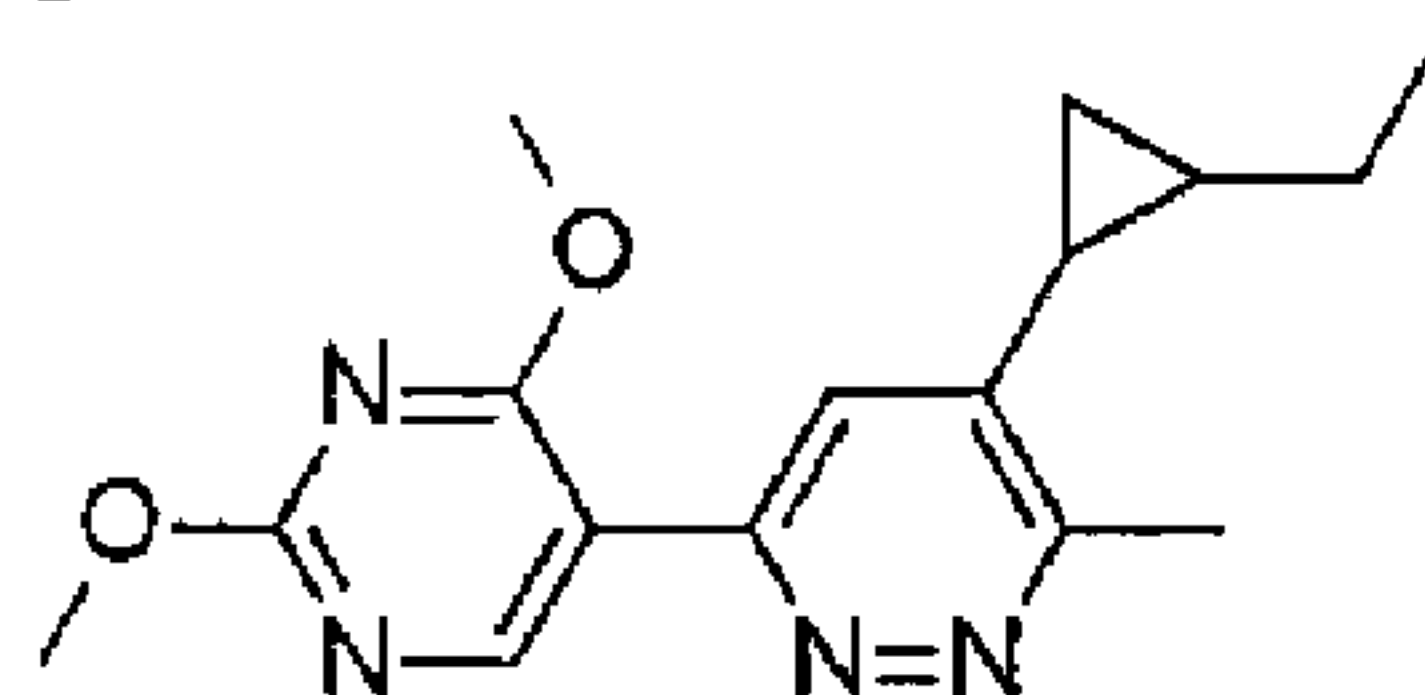
【0108】 以下實例可基本上如製備4中所描述來製備。

製備#	化學名稱	化學結構	ES/MS (m/z) ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$)
5	5-(5-氯噻嗪-3-基)-2,4-二甲氧基-嘓啶		253/255

【0109】

製備6

反式-5-[2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘓啶



在20 mL壓力瓶中，添加4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪(0.6 g, 2.0 mmol)、雙(二第三丁基(4-二甲胺基苯基)膦)二氯鈣(II) (114 mg, 0.16 mmol)、K₂CO₃ (0.69 g, 4.9 mmol)、H₂O (2.25 mL)及外消旋反式-2-[2-乙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(0.66 g, 3.37 mmol)。抽空燒瓶且用N₂回填。密封容器且在90°C下加熱隔夜。經由矽藻土過濾反應混合物，用水，隨後飽和NaCl水溶液洗滌有機層，經MgSO₄乾燥，且在真空中濃縮。藉由逆相層析，使用275 g REDISEP[®] Gold C18管柱純化所得殘餘物，歷經20分鐘以150毫升/分鐘之流動速率用30-50% 10mM NH₄HCO₃/ACN之梯度溶離，以在蒸發層析溶離份之後得到呈白色固體狀之標題化合物(異構體之基本上外消旋混合物) (475 mg, 70%)。

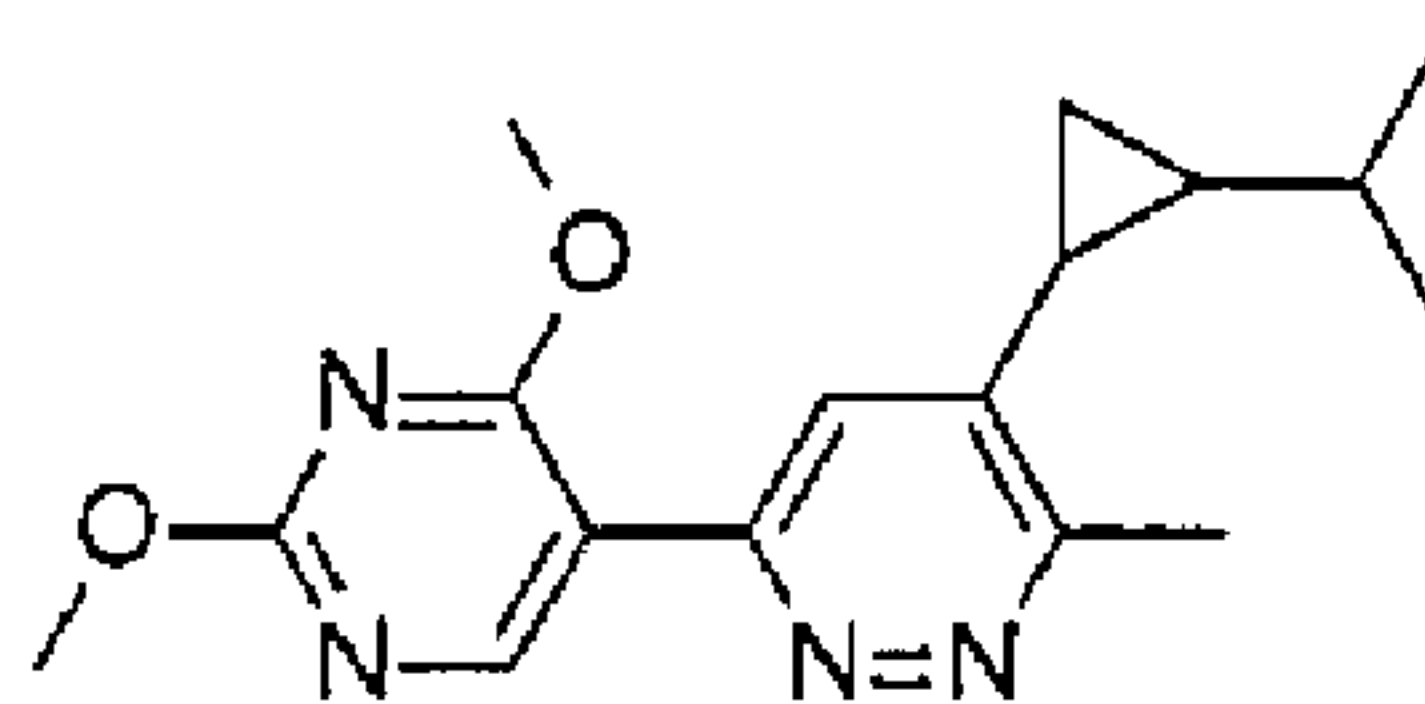
【0110】 藉由SFC對所得異構體進行純化(管柱：PHENOMENEX[®])

LUX[®]纖維素-4，4.6 × 150 mm；40% MeOH/CO₂等度；流動速率：5毫升/分鐘，UV 250 nm)以得到0.197 g異構體1：t_R = 2.71分鐘(UV)；及0.195 g異構體2：t_R 3.55分鐘(UV)，兩者均 > 98% ee。ES/MS (m/z): 301 (M+H)。

【0111】

製備7

反式-5-[2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘓啶



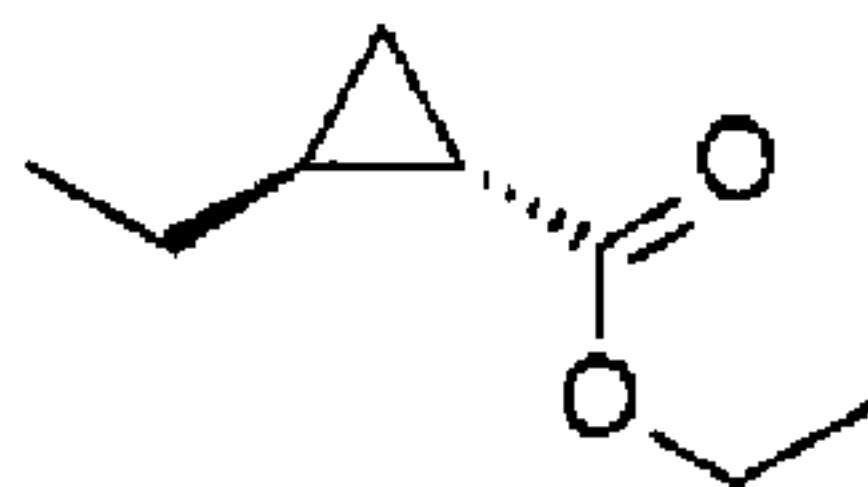
組合4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪(1.97 g，7.39 mmol)、外消旋-反式-2-[2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(3.32 g，15.8 mmol)、雙(二第三丁基(4-二甲胺基苯基)膦)二氯鈣(II) (1.35 g，1.85 mmol)、1,4-二噁烷(37 mL)及1 M Na₂CO₃水溶液(18 mL，18 mmol)。用N₂吹掃反應容器且加熱至90°C持續18小時。冷卻至RT，用EtOAc (150 mL)稀釋，且分離各層。用1 M Na₂CO₃水溶液、飽和NaCl水溶液連續洗滌有機層，經MgSO₄乾燥，過濾，且在真空中濃縮濾液。藉由二氧化矽層析純化所得殘餘物，用60-100% EtOAc/DCM之梯度溶離，以在蒸發層析溶離份之後得到呈異構體之基本上外消旋混合物形式之標題化合物(1.48 g，64%)。

【0112】藉由SFC對異構體進行純化(管柱：PHENOMENEX[®] LUX[®]纖維素-4，4.6 × 150 mm；40% MeOH/CO₂等度；流動速率：5 mL/分鐘，UV 250 nm)以得到647 mg異構體1：t_R = 2.56 min及647 mg異構體2：t_R = 3.75 min。ES/MS (m/z): 315 (M+H)。

【0113】

製備8

(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸乙酯

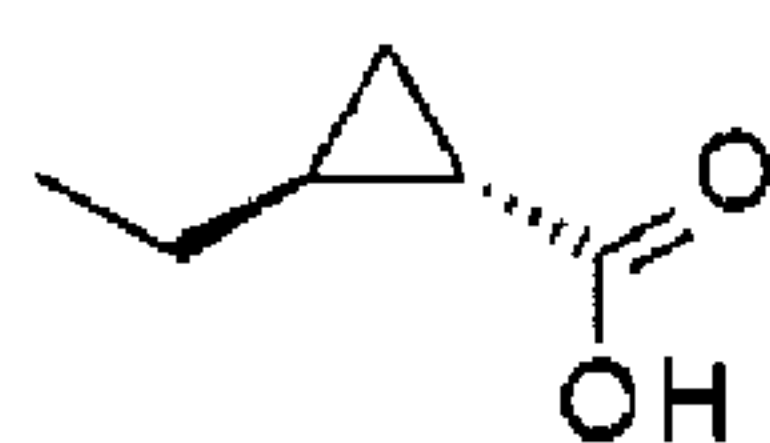


歷經10分鐘向在冰/水浴(內部溫度：8°C)中冷卻的2-二乙氧基磷醯基乙酸乙酯(62.2 g, 277 mmol)於1,4-二噁烷(400 mL)中之溶液逐滴添加nBuLi於己烷中之2.5 M溶液(110 mL, 280 mmol)。移除冷卻浴液且在RT下攪拌30分鐘。經由套管將溶液轉移至1 L壓力容器且添加(2R)-2-乙基環氧乙烷(20 g, 280 mmol)。在150°C (50 psi壓力)下攪拌所得混合物17小時。冷卻反應至RT且添加水(250 mL)。分離有機相且用MTBE (2 × 200 mL)再萃取水相。組合有機萃取物，用飽和NaCl水溶液(2 × 150 mL)洗滌，經MgSO₄乾燥，且在真空中濃縮，以得到適合於未經額外純化即使用的呈黃色油狀之粗標題化合物(49.1 g, 定量)。GC-MS (m/z): 142 (M⁺), 97 (M-45)。

【0114】

製備9

(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸



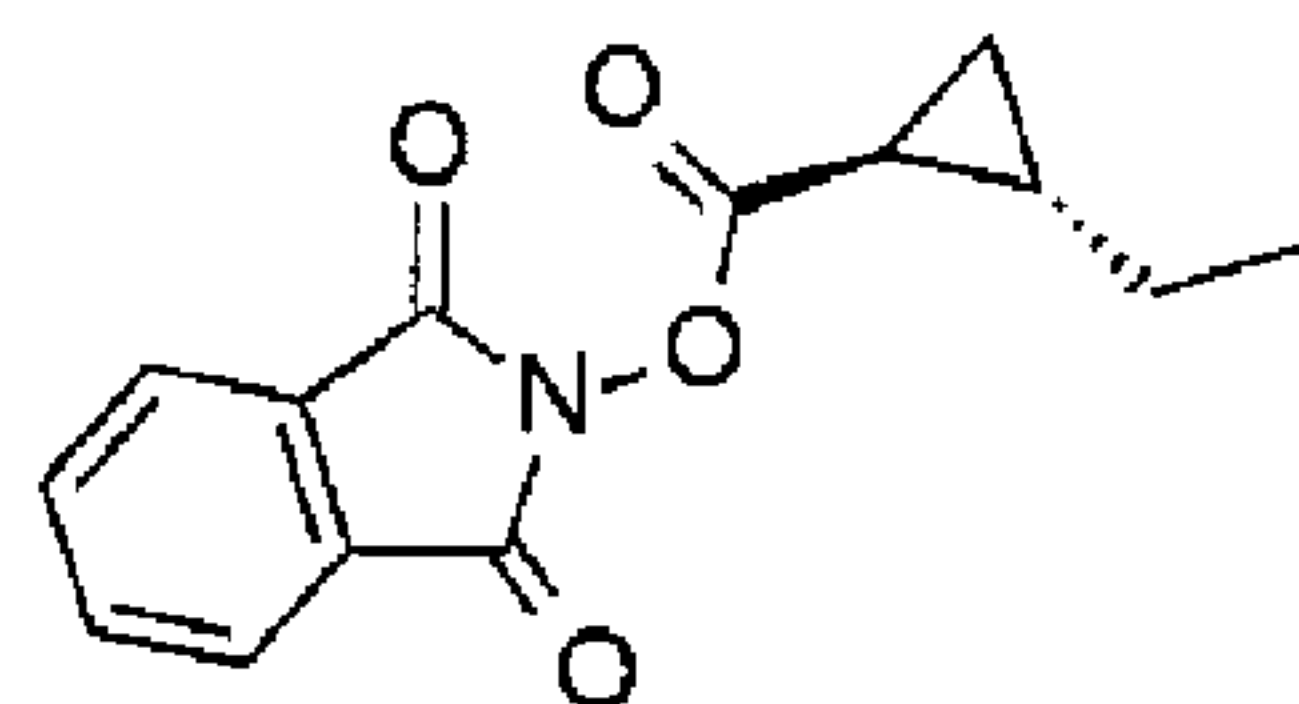
在100°C 下攪拌(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸乙酯(39.44 g, 277.4 mmol)、1,4-二噁烷(315 mL)及25%氫氧化鈉水溶液(315 mL)之混合物16小時。冷卻混合物至室溫，用MTBE (2 × 300 mL)萃取，且丟棄有機相。用37% HCl水溶液酸化水相直至pH約為1-2為止，用MTBE (3 × 300 mL)

萃取，分離各層，用飽和NaCl水溶液洗滌有機層，經MgSO₄乾燥，且在真空中濃縮以得到呈琥珀色油狀之標題化合物(25.1 g, 75%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.79-0.85 (m, 1H), 1.00 (t, J=7.5 Hz, 3H), 1.22-1.26 (m, 1H), 1.32-1.42 (m, 3 H), 1.43-1.48 (m, 1H), 9.0-12.0 (br-s, 1H)。

【0115】

製備10

(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基酯)

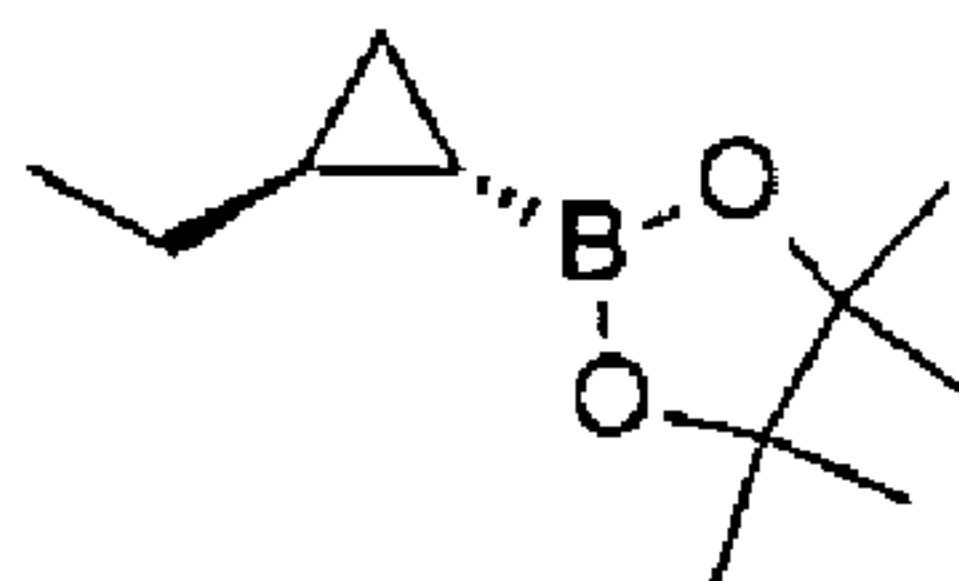


在0°C下攪拌(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(25.1 g, 209 mmol)、2-羥基異吲哚啉-1,3-二酮(34.8 g, 209 mmol)及DMAP (2.58 g, 20.9 mmol)於DCM (360 mL)中之懸浮液，且逐滴添加N,N'-二異丙基碳化二亞胺(29.3 g, 230 mmol)。移除冷卻浴液且在RT下攪拌反應物2小時。經由矽膠栓塞過濾懸浮液，用DCM溶離。蒸發溶劑且藉由層析經由矽膠純化所得殘餘物，用15%己烷/丙酮溶離，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈淡黃色固體狀之標題化合物(51.56 g, 84%)。ES/MS (m/z): 260 (M+1)。

【0116】

製備11

2-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷

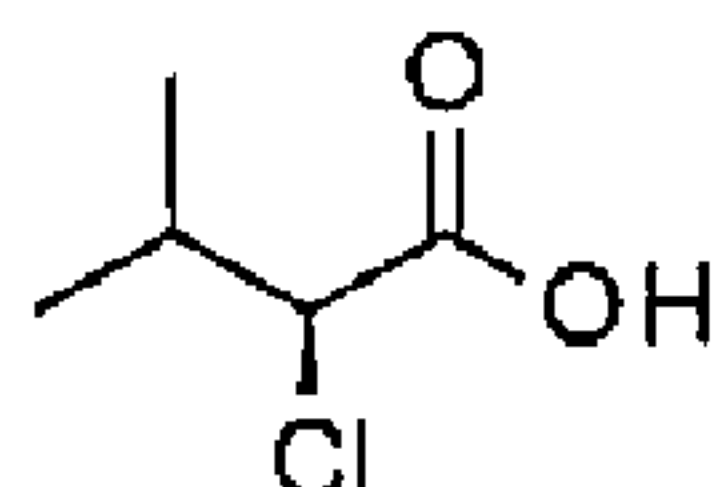


使N₂流通過(1S,2S)-2-乙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吲哚啉-2-基

酯) (51 g, 173.1 mmol)及雙(頻哪醇根基)二硼(87.9 g, 346 mmol)於 EtOAc (1 L)中之溶液5分鐘。添加異菸鹼酸乙酯(5.34 g, 35 mmol)且在 85°C 下攪拌混合物24小時。冷卻所得懸浮液，過濾且丟棄固體，並在減壓下濃縮棕色濾液。經由矽膠栓塞過濾所得粗殘餘物，用2% EtOAc/己烷溶離。自濾液移除溶劑且使用層析經由矽膠再純化所得殘餘物，用3% EtOAc/己烷溶離，以在自層析溶離份移除溶劑之後獲得呈無色油狀之標題化合物(17.1 g, 49%)。GC-MS (m/z): 180 (M-16)。

製備12

(2S)-2-氯-3-甲基-丁酸

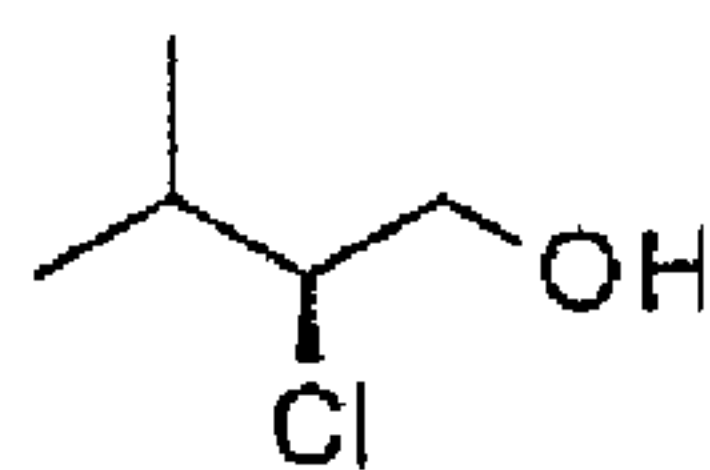


在0°C 下冷卻L-纈胺酸溶液(286 g, 2.44 mol)及5 M HCl水溶液(3.25 L, 16.3 mol)。歷經2小時逐滴添加4 M NaNO₂水溶液(1 L, 4 mol)，保持內部溫度低於5°C。攪拌反應物2小時同時升溫至RT，並在RT下攪拌額外16小時。歷經30分鐘逐份添加Na₂CO₃ (242 g, 2.28 mol)。用MTBE (3 × 1000 mL)萃取所得溶液，用飽和NaCl水溶液(500 mL)洗滌經合併之有機萃取物，經MgSO₄使有機萃取物乾燥，且在真空中濃縮。藉由真空蒸餾(15 mbar/140°C)純化所得殘餘物以得到呈油狀之標題化合物(248 g, 68%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.1 (dt, J=6.6, 2.6 Hz, 6H), 2.34-2.42 (m, 1H), 4.19-4.23 (m, 1H), 10.0-12.0 (br-s, 1H)。

【0117】

製備13

(2S)-2-氯-3-甲基-丁-1-醇

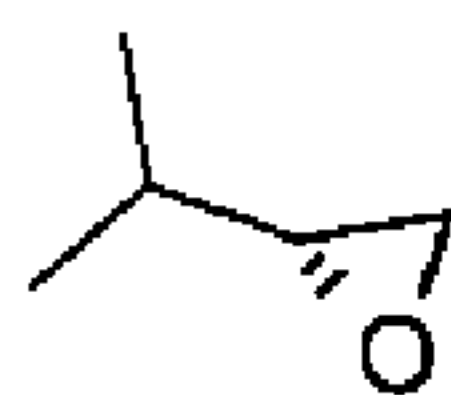


將(2S)-2-氯-3-甲基-丁酸(137 g, 1 mol)於2-甲基四氫呋喃(500 mL)中之溶液冷卻至0°C。歷經2.5小時逐滴添加LAH於甲基四氫呋喃(480 mL, 1.1 mol)中之2.3 M溶液，保持內部溫度低於10°C。升溫至RT且在RT下攪拌混合物1小時且在50°C下攪拌混合物1小時。冷卻反應至0°C且連續及緩慢地添加H₂O (1.48 mL)、15% NaOH水溶液(1.48 mL)及H₂O (4.46 mL)。使混合物升溫至RT，經由矽藻土之床層過濾，且在真空中蒸發溶劑以得到呈無色油狀之標題化合物(110 g, 81%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.97- 1.1 (m, 6H), 1.94-2.18 (m, 1H), 2.60-3.09 (br-s, 1H), 3.71-3.78 (m, 1H), 3.80-3.85 (m, 1H), 3.90-3.96 (m, 1H)。

【0118】

製備14

(2R)-2-異丙基環氧乙烷

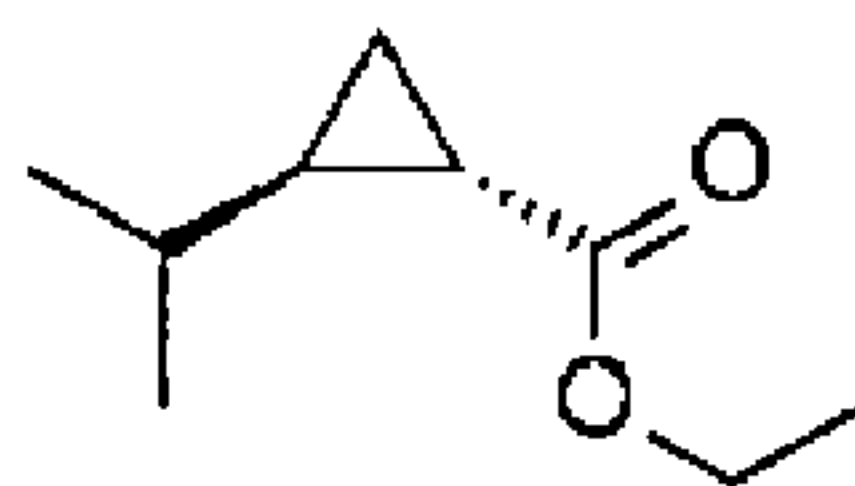


將KOH (195 g, 3.48 mol)於H₂O (195 mL)中之溶液冷卻至0°C且歷經20分鐘添加純(2S)-2-氯-3-甲基-丁-1-醇(110 g, 801 mmol)，同時保持內部溫度低於5°C。使反應混合物升溫至RT。藉由在100 mbar下真空蒸餾純化反應混合物，自23°C升溫至50°C，以得到呈無色油狀之標題化合物(47 g, 64%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.98 (d, J=6.9 Hz, 3H), 1.05 (d, J=6.9 Hz, 3H), 1.51 (o, J=6.9 Hz, 1H), 2.52-2.54 (m, 1H), 2.70-2.75 (m, 2H)。

【0119】

製備15

(1S,2R)-2-異丙基環丙烷羧酸乙酯



歷經25分鐘將nBuLi於己烷中之溶液(310 mL, 780 mmol)逐滴添加至在冰/水浴(內部溫度: 8°C)中冷卻的2-二乙氧基磷醯基乙酸乙酯(153 mL, 772 mmol)於1,4-二噁烷(870 mL)中之溶液中。升溫至RT且攪拌40分鐘。經由套管將溶液轉移至3 L壓力容器且將(2R)-2-異丙基環氧乙烷(70 g, 772 mmol)添加於1,4-二噁烷(180 mL)中。在150°C下於50 psi壓力下攪拌反應混合物14小時。冷卻反應混合物至RT且添加H₂O (700 mL)。分離各層, 且用MTBE (2 × 500 mL)再萃取水相。合併有機相, 用NaCl飽和水溶液 (2 × 350 mL)洗滌, 經MgSO₄乾燥, 且在真空中濃縮, 以獲得適合於隨後未經進一步純化即使用的呈黃色油狀之粗標題化合物(107.7 g, > 99%)。GC-MS (m/z): 156 (M+)。

【0120】

製備16 (1S,2R)-2-異丙基環丙烷羧酸



在100°C下攪拌含有25% NaOH水溶液(800 mL)的(1S,2R)-2-異丙基環丙烷羧酸乙酯(107.7 g, 482.6 mmol)於1,4-二噁烷(800 mL)中之混合物7小時。冷卻混合物至RT, 添加水(300 mL), 用MTBE (2 × 500 mL)萃取, 且丟棄有機相。用37% HCl水溶液(約500 mL)酸化水相直至pH約為1-2為止。

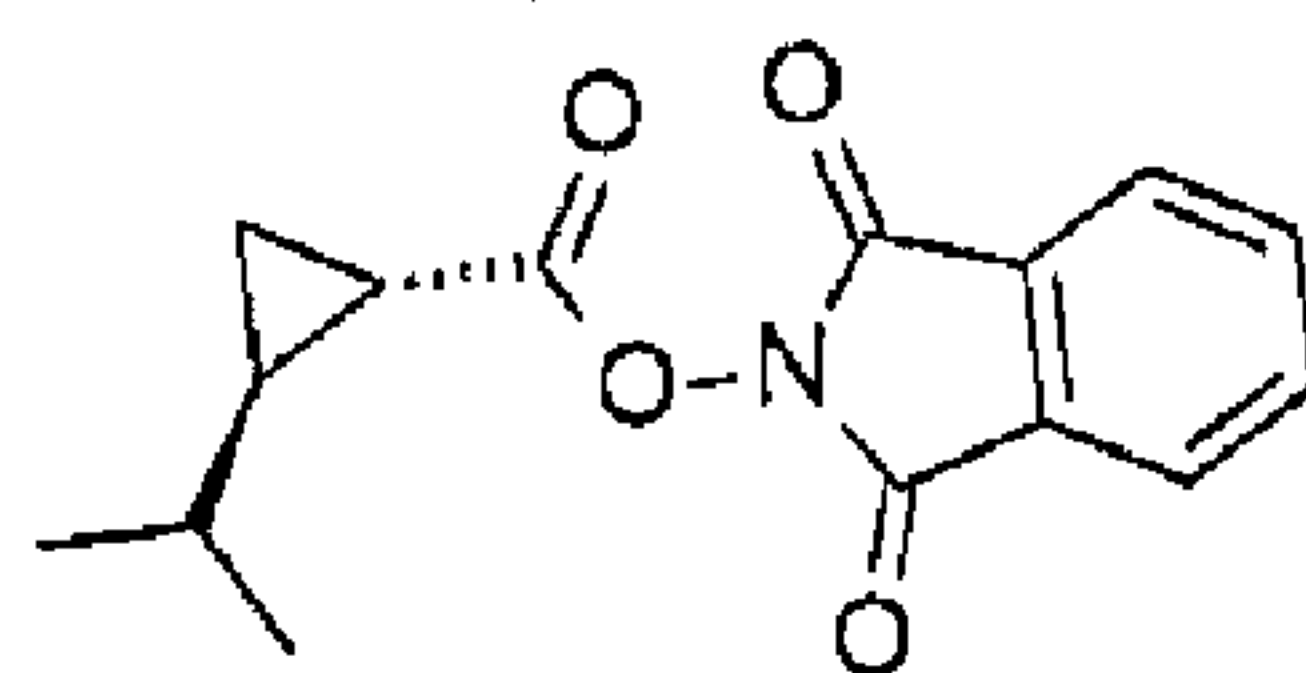
【0121】用MTBE (2 × 600 mL)萃取經酸化水性混合物, 有機層用飽和NaCl水溶液洗滌, 經MgSO₄乾燥, 且在真空中濃縮, 以得到呈琥珀

色油狀之標題化合物(54.2 g, 75%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.81-0.86 (m, 1H), 1.01 (dd, J=5.9, 3.7 Hz, 6H), 1.04-1.13 (m, 1H), 1.20-1.24 (m, 1H), 1.28-1.37 (m, 1H), 1.39-1.44 (m, 1H)。

【0122】

製備17

(1S,2R)-2-異丙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吡啶啉-2-基酯)

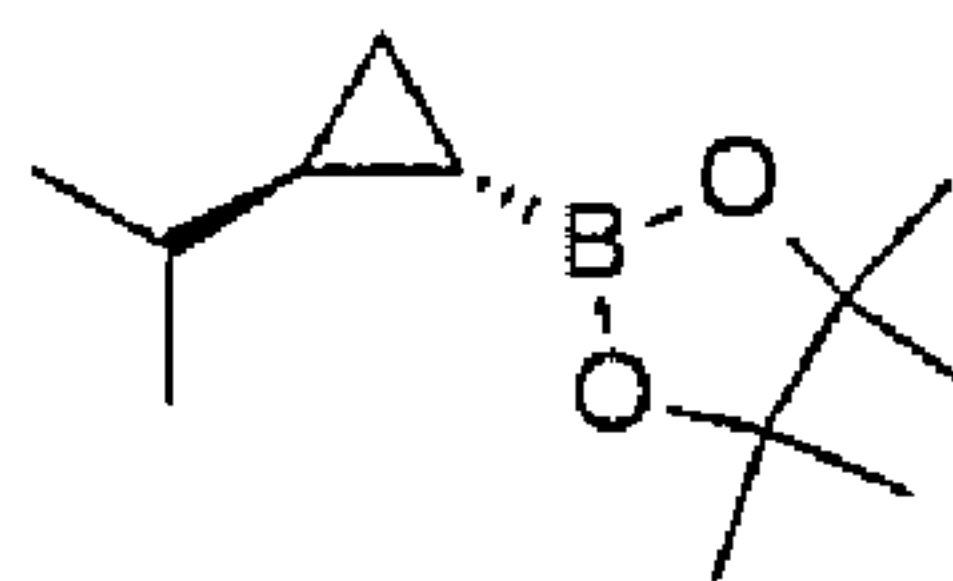


在0°C下攪拌(1S,2R)-2-異丙基環丙烷羧酸(54.2 g, 359 mmol)、2-羥基異吡啶啉-1,3-二酮(59.8 g, 359 mmol)及DMAP (4.44 g, 35.9 mmol)於DCM (690 mL)中之懸浮液。逐滴添加N,N'-二異丙基碳化二亞胺(50.4 g, 395 mmol)，升溫至RT，且在RT下攪拌所得反應混合物2小時。添加H₂O (600 mL)且分離各相。用DCM (2 × 300 mL)萃取水相，合併有機相，經MgSO₄乾燥，過濾，且蒸發。藉由二氧化矽層析純化所得固體殘餘物，用100% DCM溶離，以在蒸發層析溶離份之後得到呈淡黃色固體狀之標題化合物(96 g, 88%)。ES/MS (m/z): 274 (M+1)。

【0123】

製備18

2-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷



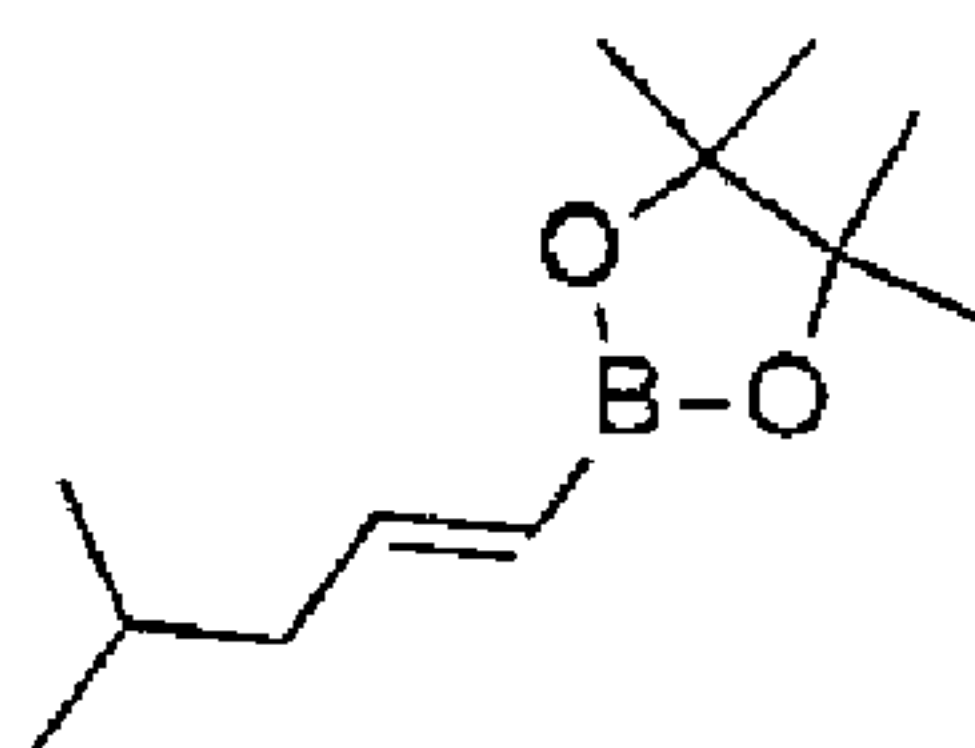
使氮氣流通過(1S,2S)-2-異丙基環丙烷羧酸(1,3-二側氧基異吡啶啉-2-基酯) (96 g, 316 mmol)及雙(頻哪醇根基)二硼(160 g, 630 mmol)於

EtOAc (480 mL)中之溶液15分鐘。在85°C下攪拌混合物且歷經10分鐘逐滴添加異菸鹼酸乙酯(24.38 g, 157 mmol)。在85°C下攪拌所得混合物16小時。冷卻所得懸浮液，過濾及丟棄固體，且在減壓下蒸發棕色濾液。經由矽膠栓塞過濾粗殘餘物，用2% EtOAc/己烷溶離。自濾液移除溶劑且使用層析經由矽膠再純化所得殘餘物，用3% EtOAc/己烷溶離，以在自層析溶離份移除溶劑之後獲得呈無色油狀之標題化合物(25.3 g, 38%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): -0.33 - -0.38 (m, 1H), 0.42-0.47 (m, 1H), 0.63-0.67 (m, 1H), 0.75-0.82 (m, 1H), 0.89-1.02 (m, 1H), 0.98 (m, 6H), 1.24 (s, 12H)。

【0124】

製備19

4,4,5,5-四甲基-2-[(E)-4-甲基戊-1-烯基]-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷

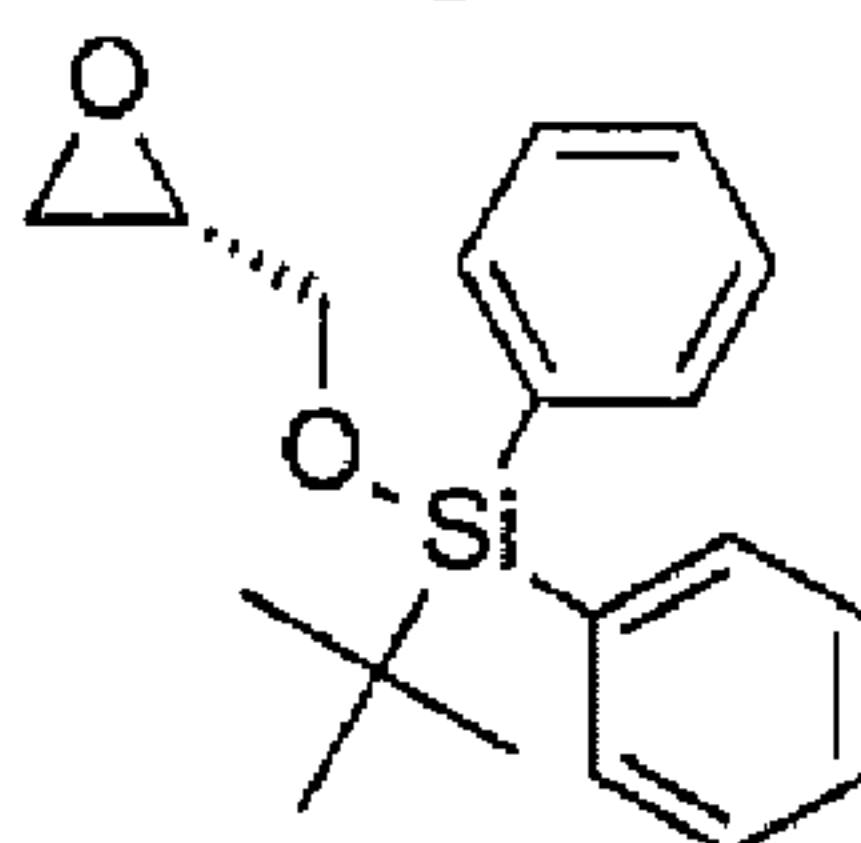


將[(E)-4-甲基戊-1-烯基]硼酸(0.975 g, 7.62 mmol)及頻哪醇(1.11 g, 9.14 mmol)溶解於乾燥DCM (9.7 mL)中。添加MgSO₄ (0.7313 g, 6.05 mmol)且在室溫下攪拌3天。過濾不可溶固體且在減壓下移除溶劑以得到呈透明油狀之標題化合物(1.6 g, 100%)。¹H NMR (400.13 MHz, DMSO): 0.86 (d, J=6.6 Hz, 6H), 1.08 (s, 6H), 1.19 (s, 12H), 1.62-1.72 (m, 1H), 2.01 (td, J=6.9, 1.4 Hz, 2H), 3.92 (s, 1H), 5.31 (dt, J=17.9, 1.3 Hz, 1H), 6.47 (dt, J=17.9, 6.9 Hz, 1H)。

【0125】

製備20

第三丁基-[[[(2S)-環氧乙烷-2-基]甲氧基]-二苯基-矽烷

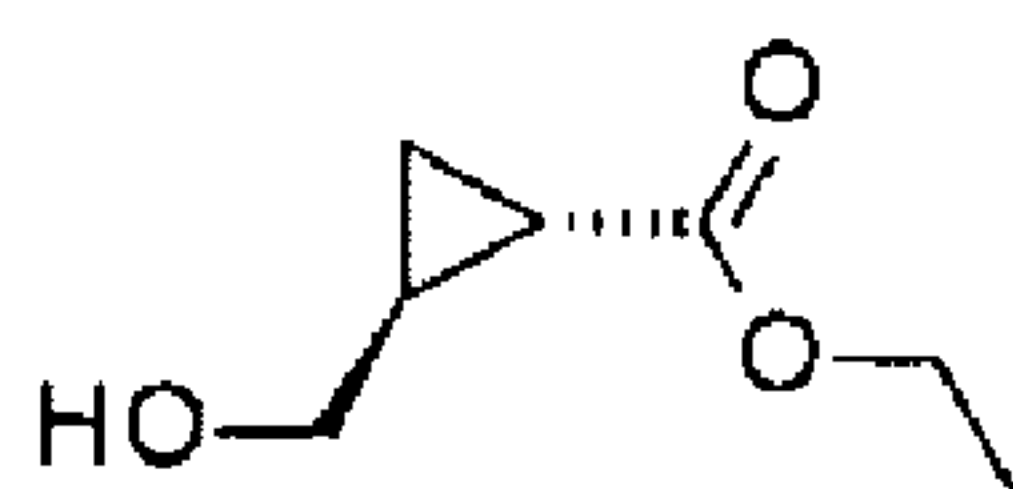


向[(2R)-環氧乙烷-2-基]甲醇(15.0 g, 202.6 mmol)於DMF (135 mL)中之冰冷溶液中添加咪唑(33.34 g, 489.8 mmol)且攪拌15分鐘。歷經30分鐘逐滴添加第三丁基-氯-二苯基-矽烷(77 mL, 302.5 mmol)且攪拌隔夜至室溫。用己烷(1 L)、醚(500 mL)及水(1 L)稀釋。分離各層且用醚(2 x 1 L)萃取水層。合併有機物且用水(3 x 750 mL)、飽和NaHCO₃、飽和NaCl水溶液洗滌，且經MgSO₄乾燥。在減壓下蒸發溶劑。藉由矽膠層析純化：溶離劑 0-10% EtOAc/己烷，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈油狀物之標題化合物(11.77 g, 18%)。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 1.08 (s, 9H), 2.64 (dd, J=2.6, 5.1 Hz, 1H), 2.77 (t, J=4.6 Hz, 1H), 3.15 (五重峰, J=3.5 Hz, 1H), 3.73 (dd, J=4.7, 11.8 Hz, 1H), 3.88 (dd, J=3.2, 11.9 Hz, 1H), 7.40-7.48 (m, 6H), 7.71 (m, 4H)。

【0126】

製備21

(1S,2S)-2-(羥基甲基)環丙烷羧酸乙酯



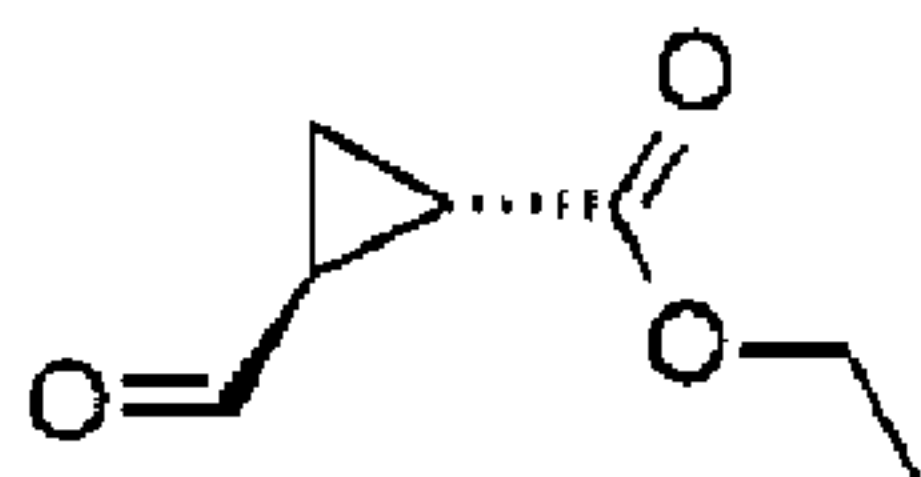
在室溫下將膦醯基乙酸三乙酯(7.5 mL, 38 mmol)緩慢添加至第三丁醇鈉(3.67 g, 37.82 mmol)於1,4-二噁烷(40 mL)中之懸浮液中。1小時後，添加第三丁基-[[[(2S)-環氧乙烷-2-基]甲氧基]-二苯基-矽烷(11.77 g, 33.76 mmol)且在密封壓力容器中於140°C下加熱隔夜。添加額外膦醯基

乙酸三乙酯(2 mL)且在160°C下加熱一小時。使混合物冷卻且用DCM (300 mL)及水(150 mL)稀釋。分離各層，用DCM (3 × 150 mL)萃取水層。合併有機物並用飽和NaHCO₃水溶液、飽和NaCl水溶液洗滌，且經MgSO₄乾燥。經由矽藻土過濾且在減壓下蒸發溶劑，以得到呈油狀物之氧基甲基]環丙烷羧酸乙酯(1S,2S)-2-[[第三丁基(二苯基)矽烷基酯](18.45 g)。在室溫下溶解於THF(75 mL)中且添加氟化四丁銨(1 M THF, 67 mL, 67 mmol, 1.0 M)。在130 mbar及30°C下攪拌48小時且移除溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑：0-50% EtOAc/己烷，以在自層析溶離份移除溶劑之後分離呈油狀物之標題化合物(3.35 g, 62%)。ES/MS (m/z): 142 (M+1)。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 0.90-0.86 (m, 1H), 1.23 (dd, J=4.5, 8.9 Hz, 1H), 1.28 (t, J=7.2 Hz, 4H), 1.56-1.60 (m, 1H), 1.69-1.77 (m, 2H), 2.06 (s, 2H), 3.50 (dd, J=6.9, 11.5 Hz, 1H), 3.64 (dd, J=6.0, 11.4 Hz, 1H), 4.14 (qd, J=7.1, 2.9 Hz, 3H)。

【0127】

製備22

(1S,2S)-2-甲醯基環丙烷羧酸乙酯



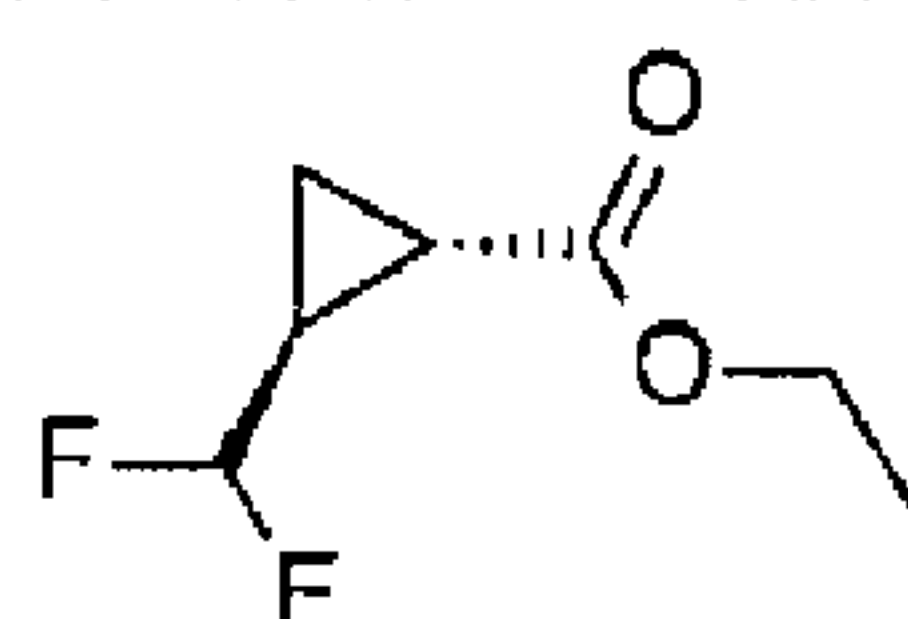
向(1S,2S)-2-(羥基甲基)環丙烷羧酸乙酯(12.25 g, 84.9 mmol)於DCM (425 mL)中之冰冷溶液中一次性添加氯鉻酸吡啶(26.09 g, 118.6 mmol)。30分鐘後，移除冰浴且在室溫下攪拌4小時。添加水(200 mL)且經由矽藻土過濾。用額外的水(100 mL)及DCM (800 mL)沖洗。使矽藻土濾餅懸浮於DCM中且過濾。重複此操作兩次。合併有機物，分離水層，且經由二氧化矽墊過濾有機物。用額外DCM沖洗且在減壓下蒸發溶劑以

得到呈油狀物之標題化合物(11.0 g, 91%)。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 1.30 (t, J=7.3 Hz, 3H), 1.57-1.50 (m, 1H), 1.60-1.65 (m, 2H), 2.26-2.30 (m, 1H), 2.45 (td, J=9.0, 4.2 Hz, 1H), 4.13-4.22 (m, 3H), 9.32 (d, J=4.2 Hz, 1H)。

【0128】

製備23

(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙烷羧酸乙酯



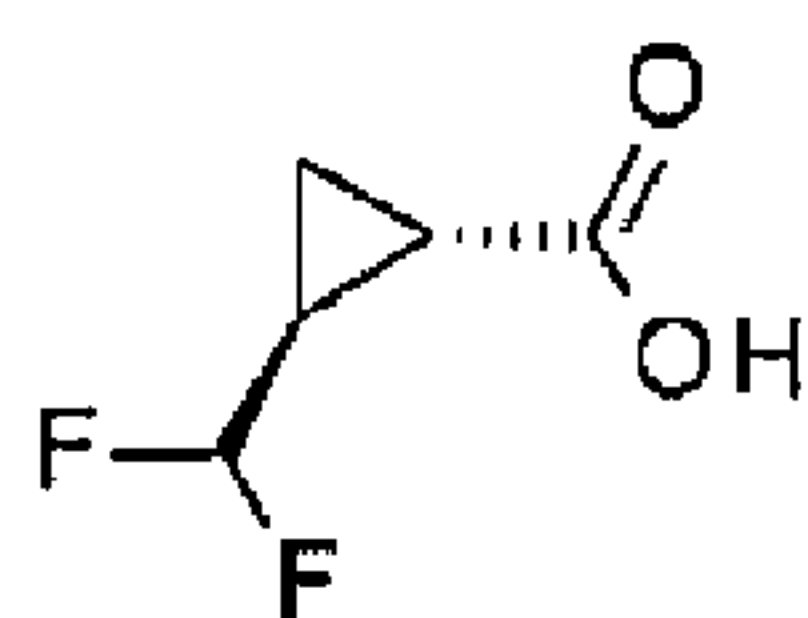
歷經3分鐘將三氟化二乙基胺基硫(24 mL, 172.3 mmol)添加至(1S,2S)-2-甲醯基環丙烷羧酸乙酯(11.00 g, 77.38 mmol)於DCM (220 mL)中之冰冷溶液中。1小時後，自冰浴移除且在室溫下攪拌2小時。添加三氟化二乙基胺基硫(3.5 mL)且攪拌額外一小時。在冰浴中冷卻混合物且小心地倒入飽和NaHCO₃水溶液中。分離各層且用DCM (2 × 50 mL)萃取水層。

【0129】 合併有機物且經MgSO₄乾燥。經由小二氧化矽墊過濾樣品且在減壓(250 mbar及30°C)下蒸發溶劑以得到呈油狀物之標題化合物(11.10 g, 87%)。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 1.14-1.19 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.30 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.97-1.89 (m, 2H), 4.22 (q, J=7.2 Hz, 3H), 5.79 (td, J_{H-F}=56.8 Hz, J=3.6 Hz, 1H)。

【0130】

製備24

(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙烷羧酸

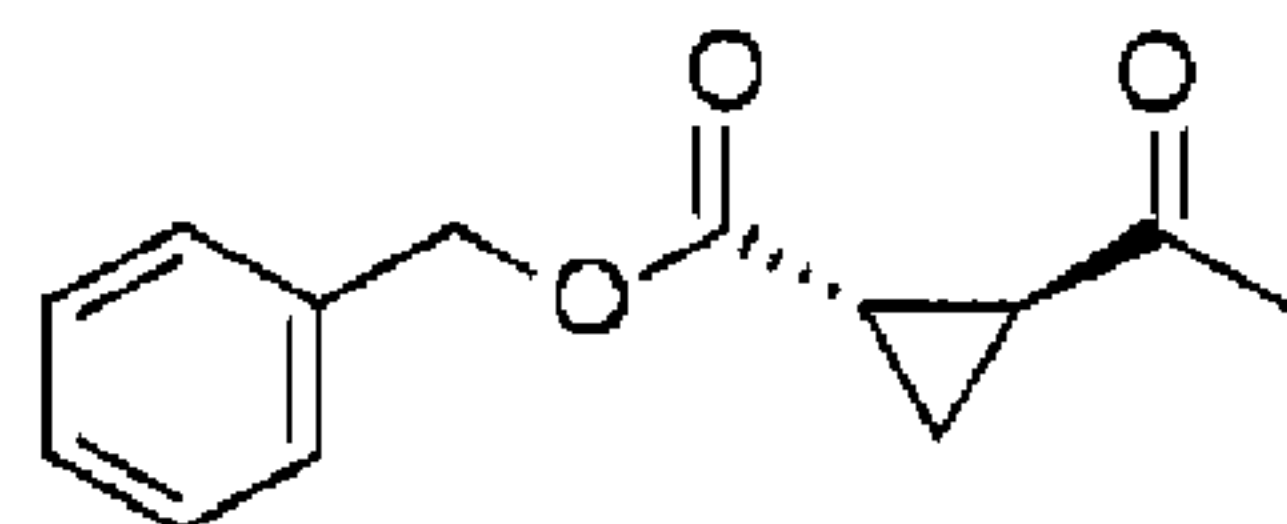


將1 N NaOH (75 mL)添加至(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙烷羧酸乙酯 (11.10 g, 67.62 mmol)於MeOH (75 mL)中之溶液中且在RT下攪拌隔夜。添加DCM (70 mL)且分離各層。用DCM (70 mL)萃取水層。在冰浴中冷卻水層且藉由添加35% HCl將pH調節至1。添加DCM (50 mL)且分離兩個層。用DCM萃取水層。合併有機物，經MgSO₄乾燥，且在減壓(200 mbar, 30°C)下蒸發溶劑以得到呈油狀物之標題化合物(6.25 g, 68%)。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 1.26 (dt, J= 8.4, 5.9 Hz, 1H), 1.34-1.39 (m, 1H), 1.92-1.96 (m, 1H), 2.01-2.07 (m, 1H), 5.82 (td, J_{H-F}=59Hz, J=3.2 Hz, 1H)。

【0131】

製備25

反式-苄基-2-乙醯基環丙烷羧酸酯

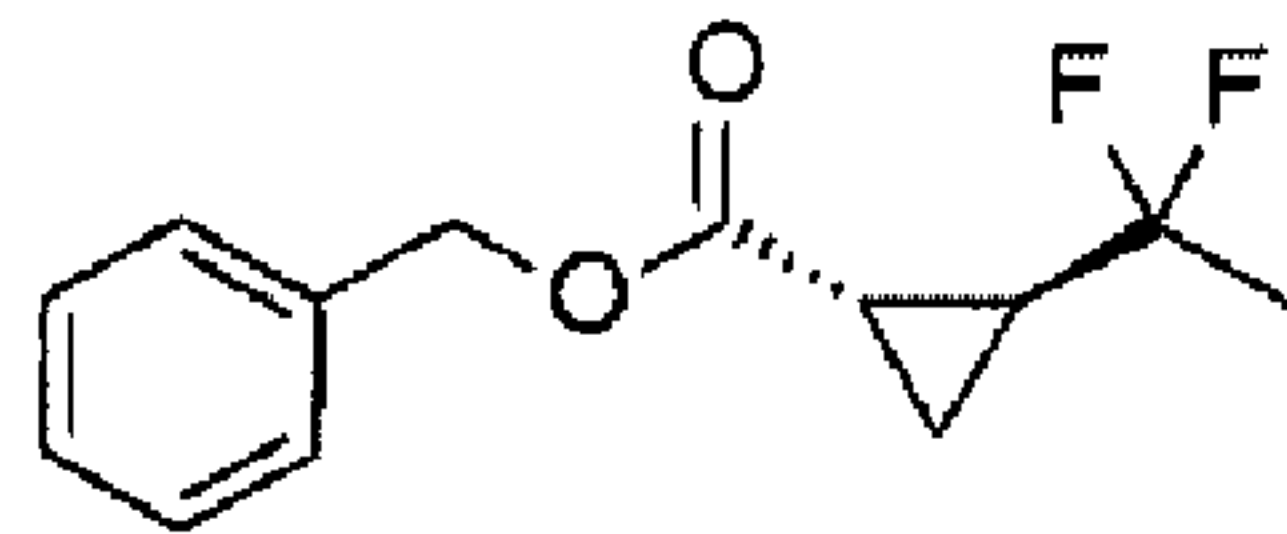


將K₂CO₃ (36.2 g, 261.93 mmol) 添加至苄基溴乙酸酯(40 g, 174.618 mmol)、甲基乙烯基酮(43 mL, 523.85 mmol)、1,4-二氮雜雙環[2.2.2]辛烷(2.3 g, 20.9 mmol)於乙腈(400 mL)中之混合物中。在N₂下於80°C下攪拌隔夜。使其冷卻，過濾且在減壓下蒸發溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑0-50% EtOAc/己烷，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到標題化合物(13.4 g, 35%)。¹H NMR (400.13 MHz, d₆-DMSO): 1.33-1.39 (m, 2H), 2.08-2.13 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.54-2.59 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 7.39-7.37(m, 6H)。

【0132】

製備26

反式-苄基-2-(1,1-二氟乙基)環丙烷羧酸酯

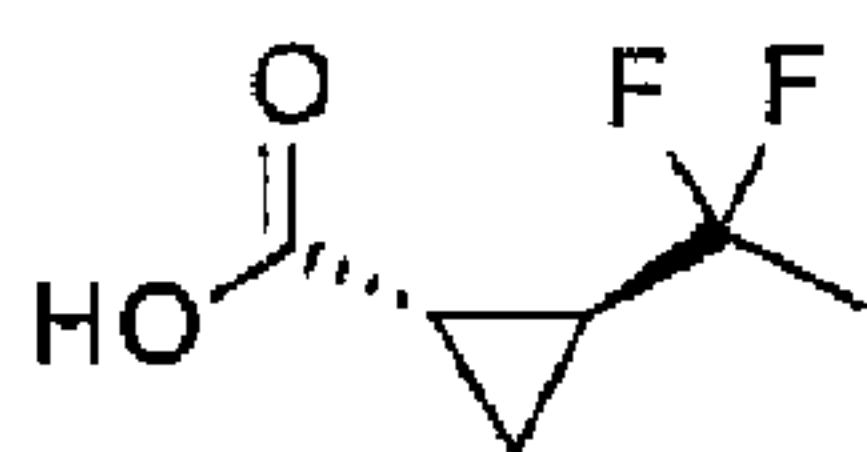


在0°C下將EtOH (0.05 eq)添加至反式-苄基-2-乙醯基環丙烷羧酸酯 (2.76 g, 12.6 mmol)及三氟化雙(2-甲氧基乙基)胺基硫(23.2 mL, 126 mmol)之混合物中。使其升溫至室溫且在50°C下加熱40小時。用DCM稀釋且在冰浴中冷卻混合物，以緩慢添加飽和NaHCO₃水溶液。分離各層且用DCM (2 × 100 mL)萃取水層。合併有機物且經無水Na₂SO₄乾燥。在減壓下蒸發溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑：10% MTBE/己烷，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈無色油狀之標題化合物(2.30 g, 76%)。
¹H NMR (400.13 MHz, d₆-DMSO): 1.19 (t, J=7.5 Hz, 2H), 1.67 (t, J_{H-F}=16 Hz, 3H), 1.93-1.98 (m, 1H), 2.00-2.08 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 7.38-7.40 (m, 5H)。

【0133】

製備27

反式-2-(1,1-二氟乙基)環丙烷羧酸



將10% Pd/C (1.53 g, 14.4 mmol)添加至反式-苄基-2-(1,1-二氟乙基)環丙烷羧酸酯(6.56 g, 27.3 mmol)於EtOAc (136 mL, 0.2 M)中之溶液中。使用氣囊在RT下於H₂下攪拌3小時。經由矽藻土過濾且用EtOAc沖

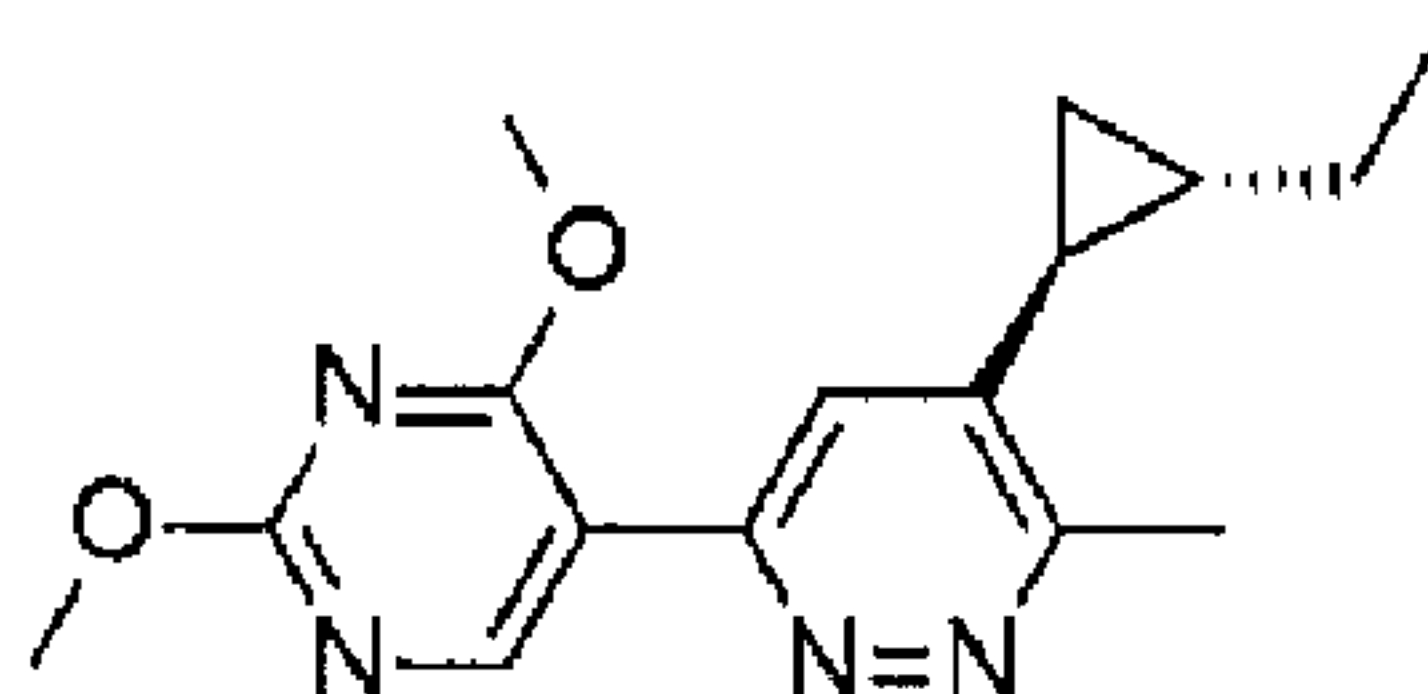
洗。在減壓下蒸發溶劑以得到呈無色油狀之標題化合物(4.03 g, 98%)。

$^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 1.10 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.66 (t, $J_{\text{H-F}}=18.4$ Hz, 3H), 1.72-1.77 (m, 1H), 1.96-1.99 (m, 1H), 12.49 (s, 1H)。

【0134】

製備28

5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘓啶

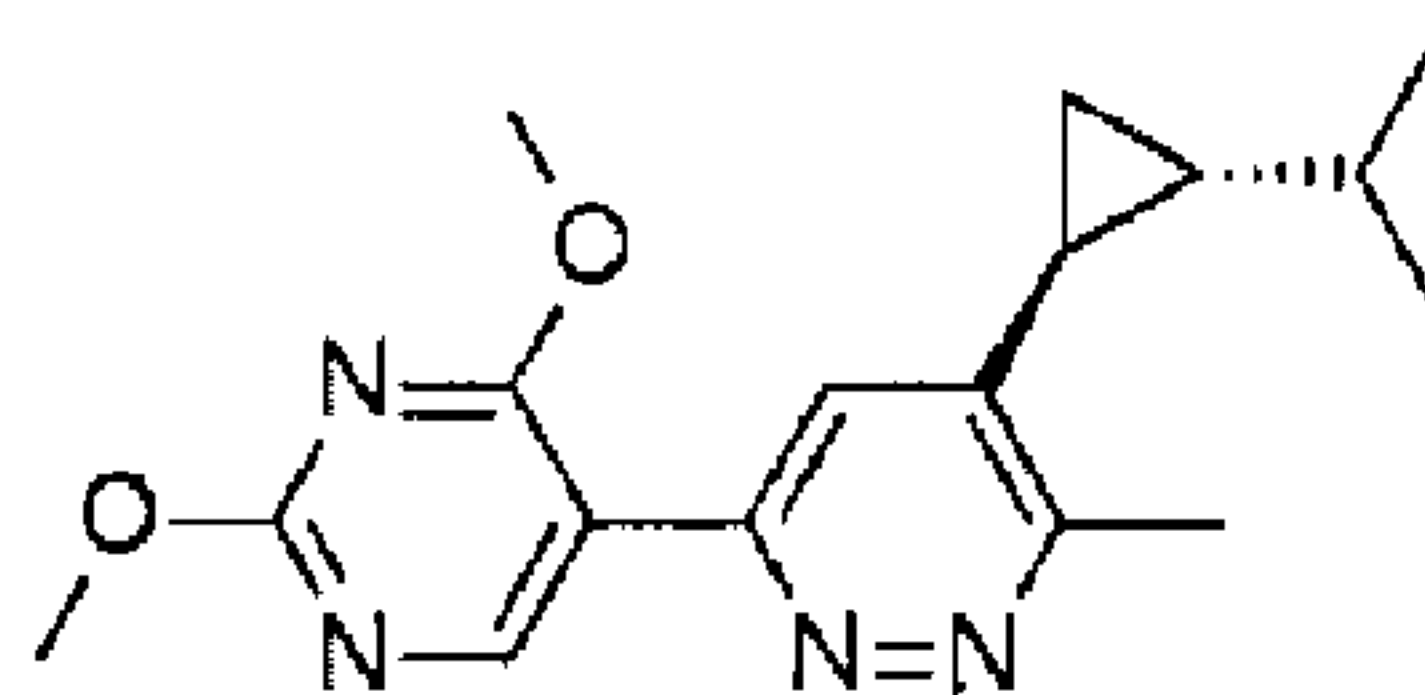


藉由使 N_2 鼓泡經由混合物使4-氯-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪(16 g, 54.0 mmol)、2-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(17 g, 83.22 mmol)、2 M Na_2CO_3 水溶液(70 mL, 140 mmol)及1,4-二噁烷(290 mL)之混合物脫氣10分鐘。添加雙(二第三丁基(4-二甲胺基苯基)膦)二氯鈣(II) (2.0 g, 2.74 mmol)且在 90°C 下攪拌所得混合物16小時。冷卻反應混合物至PT，用 H_2O 稀釋，且用EtOAc萃取。分離所得相，經無水 MgSO_4 使有機相乾燥，且在真空中濃縮。藉由層析經由二氧化矽純化所得殘餘物，用60-100% 己烷/EtOAc之梯度溶離，以在自層析溶離份移除溶劑之後獲得呈琥珀色油狀之標題化合物(12.95 g, 77%)。在靜置時在RT下油固化成灰白色固體。 ES/MS (m/z): 301 (M+1)。

【0135】

製備29

5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘓啶

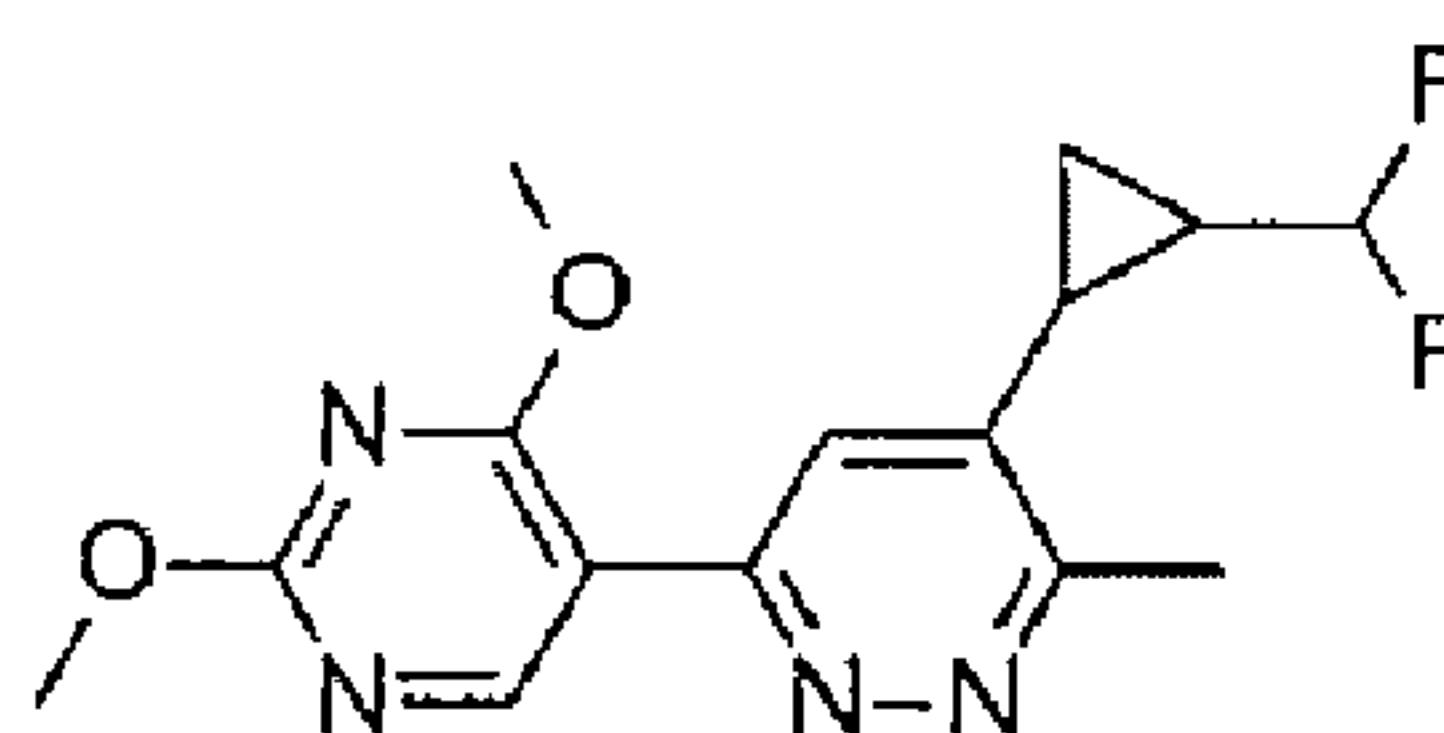


混合4-氯-6-(2,4-二甲氧基咪啶-5-基)-3-甲基-噻嗪(19.1 g, 70.6 mmol)、 K_3PO_4 (45.9 g, 212 mmol)、1,4-二噁烷(300 mL)及 H_2O (75 mL)且用 N_2 使混合物脫氣10分鐘。添加[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈣(II) (7.98 g 10.6 mmol)。用氮氣鼓泡額外2分鐘且一次性添加2-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷(22.2 g, 106 mmol)。在 $80^\circ C$ 下攪拌所得混合物16小時。冷卻反應至RT，添加 H_2O ，且用EtOAc萃取。分離有機層，經無水 $MgSO_4$ 乾燥，且在減壓下濃縮。藉由層析經由二氧化矽純化所得殘餘物，用85%己烷/EtOAc溶離，以在自層析溶離份移除溶劑之後分離呈琥珀色油狀之標題化合物(21.5 g, 92%)。在靜置時在RT下油固化成灰白色固體。ES/MS (m/z): 315 (M+1)。

【0136】

製備30

4-[(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙基]-6-(2,4-二甲氧基咪啶-5-基)-3-甲基-噻嗪



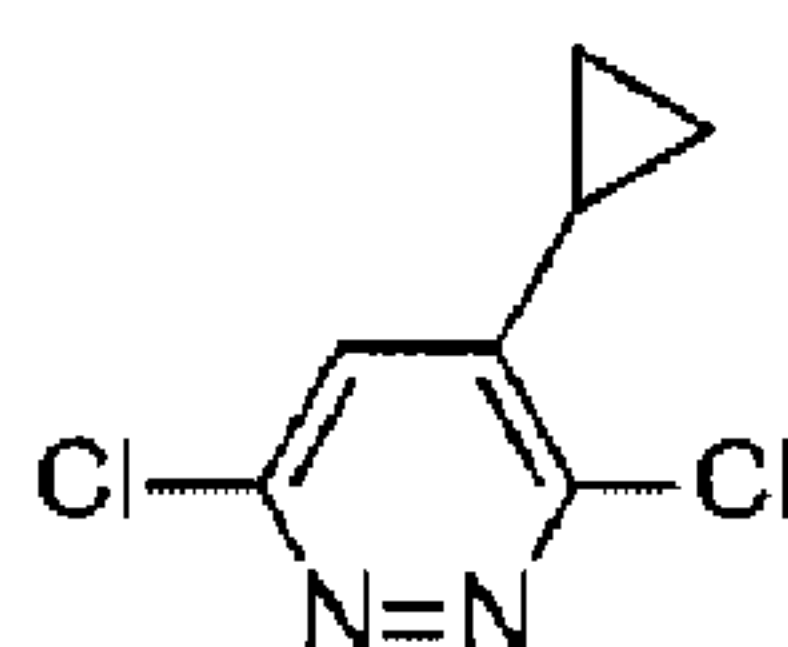
將二甲基鋅(2 M於甲苯中，1.5 mL, 3.0 mmol)添加至3-氯-4-[(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙基]-6-(2,4-二甲氧基咪啶-5-基)噻嗪(502 mg, 1.46 mmol)及1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵-二氯化鈣(II) (53 mg, 0.07

mmol)於THF (6 mL)中之脫氣懸浮液中。在密封瓶中在60°C下加熱2小時。使其冷卻至室溫。添加飽和NH₄Cl水溶液且用DCM (3×)萃取。合併有機物，經無水MgSO₄乾燥且在減壓下移除溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑：EtOAc，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈黃色殘餘物之標題化合物(433 mg, 91.8%)。ES/MS (m/z): 323 (M+1)。

【0137】

製備31

3,6-二氯-4-環丙基-噻嗪



向3,6-二氯噻嗪(10.00 g, 67.12 mmol)於水(300 mL)中之懸浮液中添加10 mL濃縮H₂SO₄及環丙烷羧酸(5.85 mL, 73.7 mmol)，在70°C下加熱且用N₂脫氣。歷經30秒添加AgNO₃ (2.28 g, 13.4 mmol)於10 mL H₂O中之溶液，隨後歷經30分鐘逐滴添加(NH₄)₂S₂O₈ (46 g, 201.577 mmol)於150 mL H₂O中之溶液。一小時後使混合物冷卻至RT且倒在冰上，藉由添加濃縮NH₄OH將pH調節至9。用EtOAc稀釋且分離有機相。用額外EtOAc萃取水層。合併有機物，經無水Na₂SO₄乾燥，且在減壓下蒸發溶劑。藉由逆相層析(C18 Gold 415 g, 梯度25-100% ACN於10 mM碳酸氫銨中；150 mL/min, 30分鐘)純化，以在自層析溶離份移除溶劑之後分離呈白色固體狀之標題化合物(6.83 g, 54%)。ES/MS (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 189/191。

【0138】可基本上如製備22中所描述來製備以下實例。

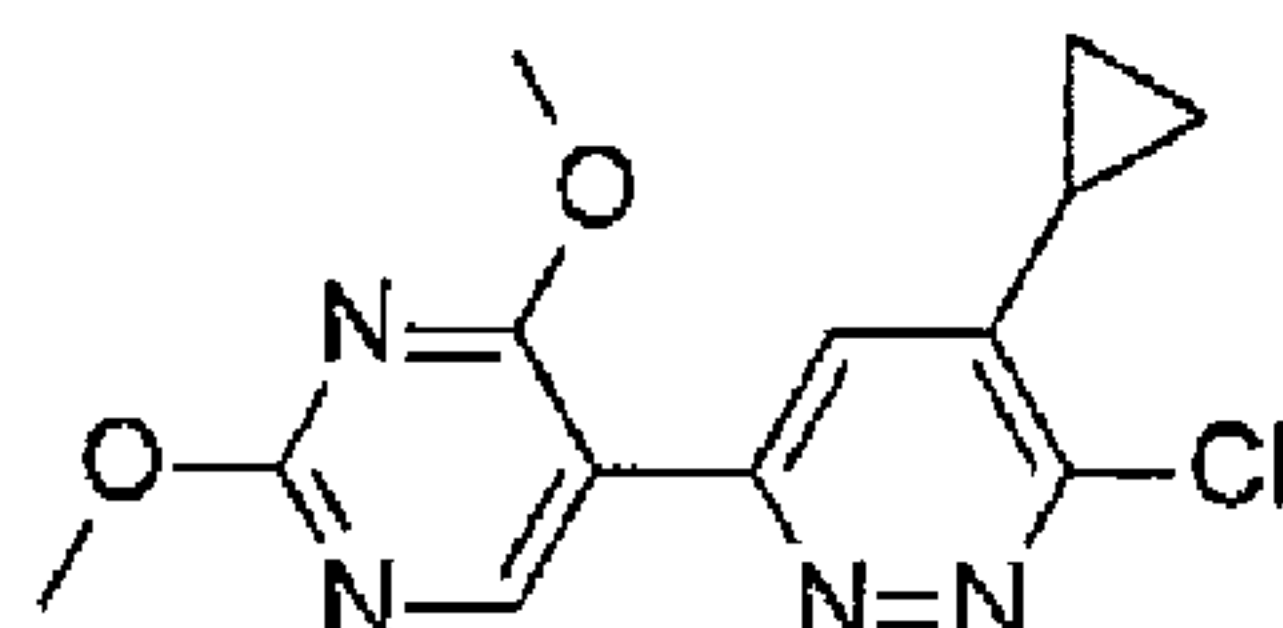
製備#	化學名稱	化學結構	ES/MS (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
32	外消旋-反式-3,6-二氯-4-(2-異丙基環丙基)噻嗪		231/233
33	外消旋-反式-3,6-二氯-4-(2-乙基環丙基)噻嗪		217/219
34	3,6-二氯-4-(2,2-二氟環丙基)噻嗪		225/227
35	外消旋-反式-3,6-二氯-4-[2-(二氟甲基)環丙基]噻嗪		239/241
36	外消旋-反式-3,6-二氯-4-[2-(1,1-二氟乙基)環丙基]噻嗪		253/255
37	3,6-二氯-4-環丁基-噻嗪		203/205
38	3,6-二氯-4-(3,3-二甲基環丁基)噻嗪		231/233
39	3,6-二氯-4-(3,3-二氟環丁基)噻嗪		239/241
40	3,6-二氯-4-環戊基-噻嗪		217/219
41	3,6-二氯-4-(3,3-二氟環戊基)噻嗪		253/255

42	3,6-二氯-4-環己基-噻嗪		231/233
----	-----------------	---	---------

【0139】

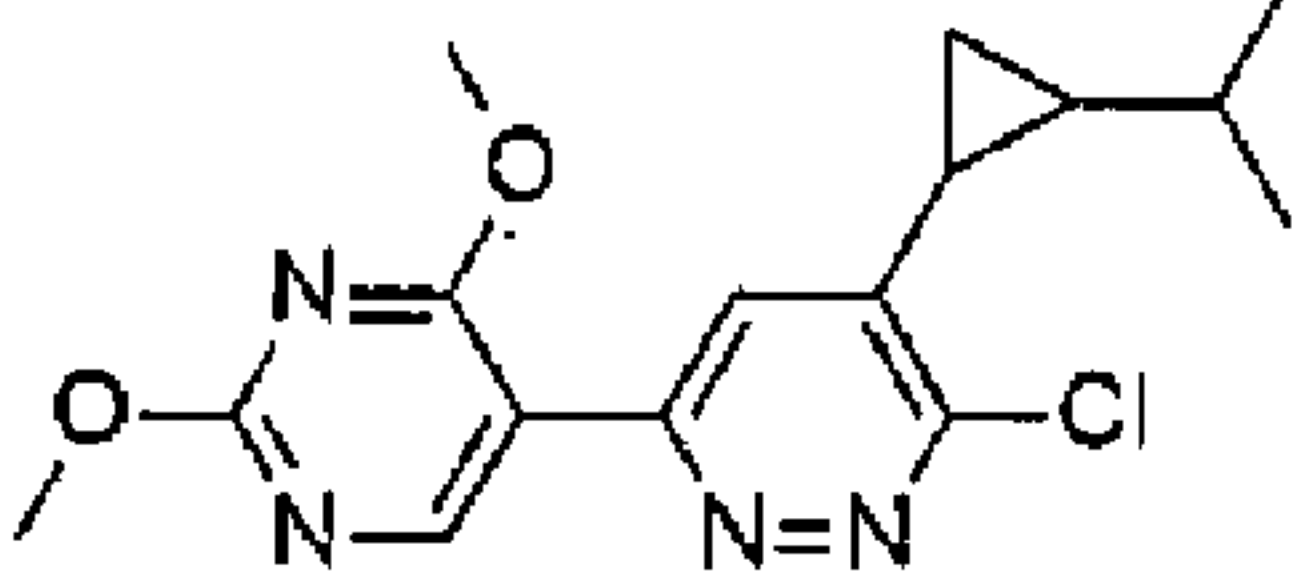
製備43

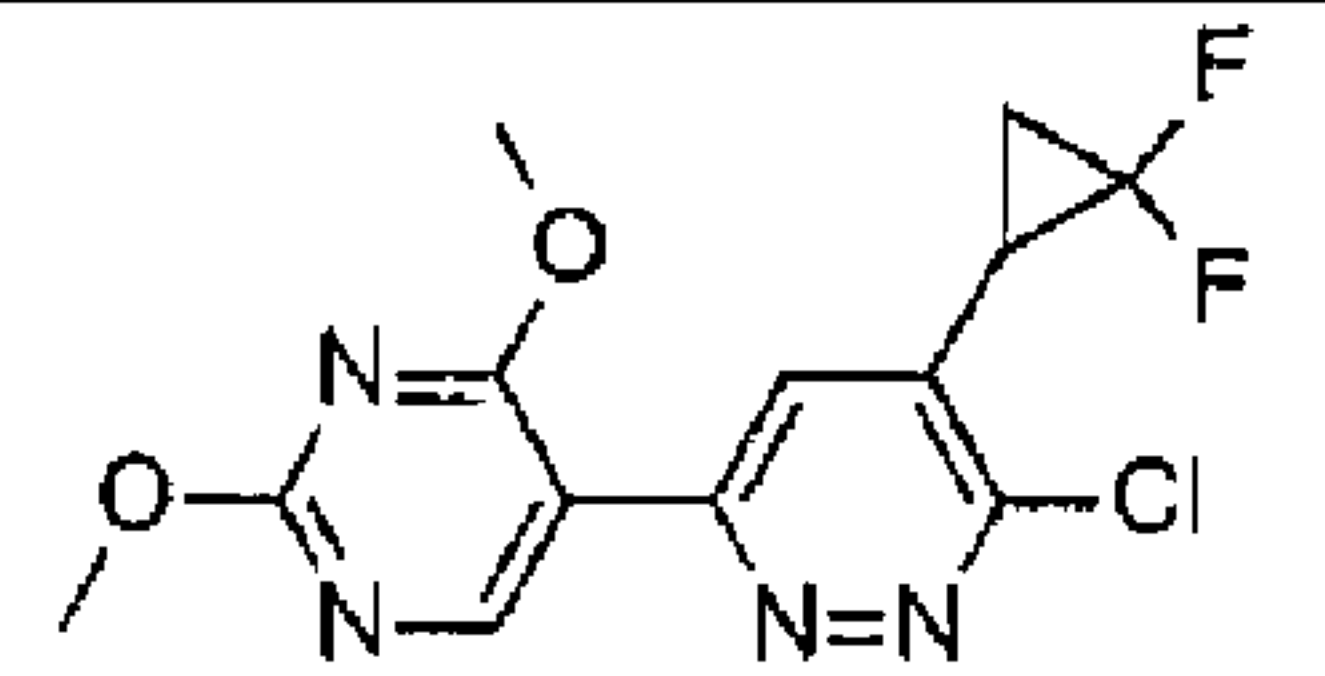
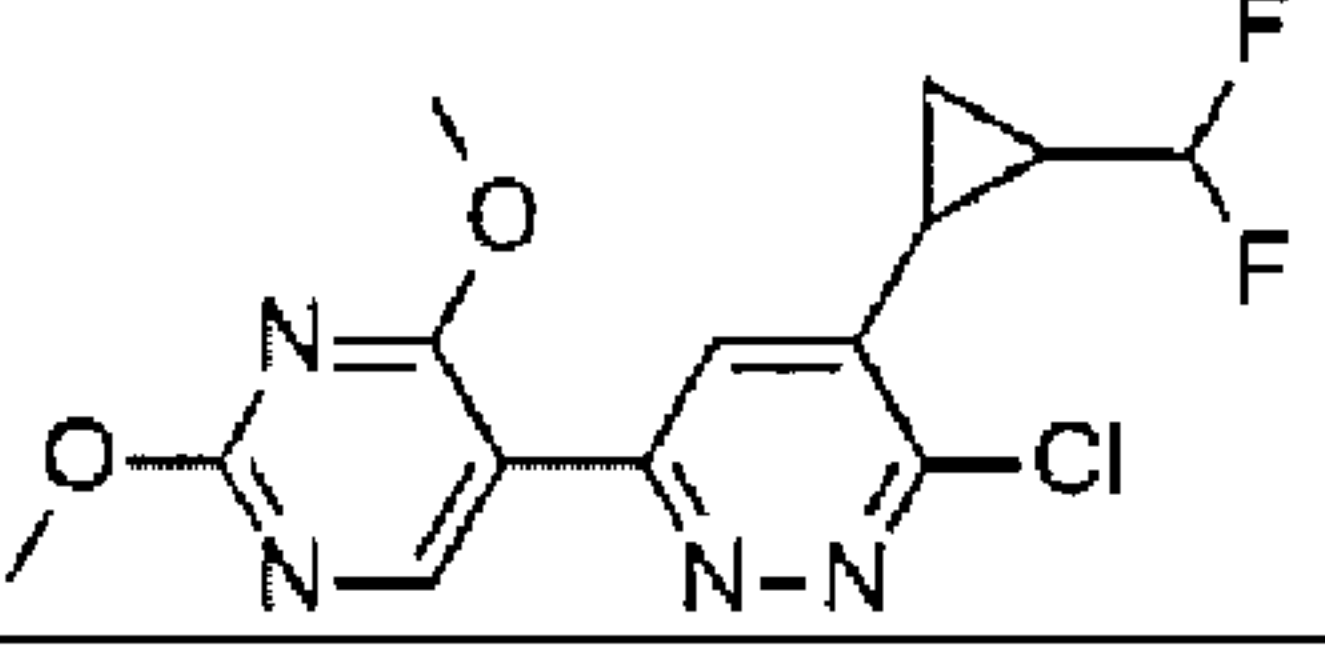
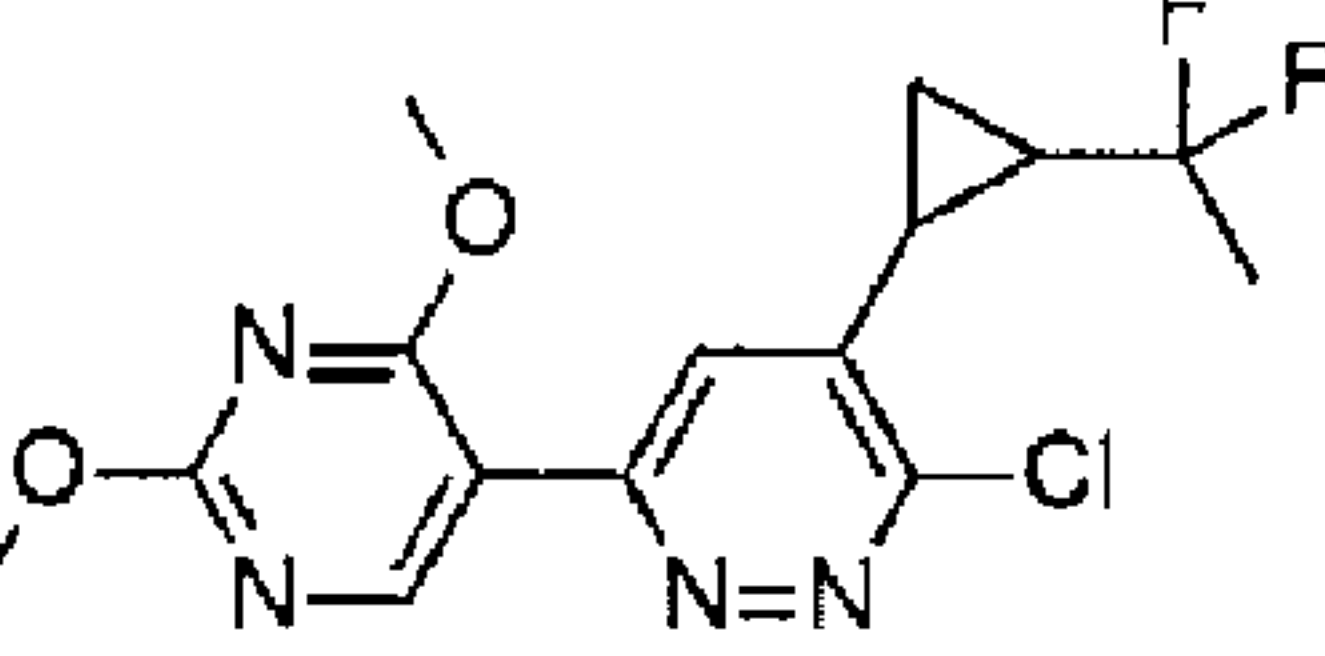
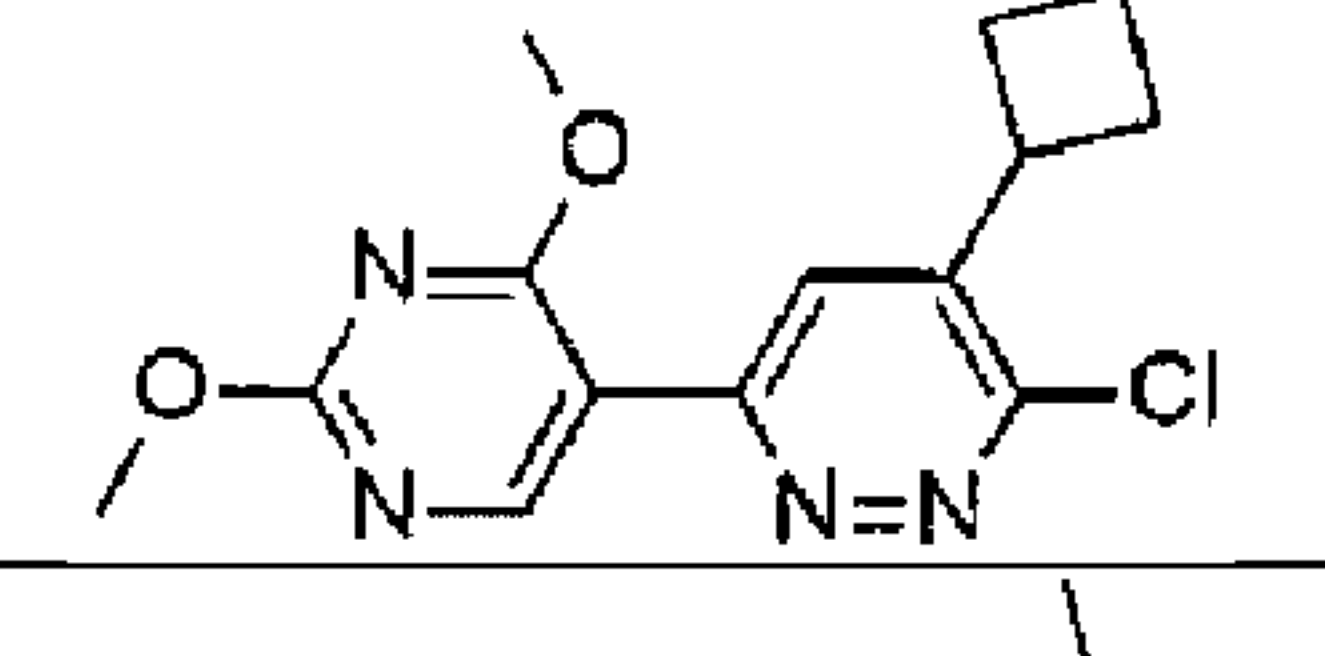
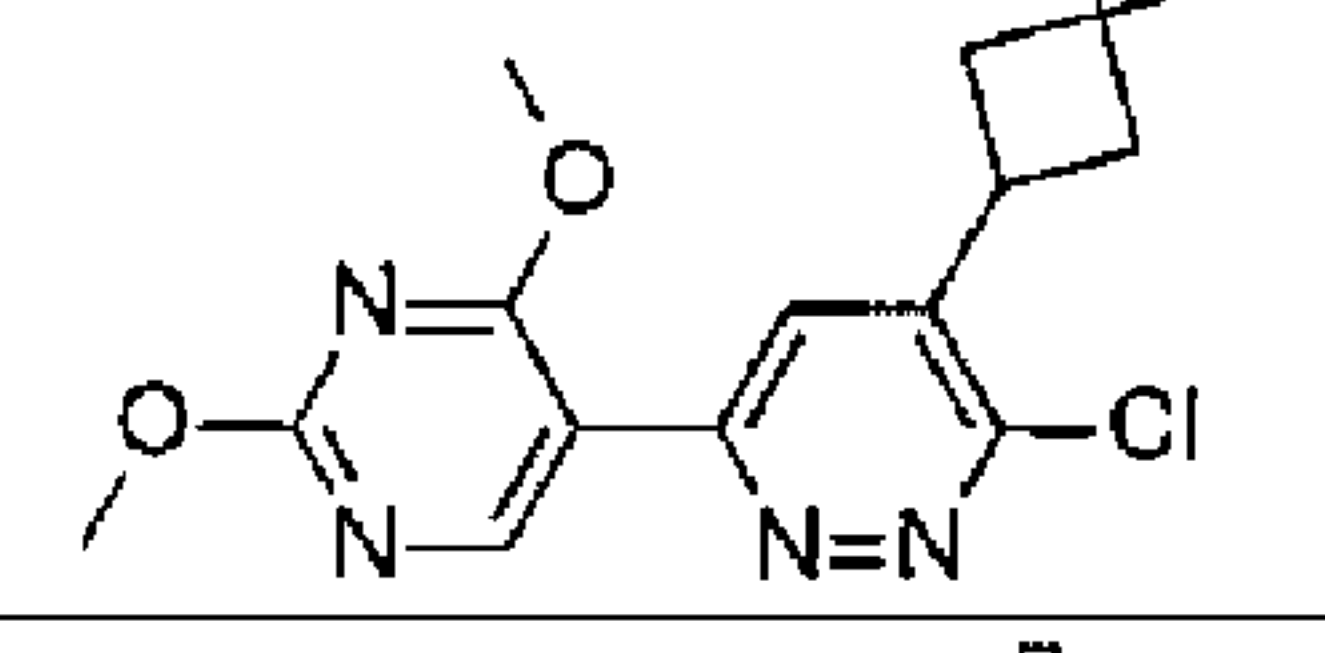
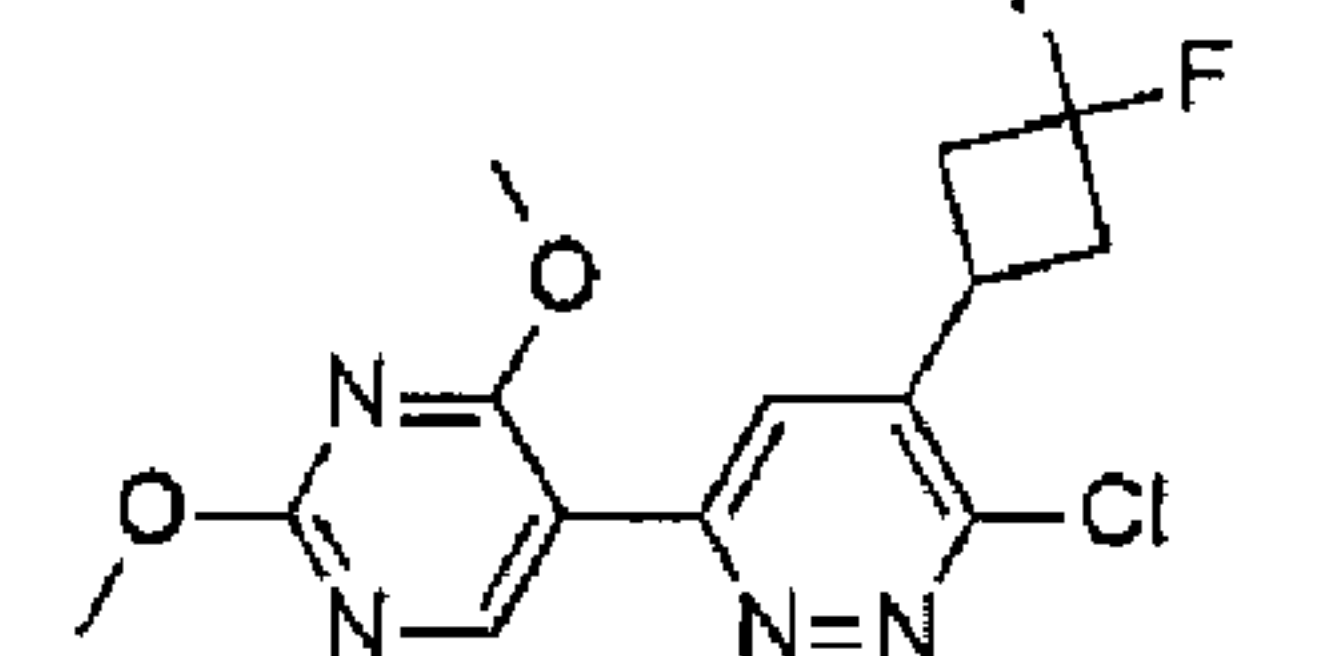
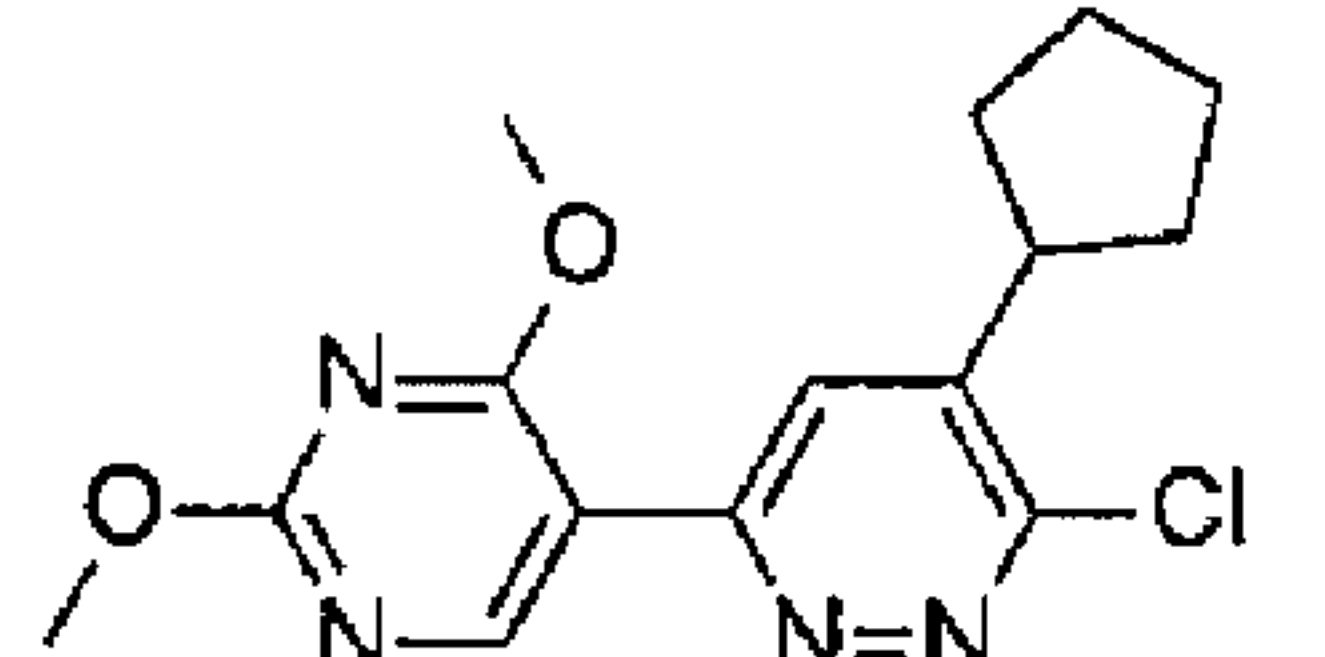
3-氯-4-環丙基-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)噻嗪



混合(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)硼酸(4.60 g, 25.0 mmol)、3,6-二氯-4-環丙基-噻嗪(5.2 g, 28 mmol)及K₂CO₃ (4.4 g, 32 mmol)、1,4-二噁烷(125 mL)以及H₂O (42 mL)且用N₂使混合物脫氣10分鐘。添加[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯鈣(II)二氯甲烷錯合物(1.5 g, 1.8 mmol)且用N₂進一步脫氣。在60°C下攪拌所得混合物1小時。冷卻反應至RT, 添加H₂O, 且用EtOAc萃取。分離有機層。用額外EtOAc萃取水層。合併有機物, 經無水Na₂SO₄乾燥, 且在減壓下蒸發溶劑。藉由層析經由二氧化矽純化所得殘餘物, 用70%己烷/(3:2丙酮: DCM)溶離, 以在自層析溶離份移除溶劑之後分離呈淡黃色固體狀之標題化合物(2.4 g, 33%)。ES/MS (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 293/295 [M+1]⁺

【0140】 以下實例可基本上如製備6中所描述來製備。

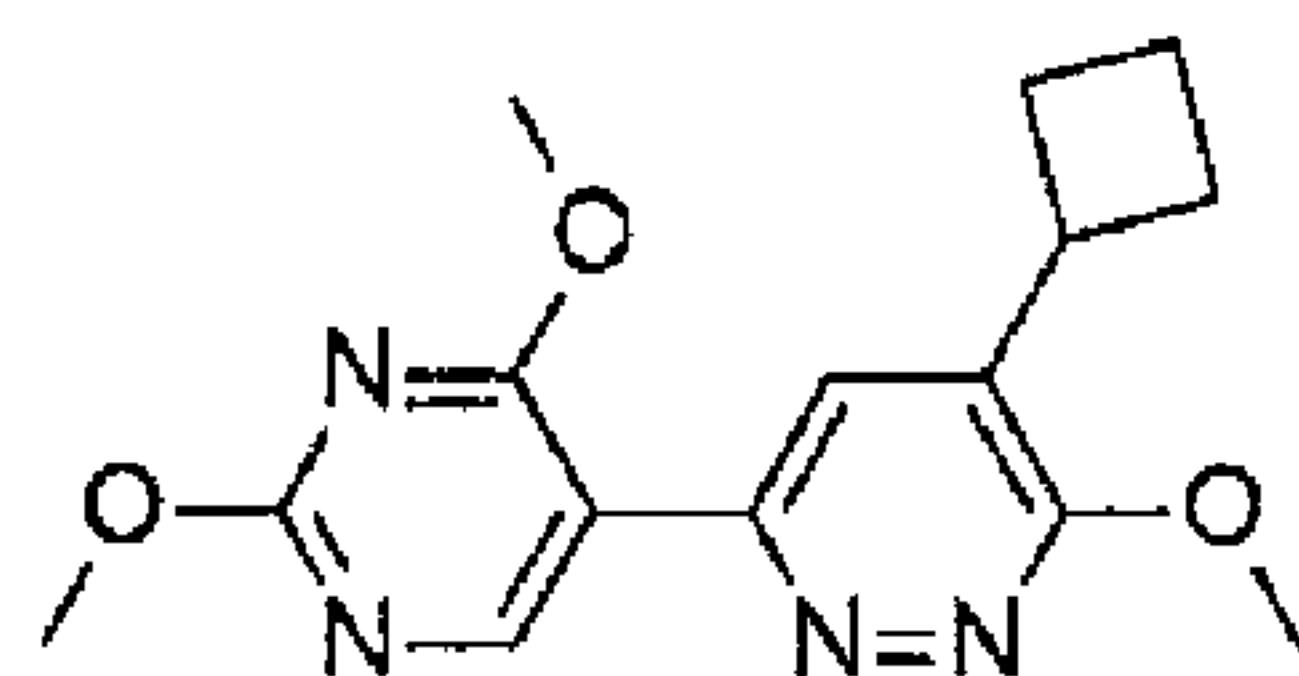
製備#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
44	外消旋-反式-3-氯-6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-4-(2-異丙基環丙基)噻嗪		335/337

45	外消旋-3-氯-4-(2,2-二氟環丙基)-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		329/331
46	外消旋-反式-3-氯-4-[2-(二氟甲基)環丙基]-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		343/345
47	外消旋-反式-3-氯-4-[2-(1,1-二氟乙基)環丙基]-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		357/359
48	3-氯-4-環丁基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		307/309
49	3-氯-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-4-(3,3-二甲基環丁基)噻嗪		335/337
50	3-氯-4-(3,3-二氟環丁基)-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		343/345
51	3-氯-4-環戊基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪		321/323

【0141】

製備52

4-環丁基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪

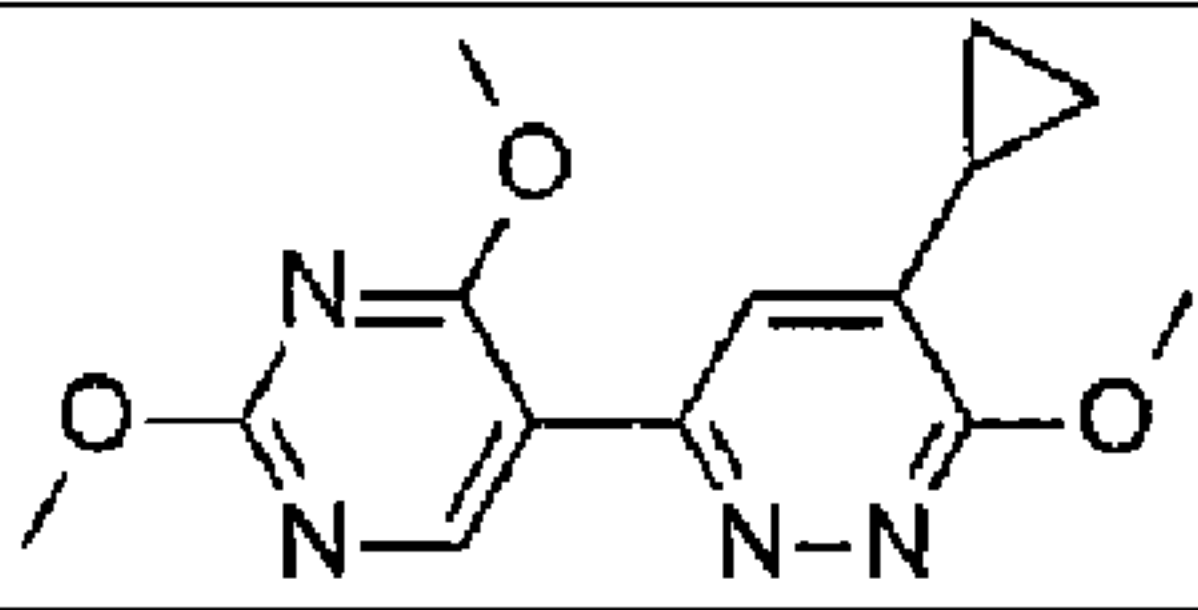
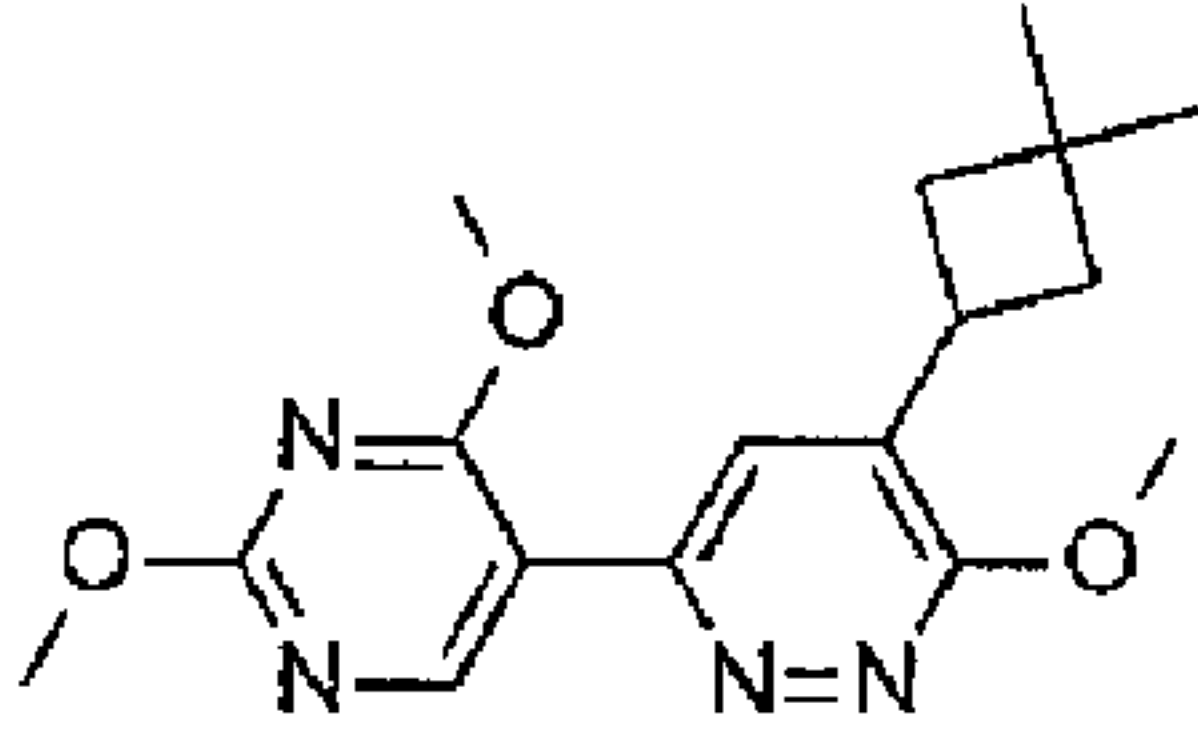
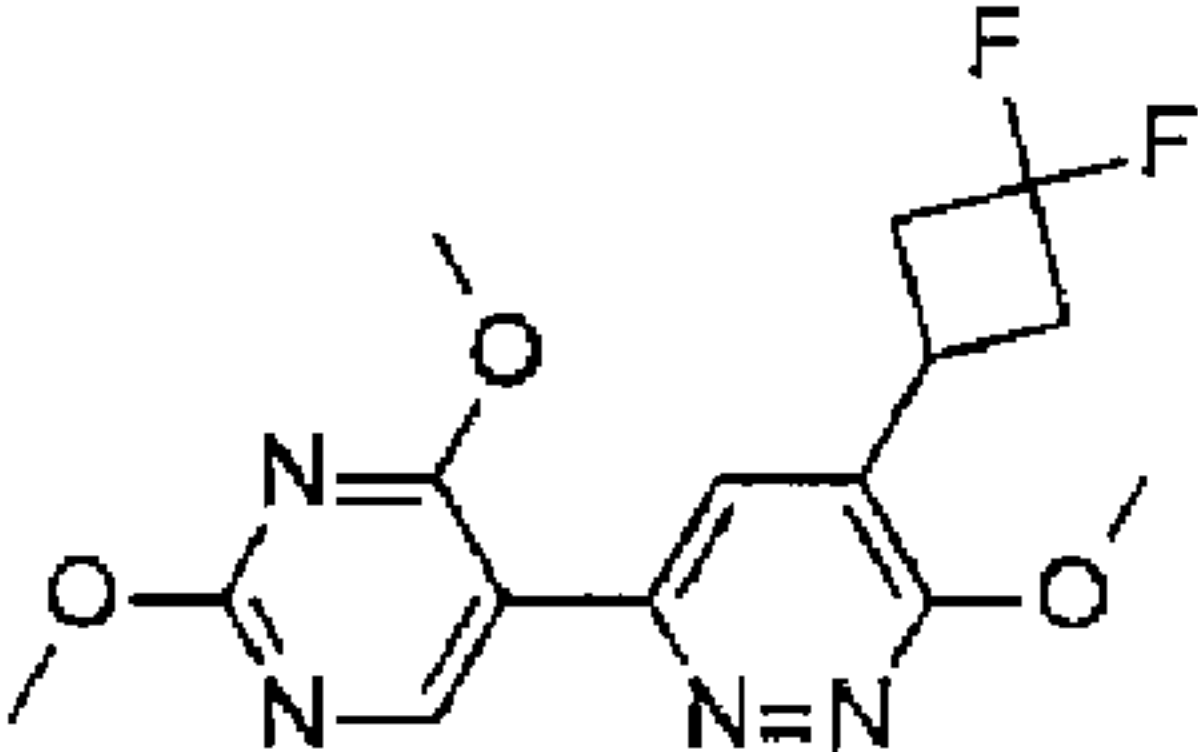
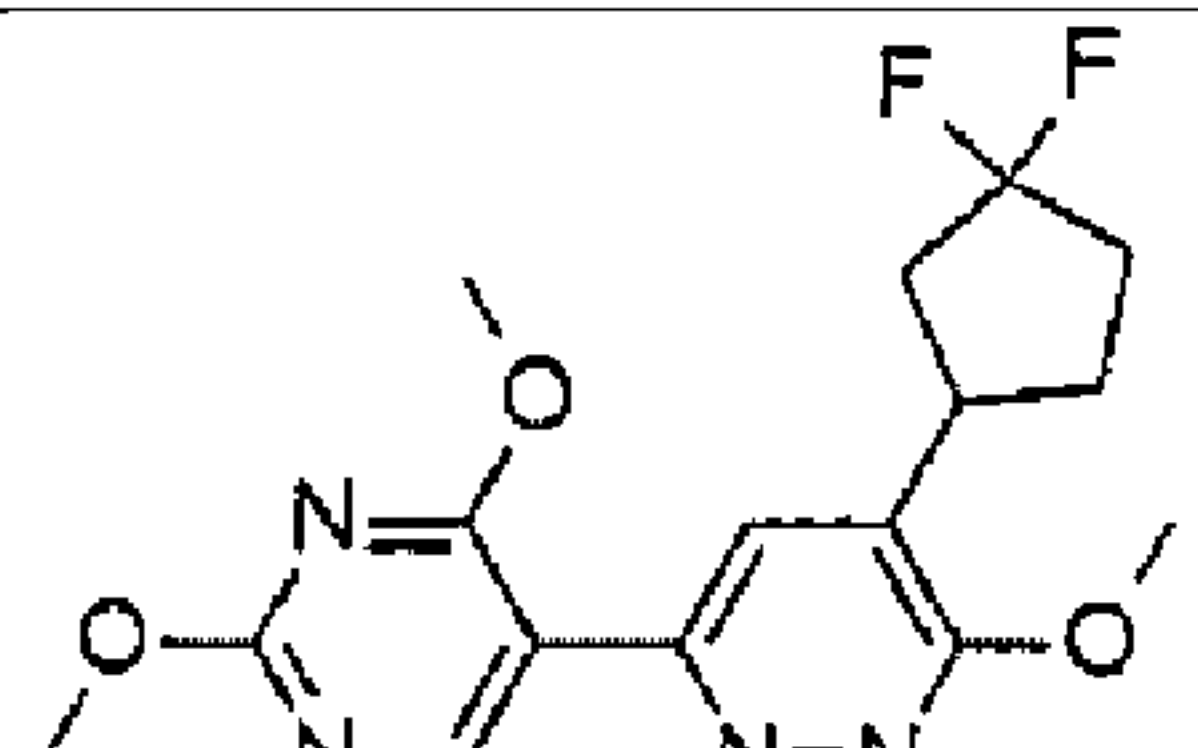
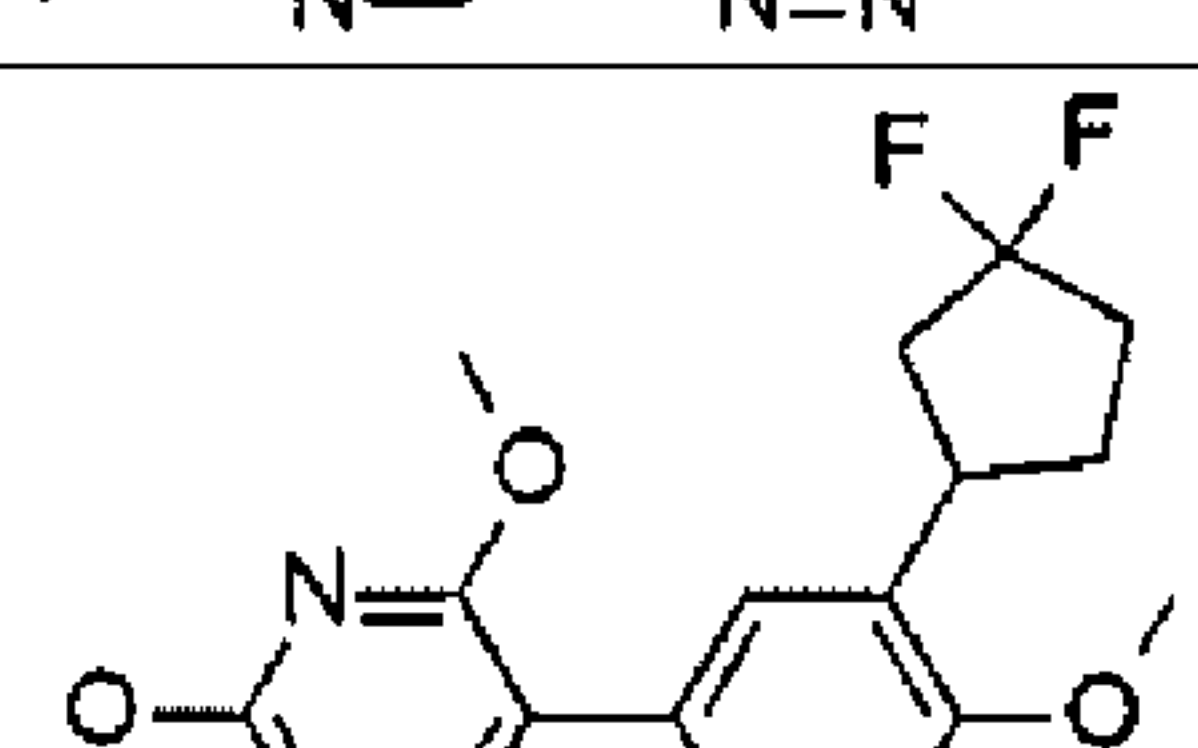
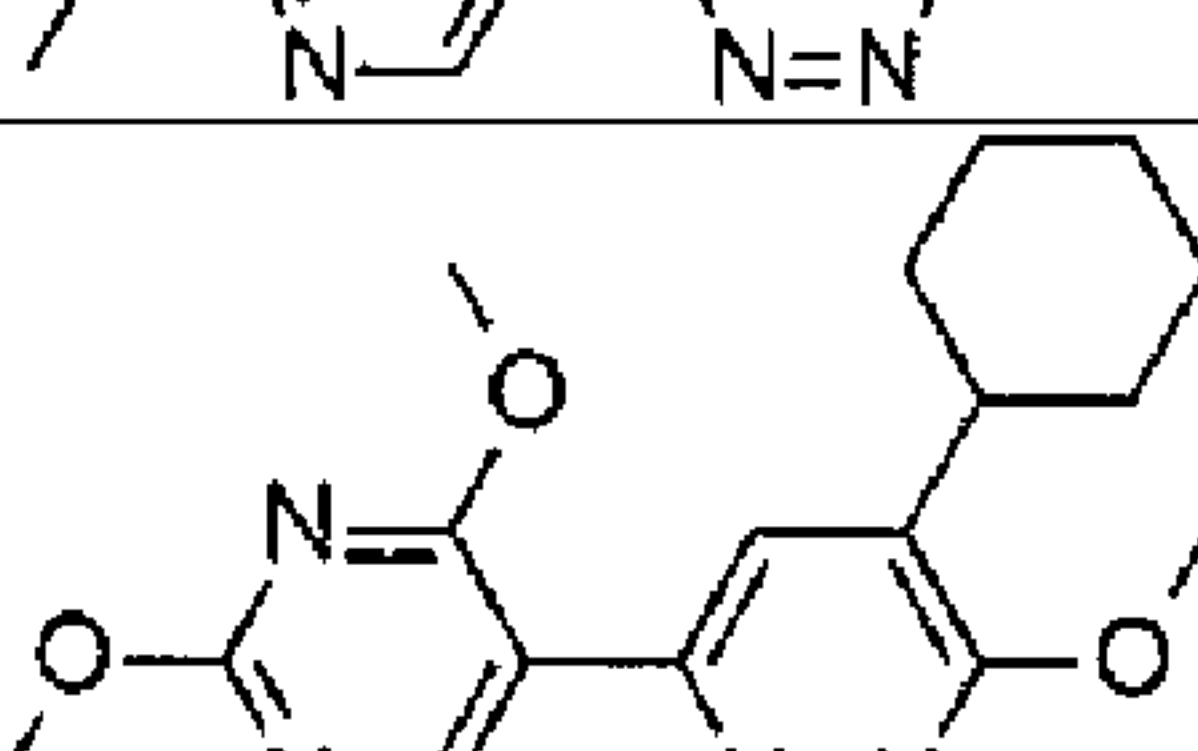


3-根據製備21及33自環丁基羧酸獲得氯-4-環丁基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪。

【0142】 將3-氯-4-環丁基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪(0.42 g，

1.4 mmol)添加至藉由將Na (0.16 g, 6.8 mmol)溶解於MeOH (12 mL)中所製備之NaOMe溶液中。在封蓋瓶中於60°C下加熱混合物隔夜。使混合物冷卻至RT，添加50%飽和NaCl水溶液且用DCM (3×)萃取。合併有機物且經無水MgSO₄乾燥。在減壓下移除溶劑以得到呈白色固體狀之標題化合物 (0.38 g, 93%)。ES/MS (m/z): 303 (M+1)。

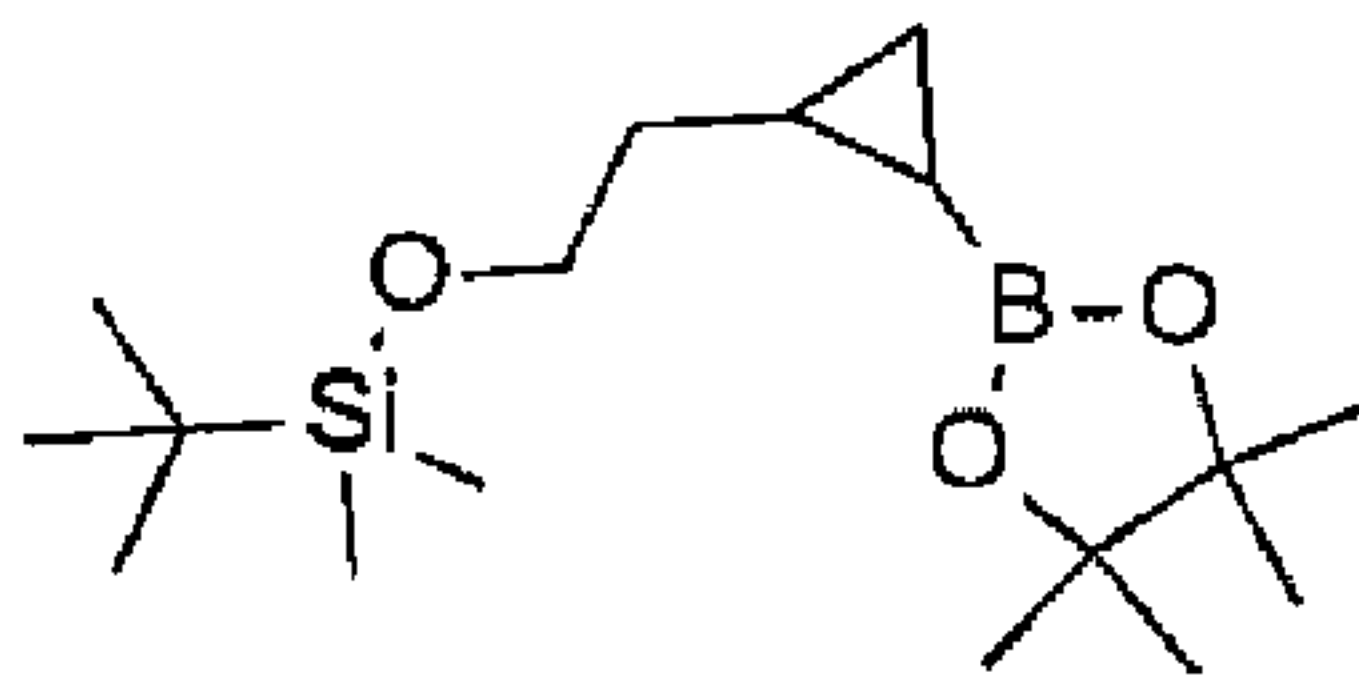
【0143】 以下實例可基本上如製備52中所描述來製備。

製備#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (M+H)
53	4-環丙基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪		289
54	5-[5-(3,3-二甲基環丁基)-6-甲氧基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘧啶		331
55	4-(3,3-二氟環丁基)-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪		339
56	4-(3,3-二氟環戊基)-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪(異構體1)		353
57	4-(3,3-二氟環戊基)-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪(異構體2)		353
58	4-環己基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪		331

【0144】

製備59

反式-第三丁基-二甲基-[2-[2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷-2-基)環丙基]乙氧基]矽烷

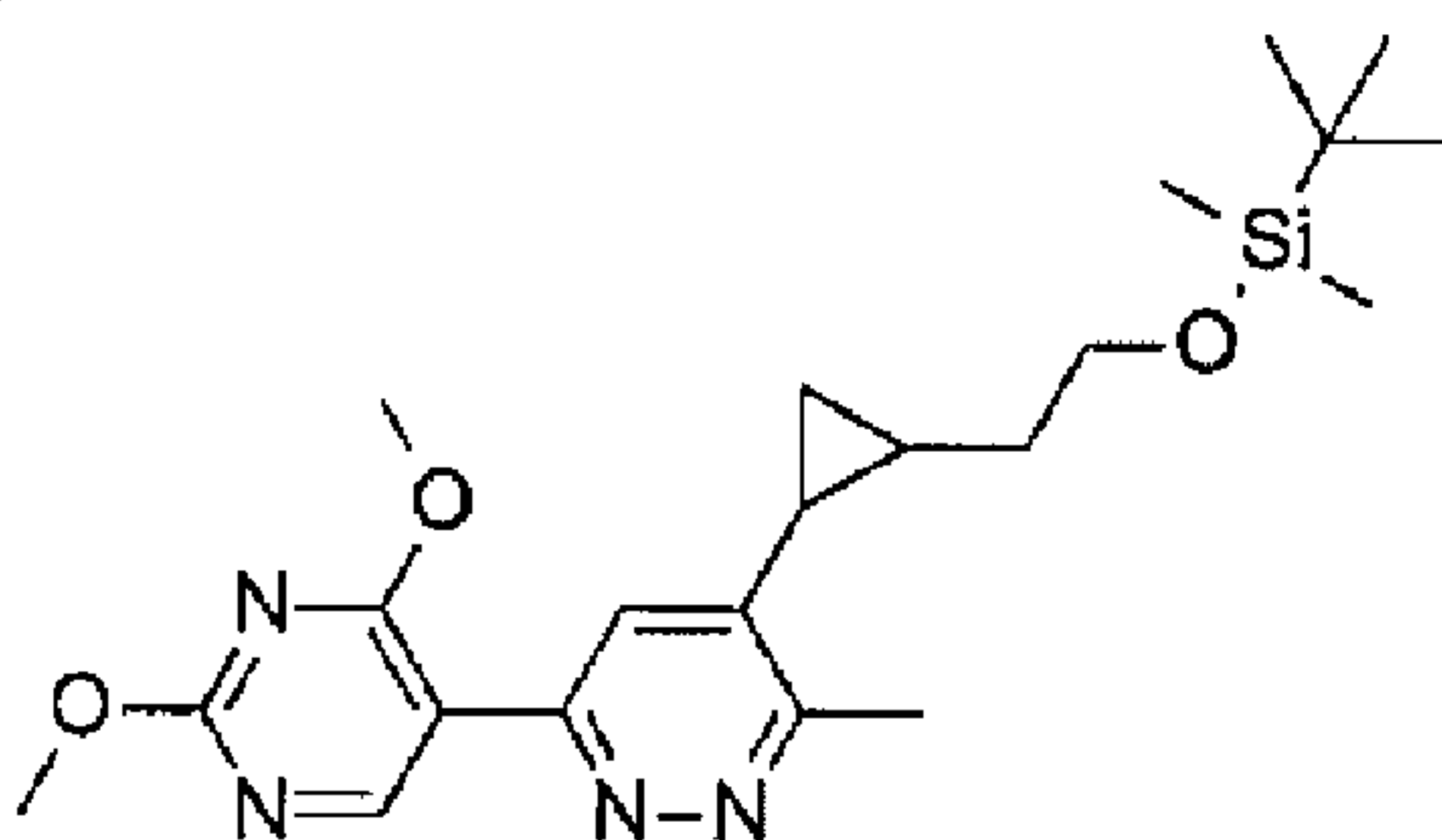


可基本上如製備3中所描述由市售第三丁基-二甲基-[(E)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷-2-基)丁-3-烯氧基]矽烷來製備。¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): 3.70-3.66 (m, 2H), 1.51-1.38 (m, 2H), 1.23 (s, 12H), 1.04-0.96 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.71-0.67 (m, 1H), 0.46-0.41 (m, 1H), 0.07 (s, 6H), -0.38 (dt, J= 9.3, 5.8 Hz, 1H)。

【0145】

製備60

反式-第三丁基-二甲基-[2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙氧基]矽烷

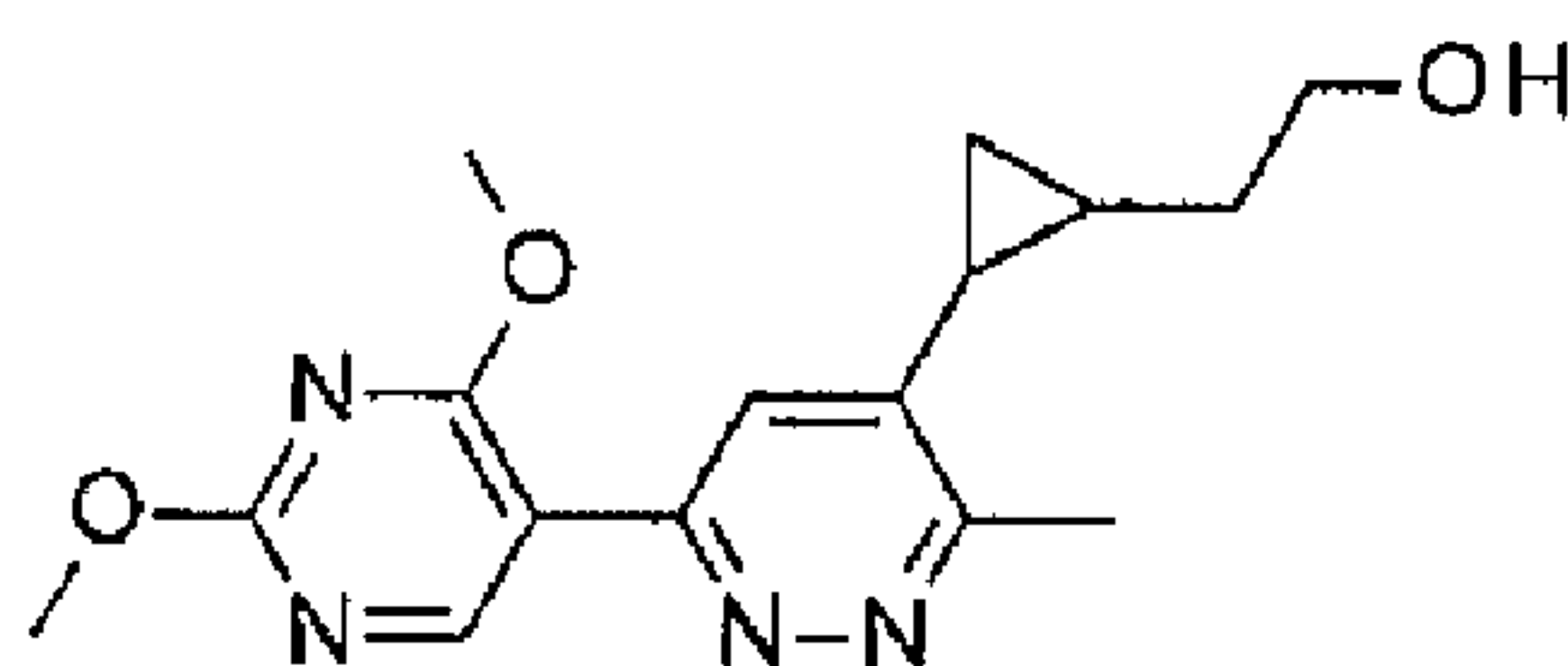


可基本上如製備4中所描述來製備。ES/MS (m/z): 417 (M+1)。

【0146】

製備61

反式-2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘓啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙醇

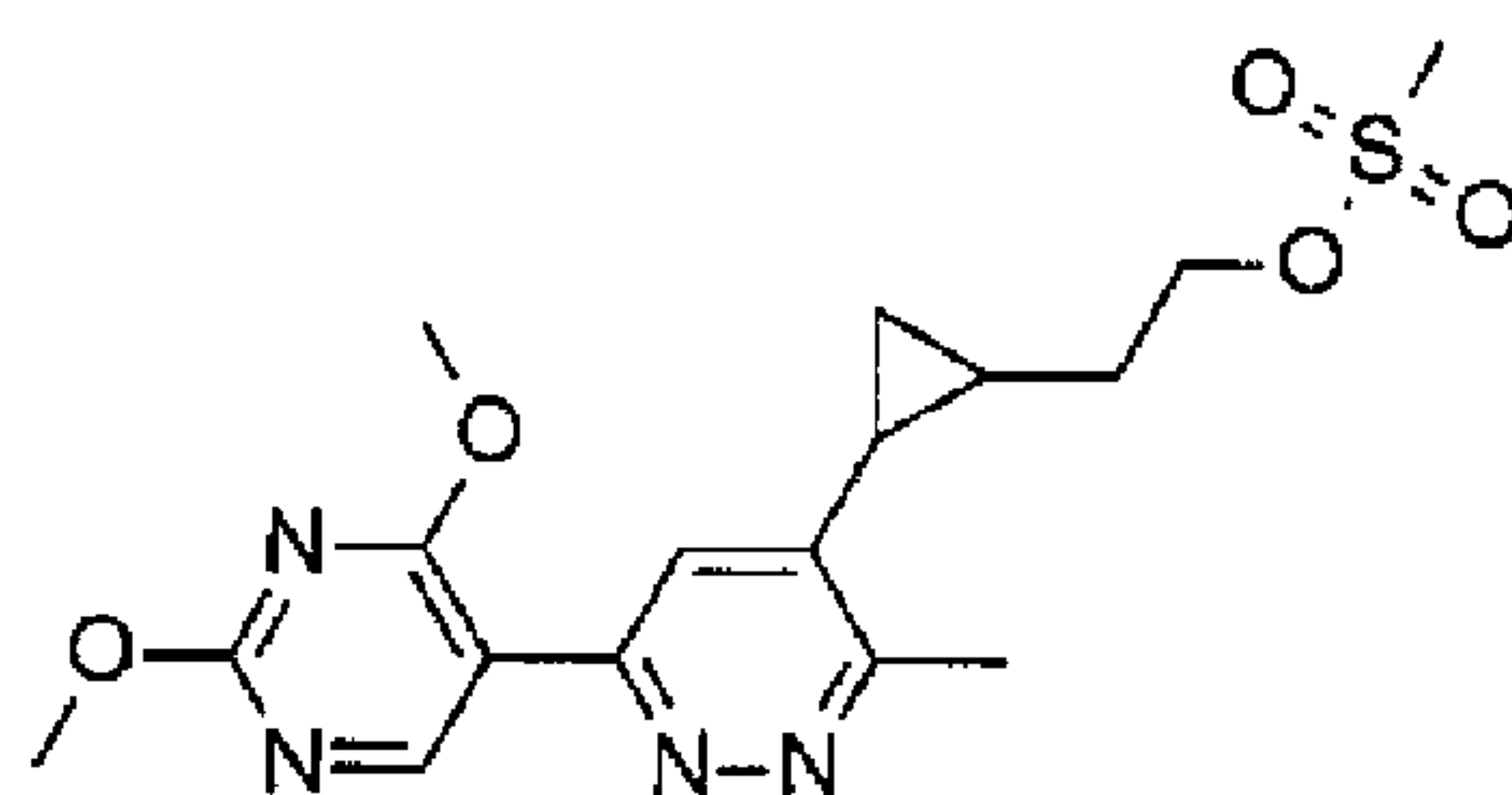


添加含氟化四丁銨(5 mL, 5 mmol, 1 M於THF中)及反式-第三丁基-二甲基-[2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙氧基]矽烷(1.15 g, 8.9 mmol)之DCM (3 mL)中且在60°C下攪拌1小時。冷卻至室溫。用DCM (80 mL)稀釋且用飽和NH₄Cl (3 × 30 mL)洗滌。合併有機物，經無水Na₂SO₄乾燥，且在減壓下移除溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑0-30% MeOH/EtOAc，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈白色固體狀之標題化合物(0.53 g, 53%)。ES/MS (m/z): 317 (M+1)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): 8.92 (s, 1H), 7.29 (m, 1H), 4.03 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.81 (t, J= 6.2 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 1.73-(m, 3H), 1.26 (m, 2H), 1.03(m, 2H)。

【0147】

製備62

反式-2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙基甲磺酸酯



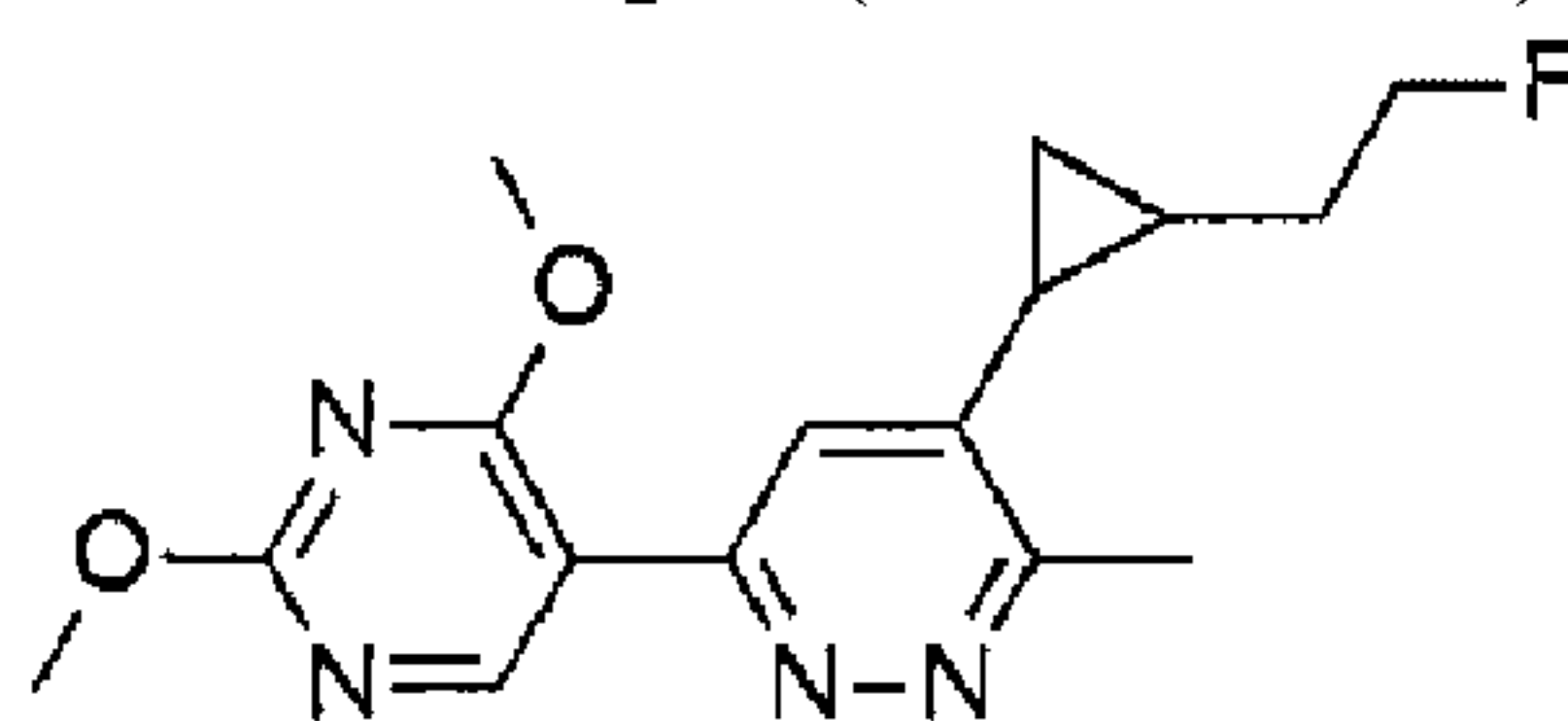
在0°C下在N₂下將甲磺醯氯(0.2 mL, 3 mmol)添加至反式-2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙醇(0.390 g, 1.22 mmol)及N,N-二異丙基乙胺(0.4 mL, 2 mmol)於DCM (8 mL)中之溶液中。在0°C下攪拌40分鐘。用50 mL DCM稀釋且用5% NaHCO₃ (2 × 30 mL)及水(30 mL)洗滌。合併有機物，經無水Na₂SO₄乾燥，且在減壓下蒸發溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑：0-20% MeOH/EtOAc，以在自層

析溶離份移除溶劑之後得到呈褐色固體狀之標題化合物(0.280 g, 58%)。ES/MS (m/z): 395 (M+1)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): 8.98 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 4.37 (t, J= 6.2 Hz, 2H), 4.07 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 2.04 (m, 1H), 1.90-1.78 (m, 2H), 1.27 (m, 1H), 1.06 (t, J= 7.1 Hz, 2H)。

【0148】

製備63

反2,4-二甲氧基-5-[6-甲基-5-[2-(2-氟乙基)環丙基]噻嗪-3-基]嘧啶



將氟化四丁銨水合物(3 mL, 3 mmol, 1 M於THF中)添加至反式-2-[2-[6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲基-噻嗪-4-基]環丙基]乙基甲磺酸酯(0.280 g, 0.71 mmol)於THF (3 mL)中之溶液中。在70°C下加熱2小時。冷卻至RT。用EtOAc稀釋，用NaCl飽和水溶液洗滌，經無水Na₂SO₄乾燥，且在減壓下移除溶劑。藉由矽膠層析純化，溶離劑：0-20% MeOH/EtOAc，以在自層析溶離份移除溶劑之後得到呈淡黃色油狀之標題化合物(0.170 g, 71%)。ES/MS (m/z): 319 (M+1)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): 9.01 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 4.67-4.52 (dt, J_{H-F} 48 Hz, J= 6.7 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.00-1.94 (m, 3H), 1.27 (m, 1H), 1.06 (m, 2H)。

【0149】對掌性分離：管柱Lux Cellulose-4, 250 × 21 mm, 流動速率70 g/min, 溶離劑：40% MeOH/CO₂。

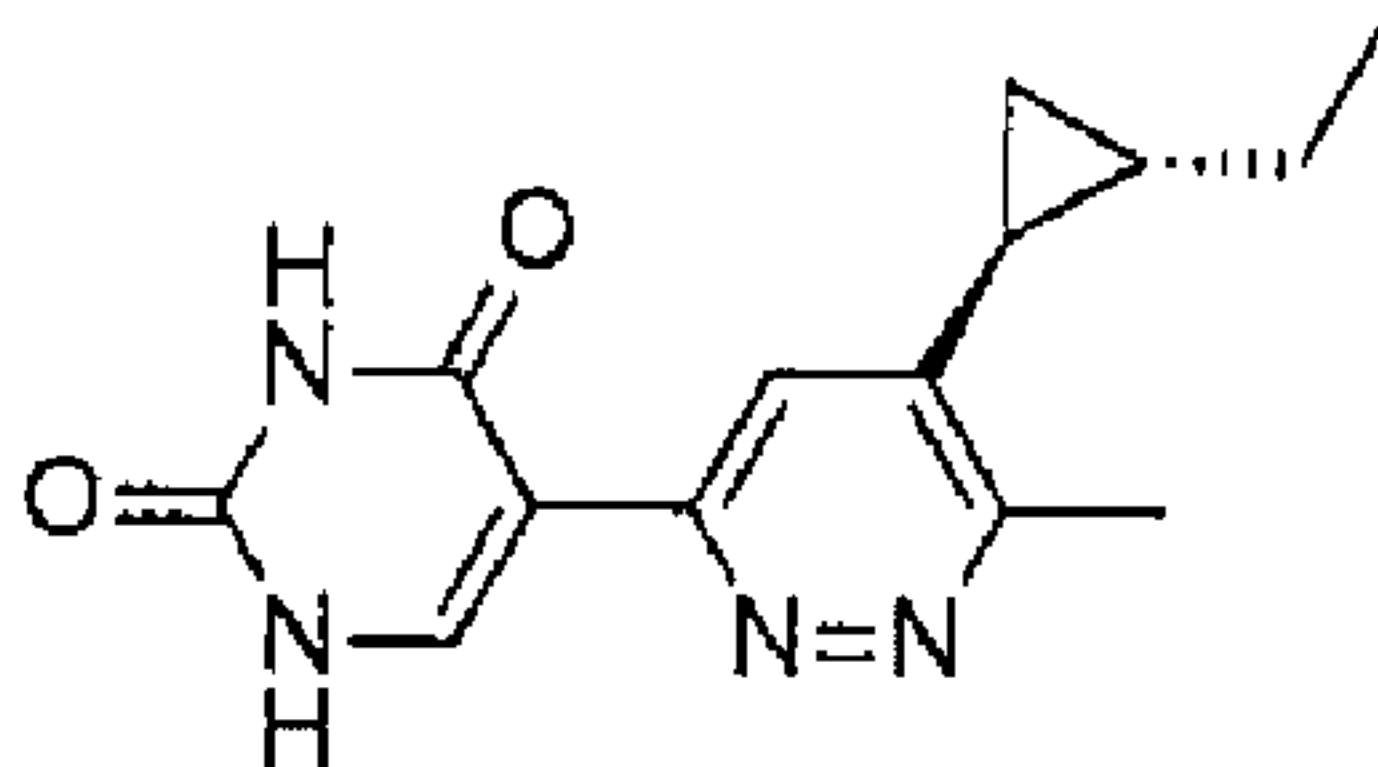
【0150】對映異構體1 > 99% ee, rt 2.59 min (Lux Cellulose-4,

4.6 × 150 mm, 40% MeOH/CO₂, 5 mL/min, 225 nm)。對映異構體2 > 99% ee, rt 3.34 min (Lux Cellulose-4, 4.6 × 150 mm, 40% MeOH/CO₂, 5 mL/min, 225 nm)。

【0151】

實例1

5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮



將5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘧啶異構體1 (197 mg, 0.66 mmol)溶解於1 M HCl水溶液(4 mL)中且將所得混合物加熱至70°C隔夜。冷卻反應混合物至RT, 在-78°C下在丙酮/乾冰浴中冷凍, 且藉由凍乾移除溶劑, 以得到呈淡黃色固體狀之標題化合物(0.176 g, 97%)。ES/MS (m/z): 273 (M+H)。¹H NMR (d₆-DMSO) δ: 1.00 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 1.11-1.16 (m, 1H), 1.27-1.33 (m, 2H), 1.47-1.52 (m, 2H), 1.92-1.96 (m, 1H), 2.80 (s, 3H), 8.00 (s, 1H), 8.41 (d, J= 5.5 Hz, 1H), 11.73 (s, 1H), 11.99-11.91 (m, 1H)。

【0152】

實例1-5之替代程序

在45°C下攪拌5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘧啶(16.2 g, 51.5 mmol)及1 M HCl水溶液(135 mL, 135 mmol)之懸浮液16小時。冷卻至RT, 添加2 M K₂HPO₄水溶液至pH為約6 (約150 mL), 且在RT下攪拌16小時。過濾及收集所得固體, 用水洗滌, 且在45°C下在真空烘箱中乾燥16小時, 以得到呈白色固體狀之標題化合

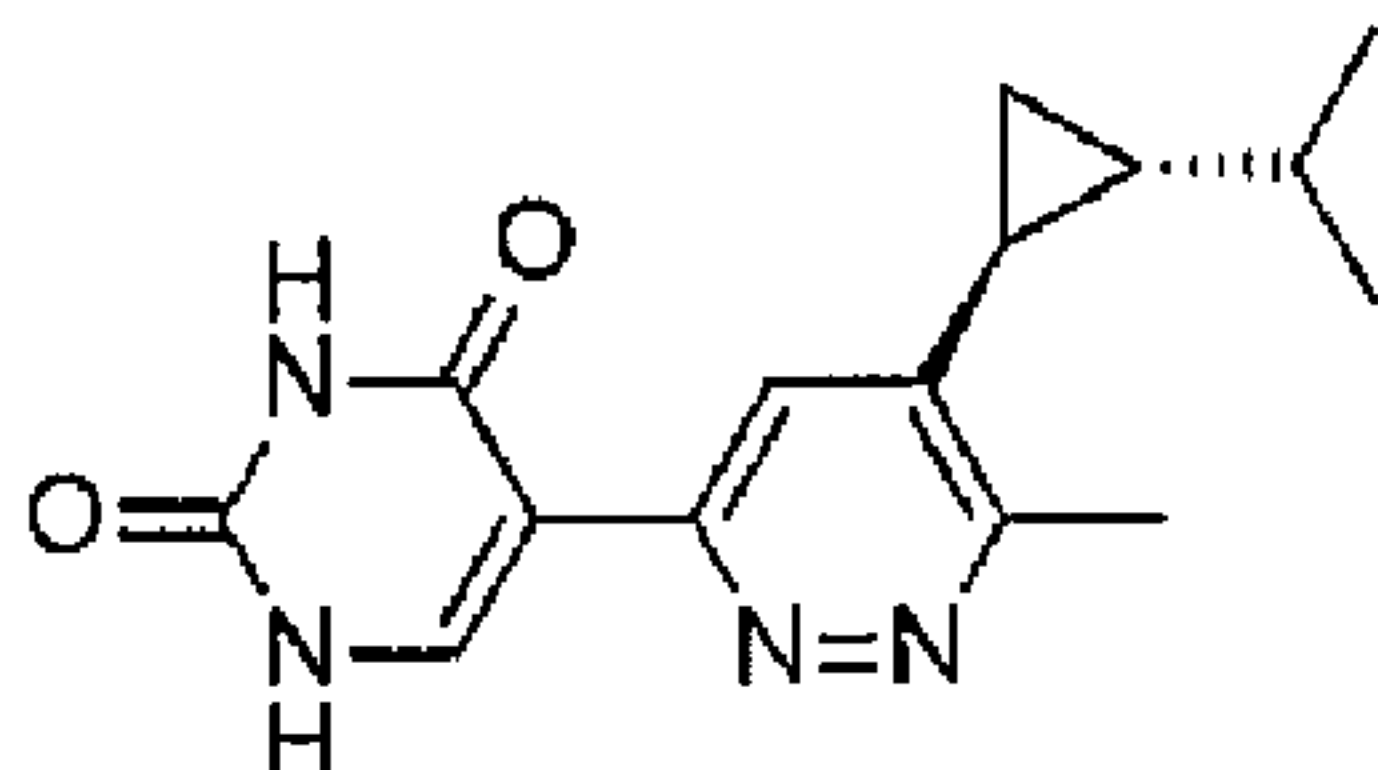
物(13.8 g, 93%)。ES/MS (m/z): 273 (M+1)。使5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮結晶

【0153】 將5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-溶解於甲醇中，在50°C下攪拌1小時且使其冷卻至環境溫度，其中其自溶液中結晶。藉由真空過濾分離固體且在70°C下在真空下短暫乾燥。

【0154】

實例2

5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮



將反式-5-[5-[2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘧啶異構體1 (628 mg, 2.00 mmol)溶解於MeOH (3 mL)中。添加1 M HCl水溶液(5 mL)且加熱至70°C持續3小時。冷卻至RT，將反應混合物負載於經MeOH洗滌之SCX管柱(20 g, Silicycle SILIABOND對甲苯磺酸)上，用MeOH (140 mL)洗滌SCX管柱且用2 M NH₃/MeOH (140 mL)溶離所要產物。濃縮NH₃/MeOH溶離份以獲得呈奶黃色固體狀之標題化合物(546 mg, 95%)。ES/MS (m/z): 287 (M+H)。¹H NMR (d₆-DMSO) δ: 0.99 (m, 9H), 1.24 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 7.67 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 11.43 (bs, 2H)。

【0155】

實例1-5之替代程序

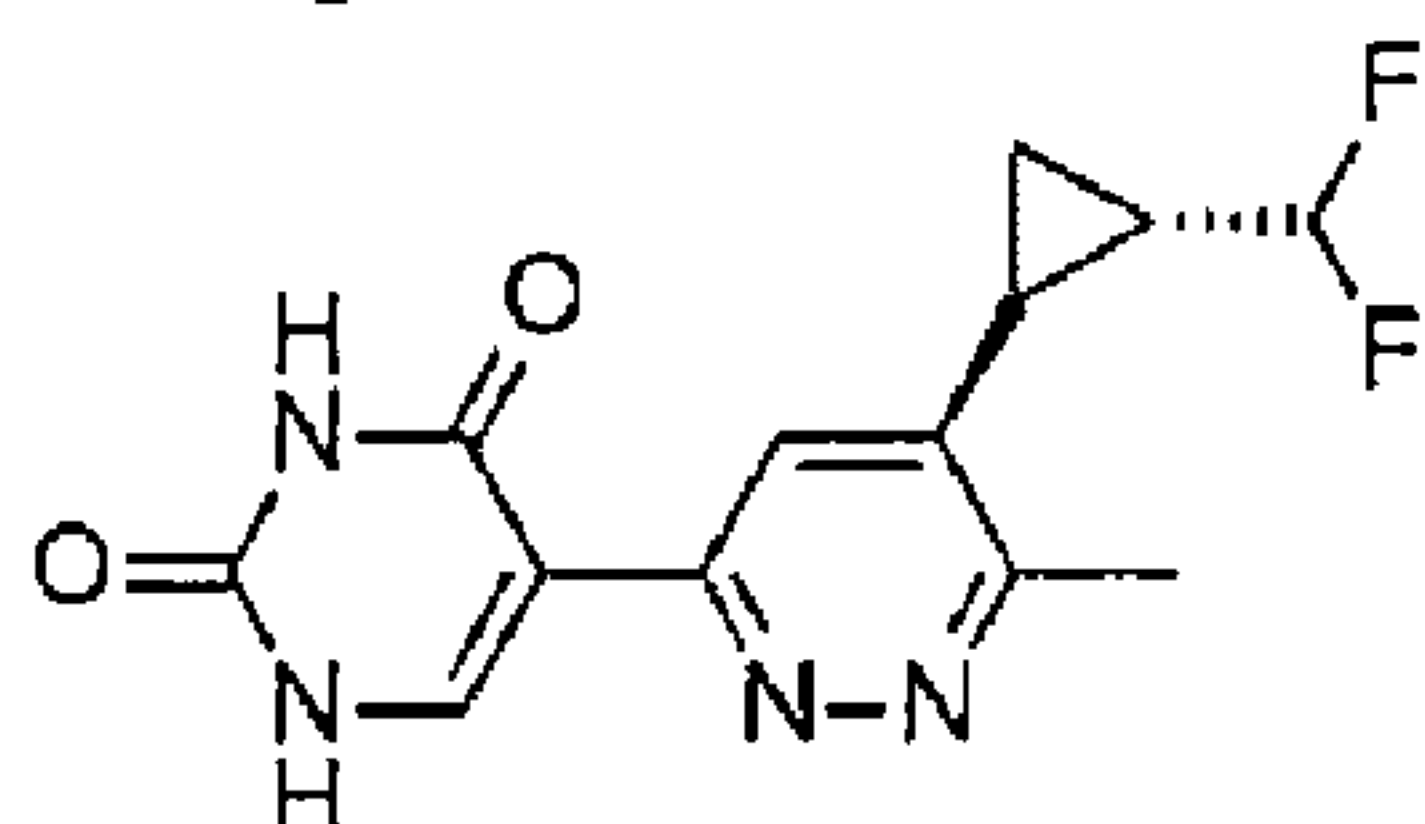
在45°C下攪拌5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-2,4-二甲氧基-嘧啶(21.5 g, 65.6 mmol)及1 M HCl水溶液(165 mL, 135

mmol)之懸浮液16小時。冷卻至RT且用MTBE萃取。丟棄有機相且向水相添加2 M K_2HPO_4 水溶液直至pH為約6 (約150 mL)為止。在RT下攪拌所得混合物16小時。過濾及收集所得固體，用水洗滌且在45°C下在真空烘箱中乾燥16小時，以得到呈白色固體狀之標題化合物(14.3 g, 76%)。ES/MS (m/z): 287 (M+1)。

【0156】

實例3

5-[5-[2-(二氟甲基)環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮



可基本上如實例1中所描述來製備5-[5-[2-(二氟甲基)環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮。

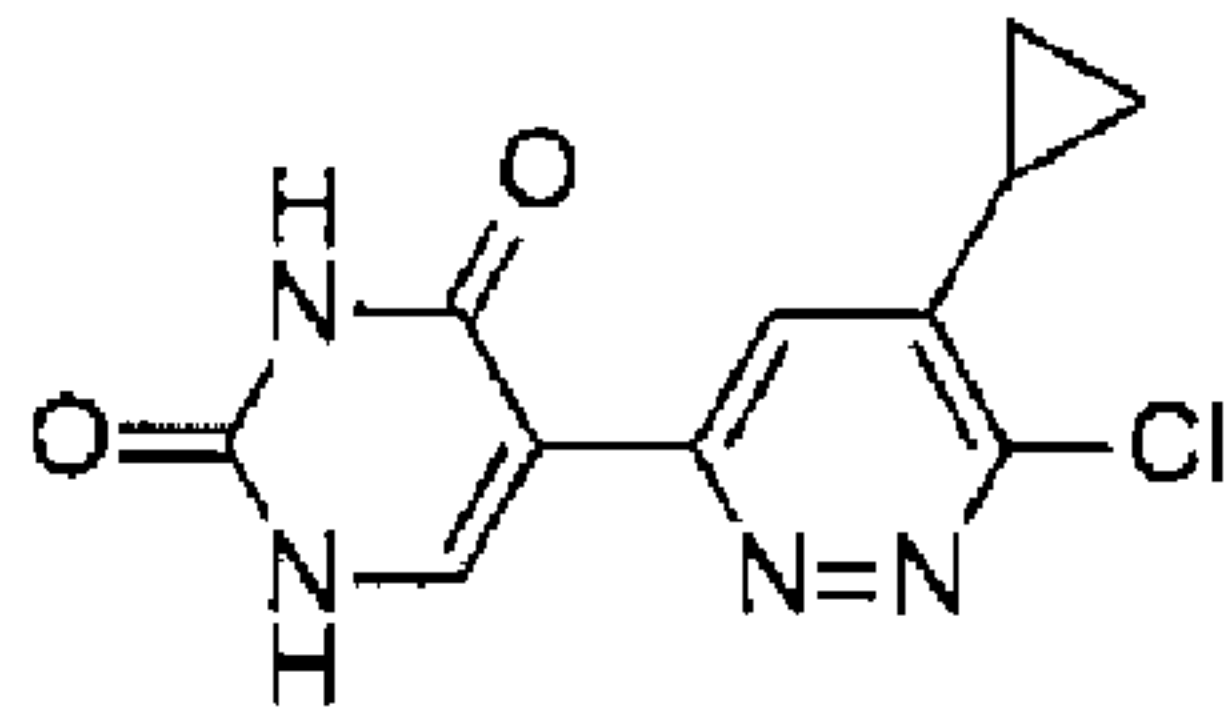
【0157】 以下實例可基本上如實例1中所描述來製備。

實例#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (M+H)
4	5-[6-甲基-5-[rel-(1S,2S)-2-異丁基環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮		301
5	5-[6-甲基-5-[rel-(1S,2S)-2-(1,1-二氟乙基)環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮		309
6	5-[5-[(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮		281

【0158】

實例7

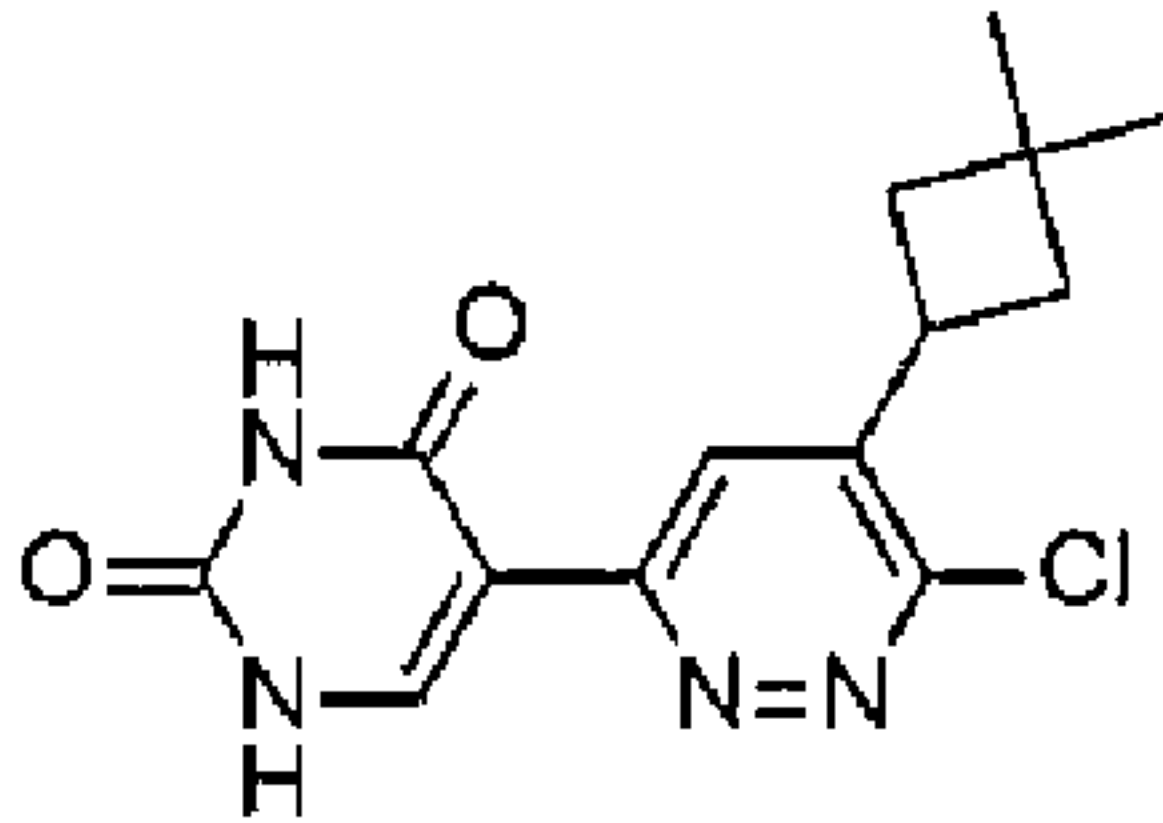
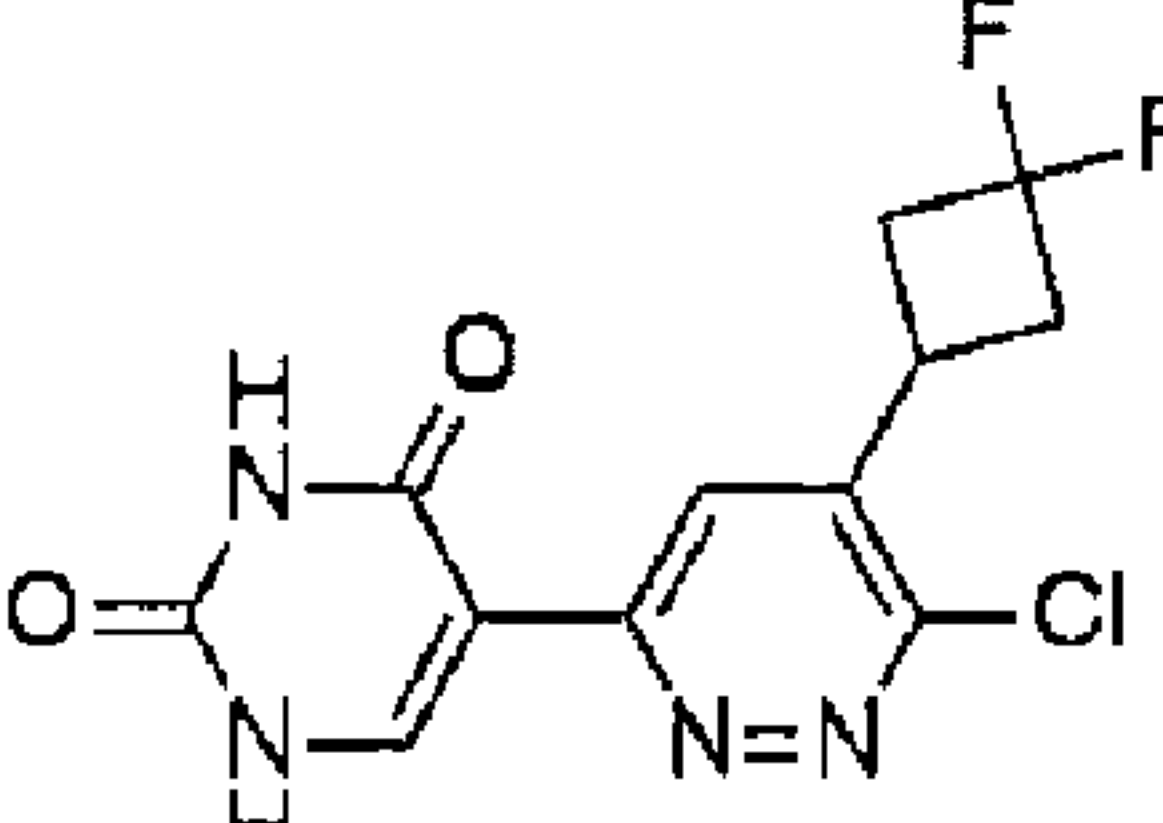
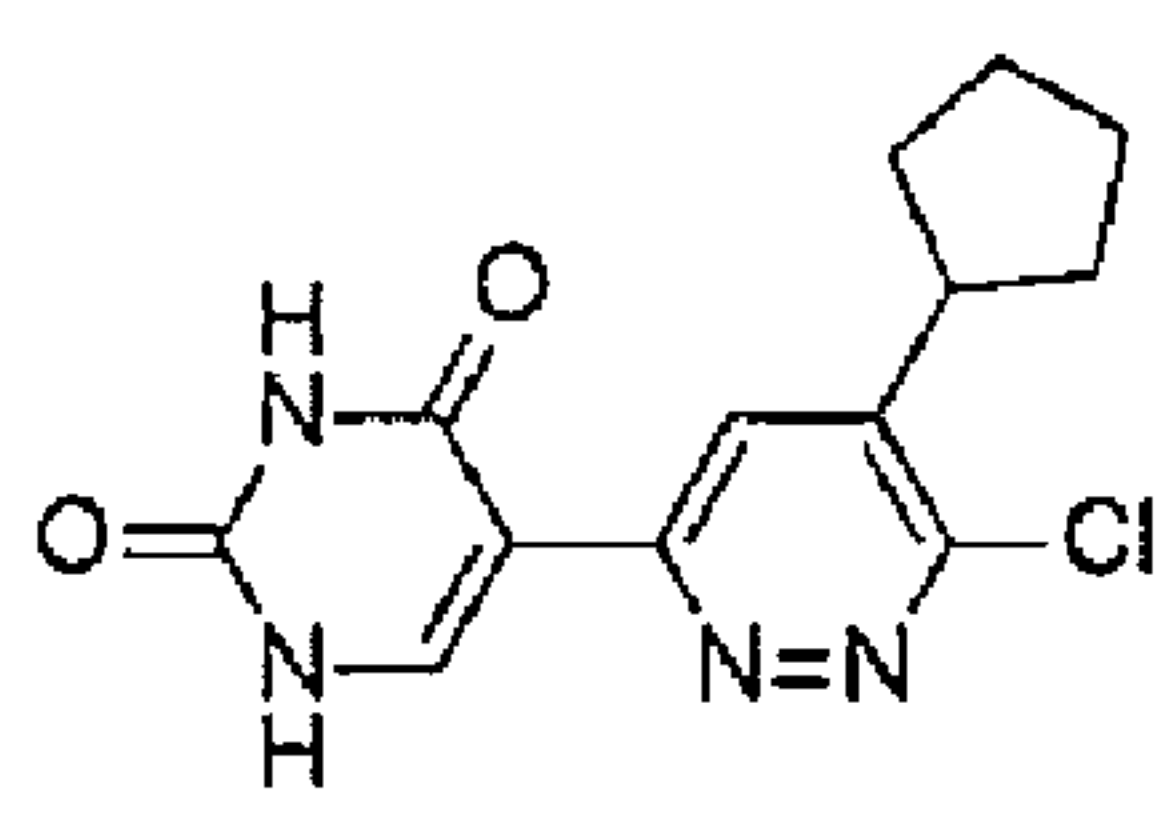
5-(6-氯-5-環丙基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮



將1 M HCl (14 mL, 14 mmol)添加至3-氯-4-環丙基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)噻嗪(1.0 g, 3.4 mmol)於MeOH (17 mL)中之溶液中且在50 °C下攪拌隔夜。在減壓下移除溶劑以得到呈白色固體狀之標題化合物(0.9 g, 100%)。ES/MS (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 265/267

【0159】 以下實例可基本上如實例7中所描述來製備。

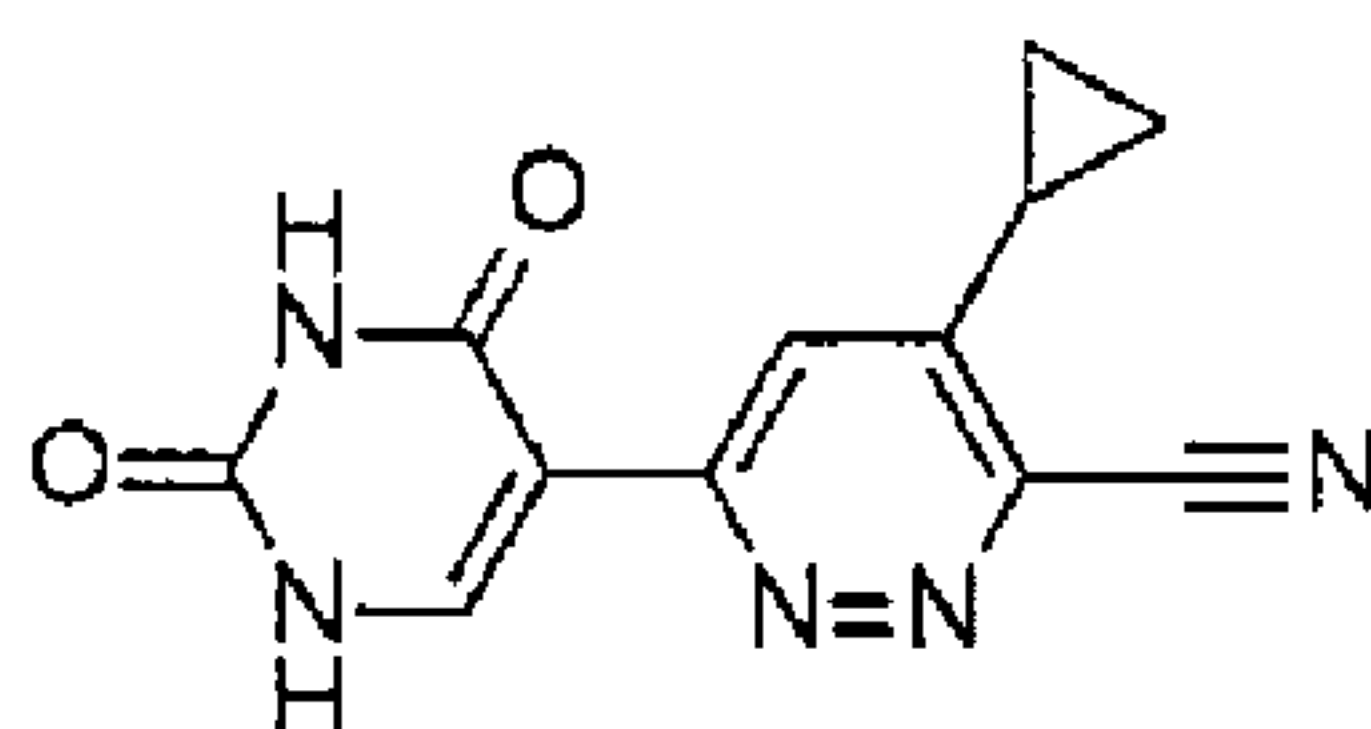
實例#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
8	5-[6-氯-5-[rel-(1S,2R)-2-異丙基環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		307/309
9	5-[6-氯-5-[rel-(1R)-2,2-二氟環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		301/303
10	5-[6-氯-5-[(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		315/317
11	5-[6-氯-5-[rel-(1S,2S)-2-(1,1-二氟乙基)環丙基]噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		329/331
12	5-(6-氯-5-環丁基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮；鹽酸鹽		279/281

13	5-[6-氯-5-(3,3-二甲基環丁基)噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		307/309
14	5-[6-氯-5-(3,3-二氟環丁基)噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		315/317
15	5-(6-氯-5-環戊基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮		293/295

【0160】

實例16

4-環丙基-6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)噻嗪-3-甲腈



用N₂使5-(6-氯-5-環丙基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮(A, 57 mg, 0.22 mmol, 100質量%)於DMF (1 mL, 12.9 mmol)中之溶液脫氣。添加Zn(CN)₂ (20 mg, 0.22 mmol)、參(二亞苳基丙酮)二鈣(0) (5 mg, 0.0054 mmol)及1,1'-雙(二苳基磷基)二茂鐵(6 mg, 0.011 mmol)且進一步用N₂脫氣。緊密封蓋且在120°C下加熱隔夜。冷卻至RT且經由矽藻土過濾。藉由反相層析(C18 Gold 15.5 g, 梯度5-20% ACN/10 mM碳酸氫銨; 20 CV)純化以分離呈淡黃色固體狀之標題化合物(0.032 g, 58%)。ES/MS (m/z): 256 (M+1)。

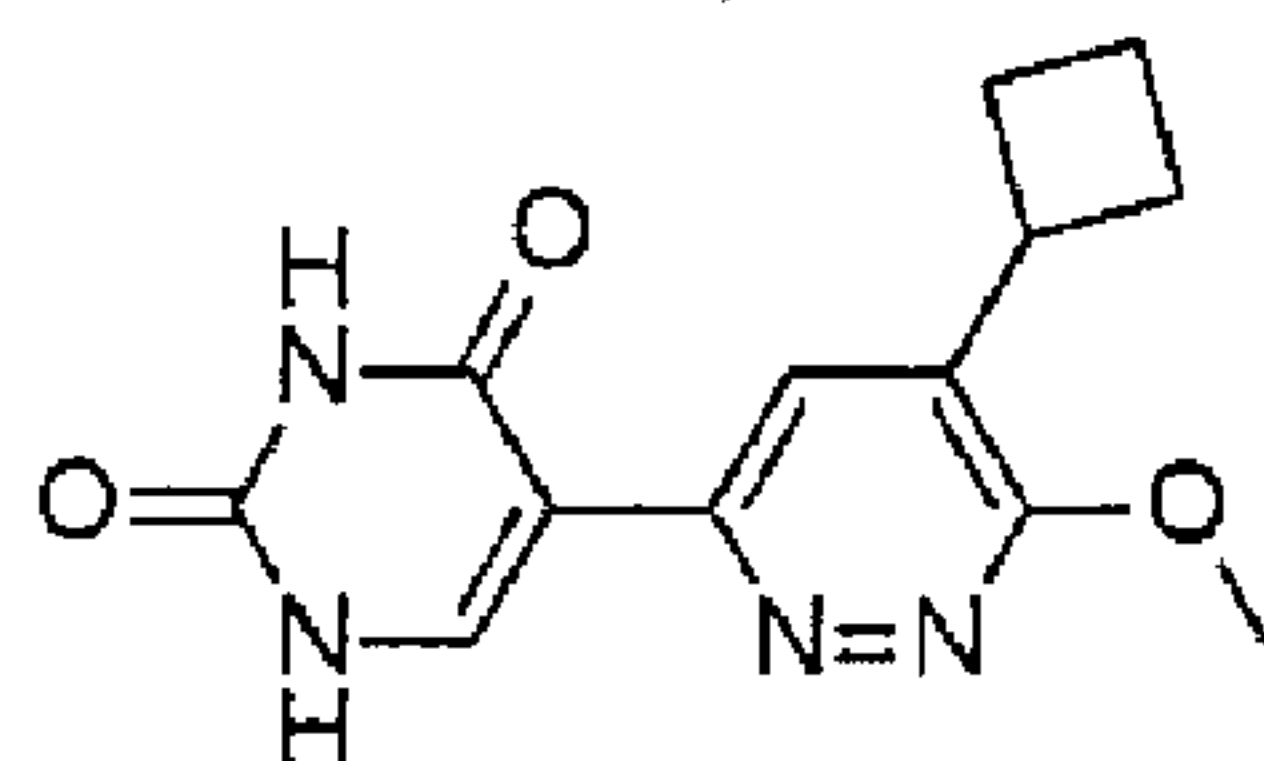
【0161】 以下實例可基本上如實例16中所描述來製備。

實例#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (M+H)
17	6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)-4-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]噻嗪-3-甲腈		298
18	6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)-4-[rel-(1S,2S)-2-(二氟甲基)環丙基]噻嗪-3-甲腈		306
19	4-環丁基-6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)噻嗪-3-甲腈		270
20	4-環戊基-6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)噻嗪-3-甲腈		284
21	4-[(1S)-2,2-二氟環丙基]-6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)噻嗪-3-甲腈		292
22	6-(2,4-二側氧基-1H-嘧啶-5-基)-4-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]噻嗪-3-甲腈		284

【0162】

實例23

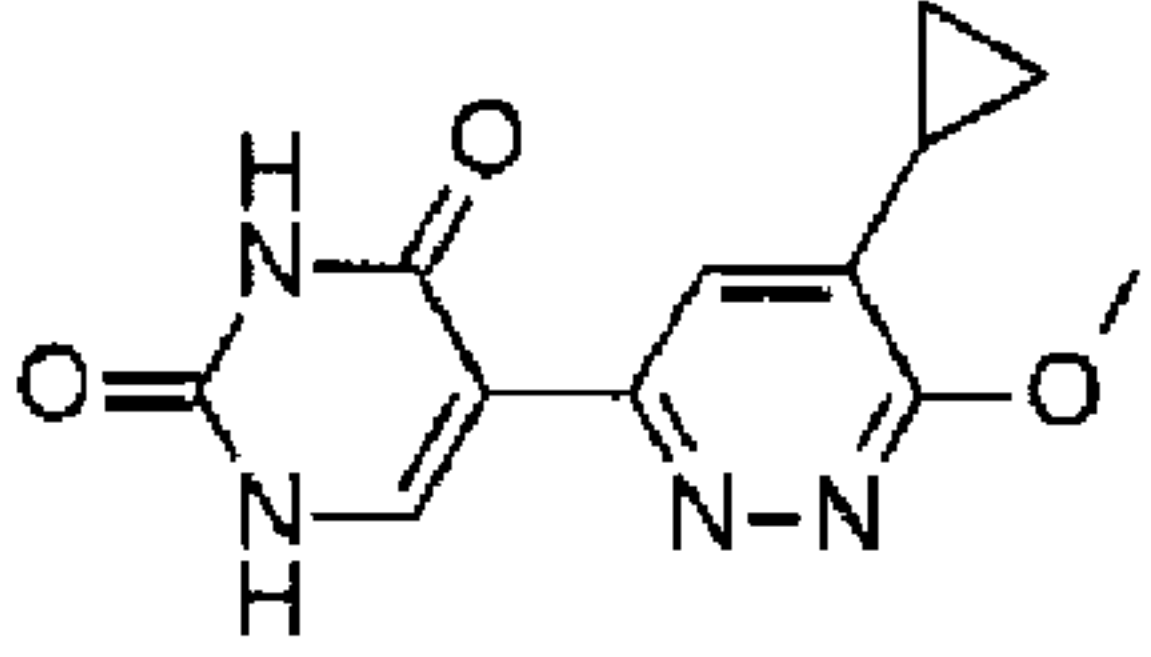
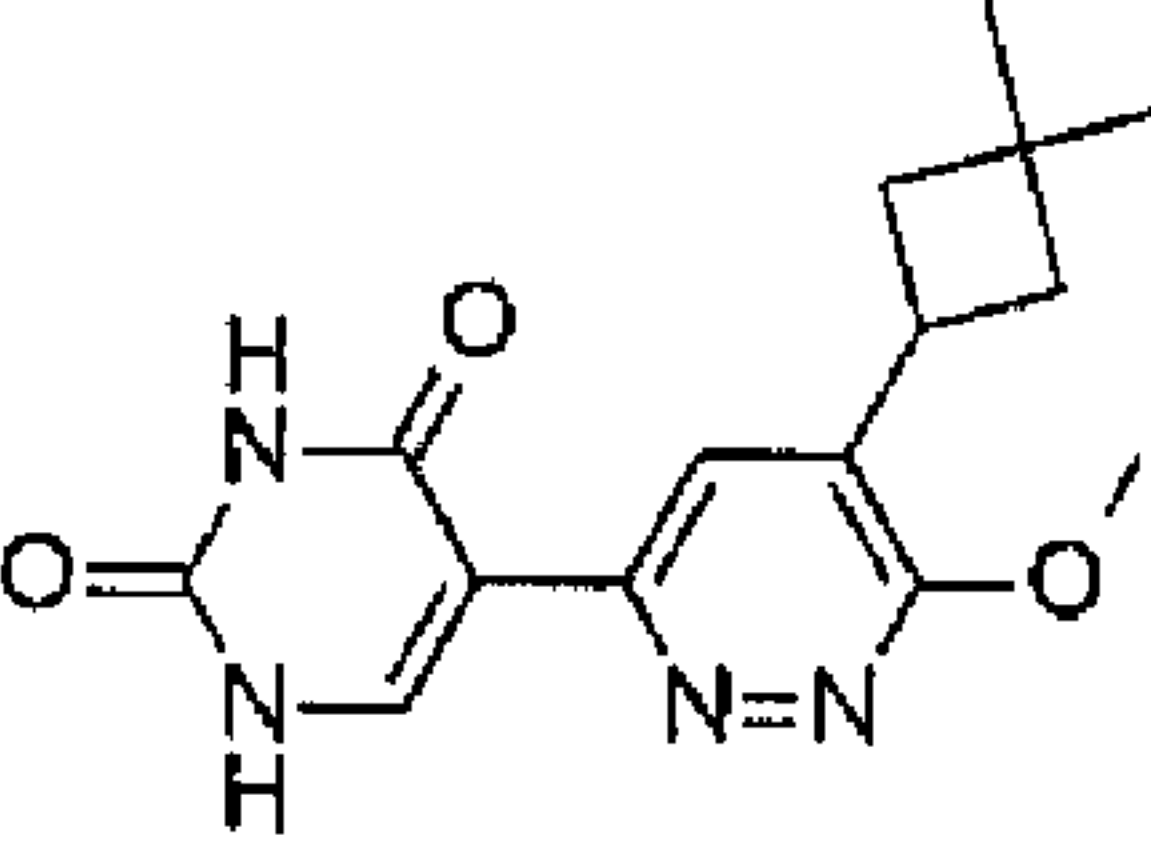
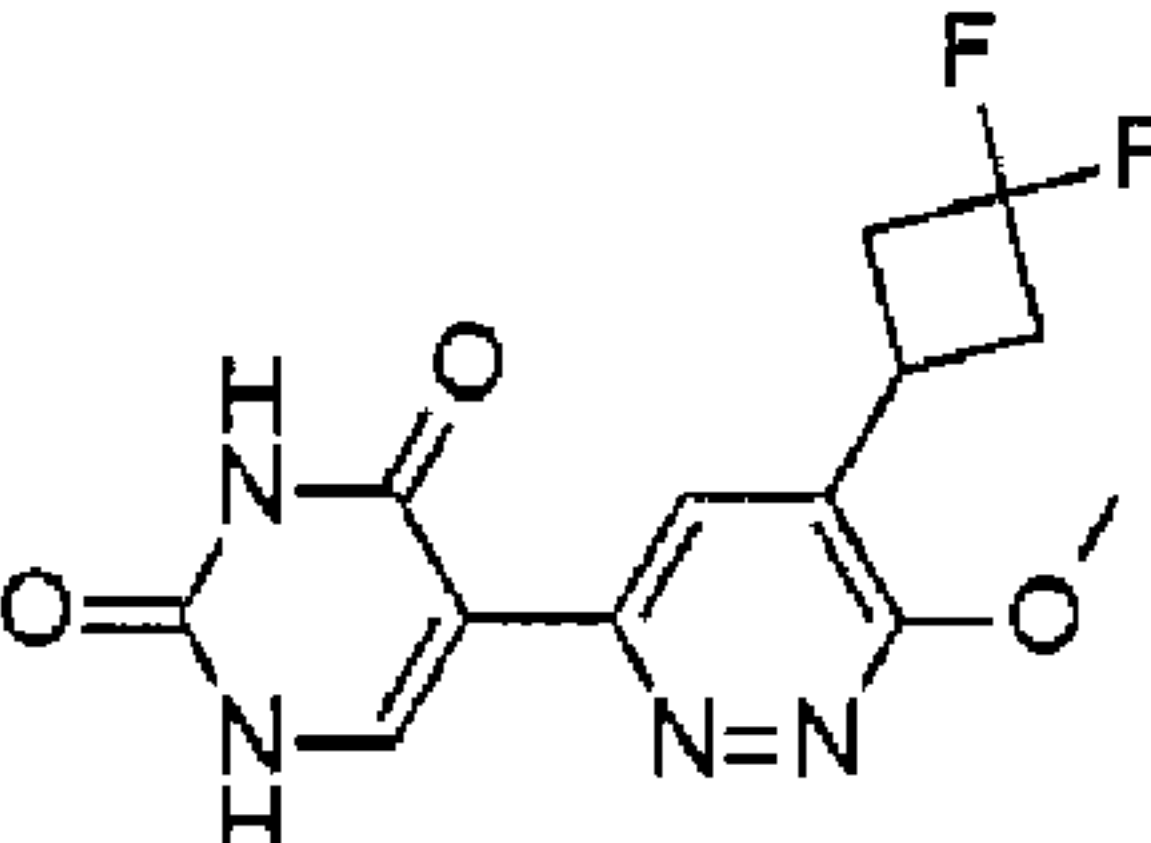
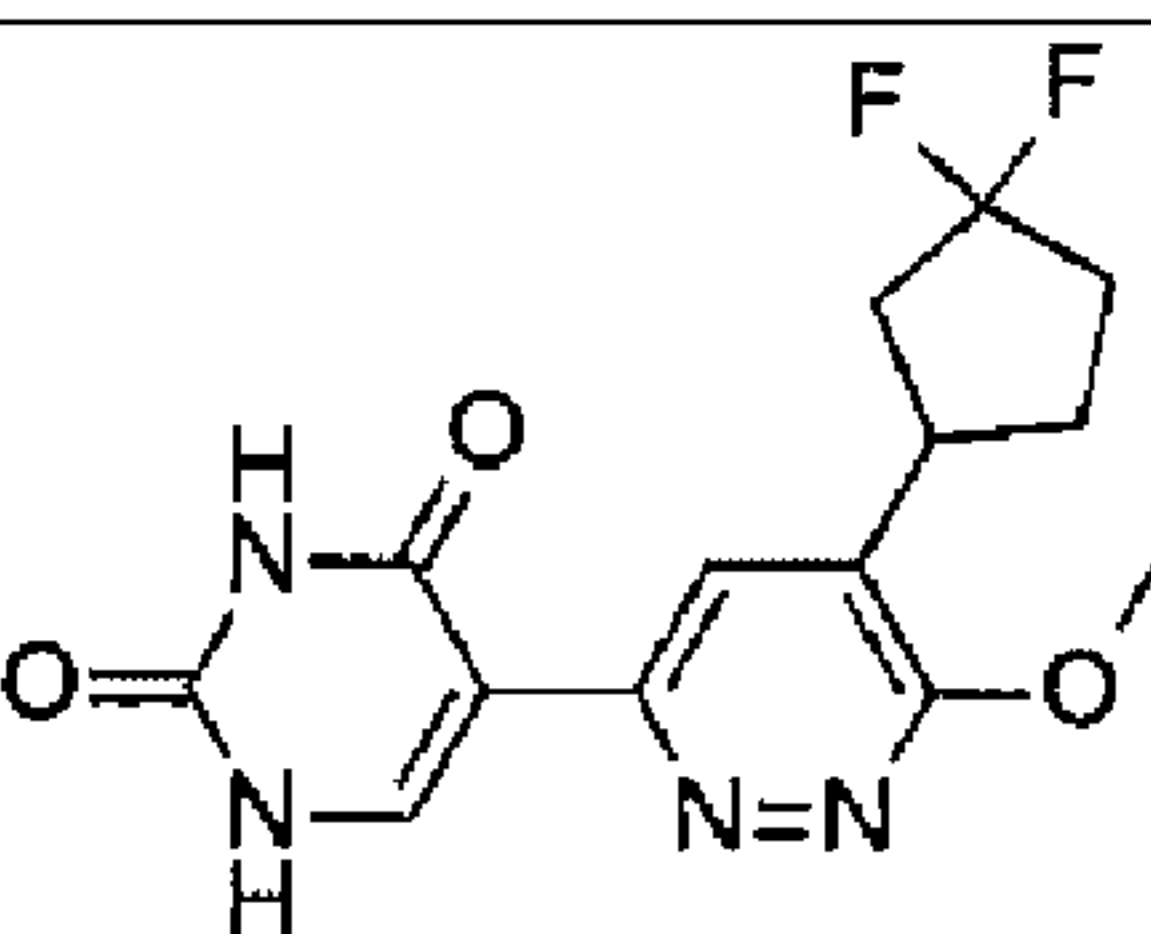
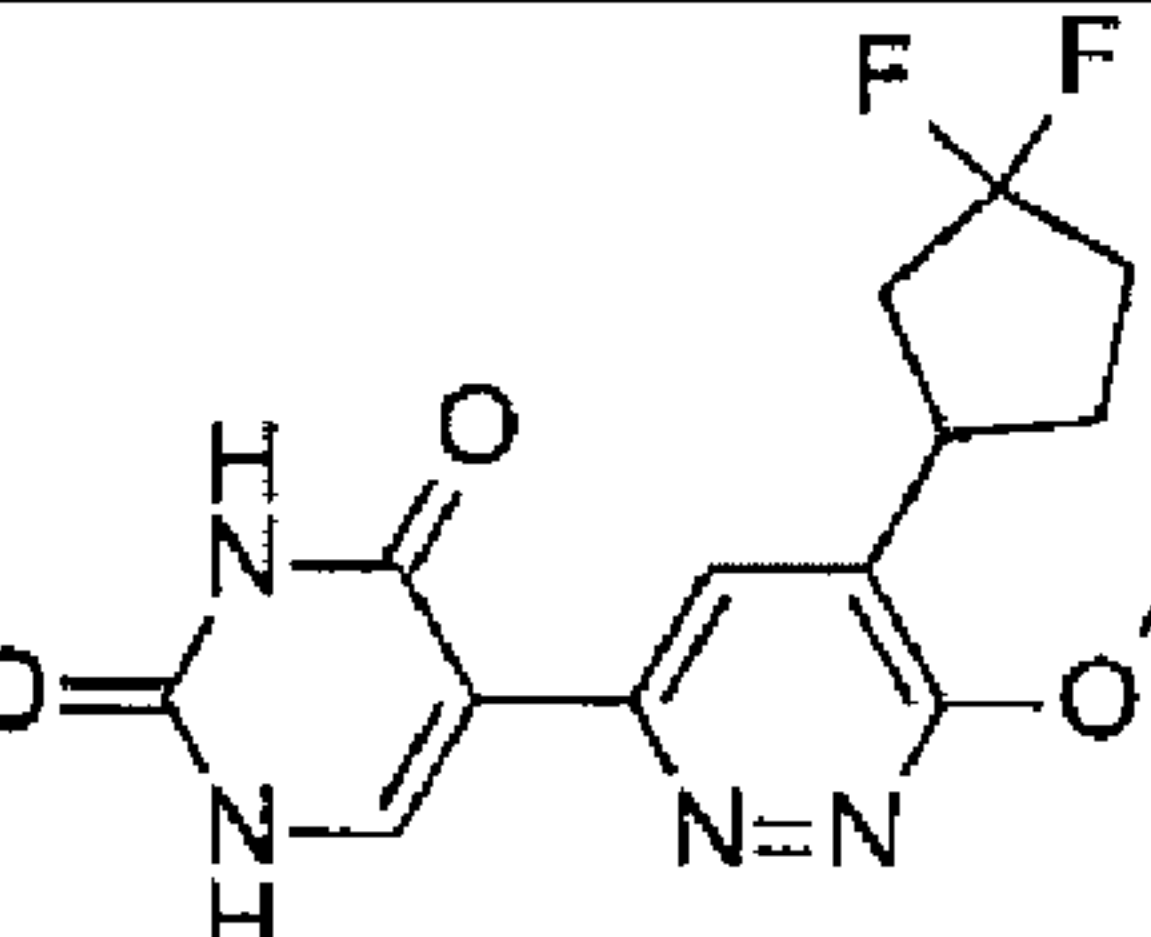
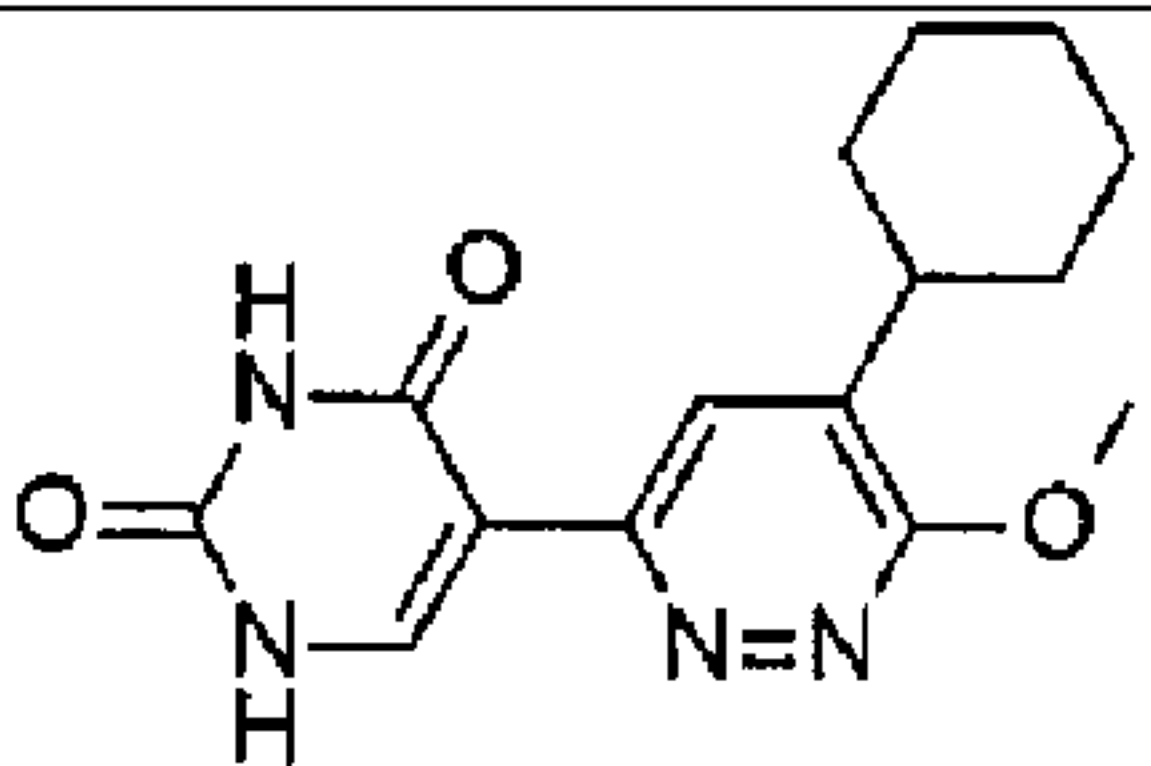
5-(5-環丁基-6-甲氧基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮



將1 M HCl (5.2 mL, 5.2 mmol)添加至4-環丁基-6-(2,4-二甲氧基嘧啶-5-基)-3-甲氧基-噻嗪(0.39 g, 1.3 mmol)中且在50°C下攪拌6小時，接

著在RT下攪拌隔夜。在減壓下移除溶劑。經由SCX筒(10 g, 溶離劑60 mL DCM, 60 mL 50% MeOH/DCM及120 mL 50% 7 M NH₃/MeOH/DCM)純化以得到呈白色固體狀之標題化合物(0.337 g, 96%)。ES/MS (m/z): 275 (M+1)。

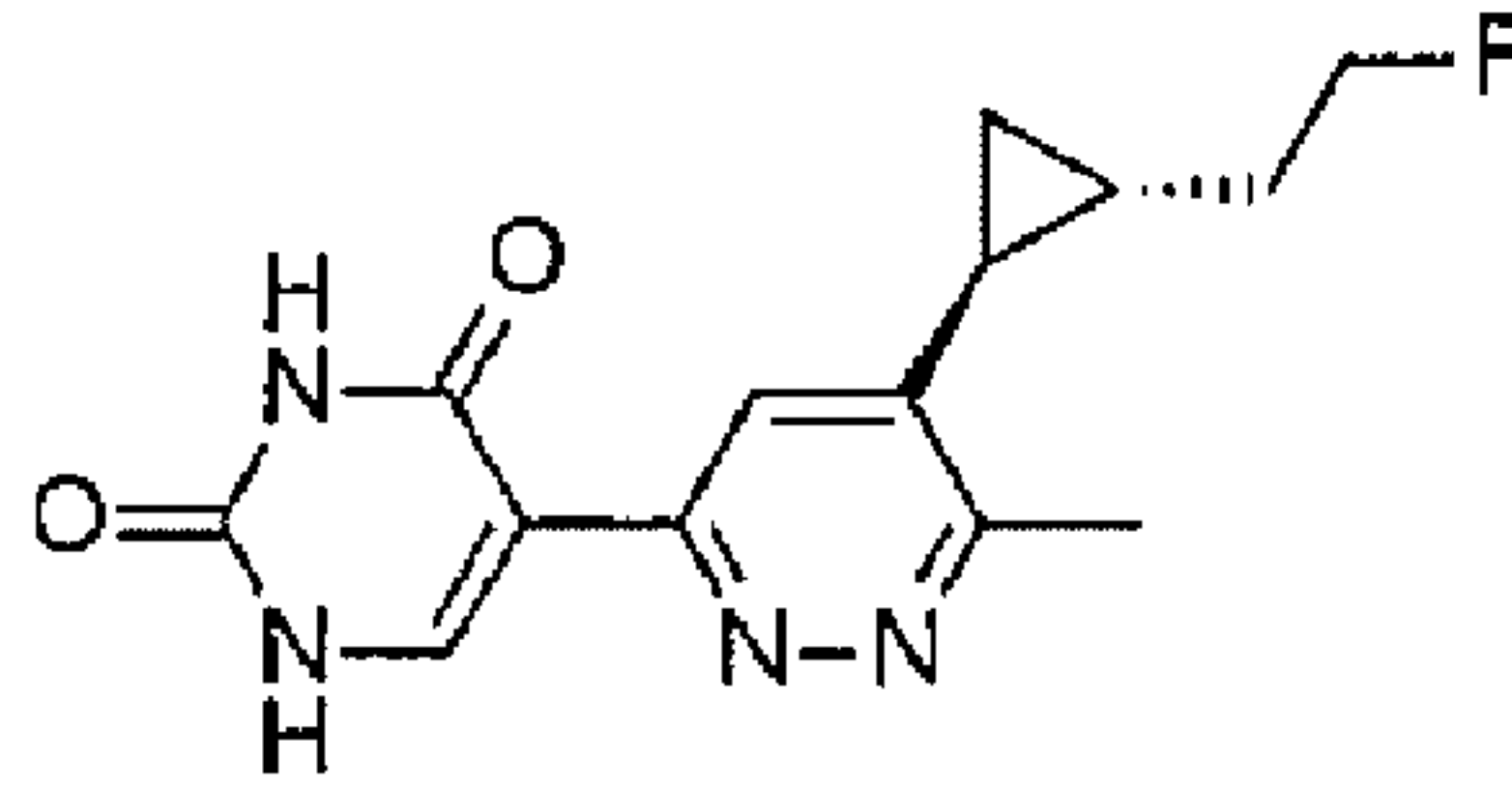
【0163】 以下實例可基本上如實例23中所描述來製備。

實例#	化學名稱	結構	ES/MS (m/z) (M+H)
24	5-(5-環丙基-6-甲氧基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮		261
25	5-[5-(3,3-二甲基環丁基)-6-甲氧基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		303
26	5-[5-(3,3-二氟環丁基)-6-甲氧基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮		311
27	5-[5-(3,3-二氟環戊基)-6-甲氧基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮 (異構體1)		325
28	5-[5-(3,3-二氟環戊基)-6-甲氧基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮 (異構體2)		325
29	5-(5-環己基-6-甲氧基-噻嗪-3-基)-1H-嘧啶-2,4-二酮		303

【0164】

實例30

5-[5-[(1S,2R)-2-(2-氟乙基)環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮



【0165】 將HCl (1 M於H₂O中，2 mL，2 mmol)添加至反式-2,4-二甲氧基-5-[6-甲基-5-[2-(2-氟乙基)環丙基]噻嗪-3-基]嘧啶之對映異構體1 (0.043 g，0.14 mmol)中且在50°C下加熱隔夜。在減壓下移除溶劑。經由SCX筒(12 g，溶離劑70 mL MeOH，70 mL 2 M NH₃/MeOH)純化以得到呈白色固體狀之標題化合物(0.037 g，89%)。ES/MS (m/z): 291 (M+1)。

【0166】

生物分析

以下分析顯示，本發明之例示性化合物為CD73活性之抑制劑，且適用於治療癌症。

【0167】

CD73蛋白表現及純化

C端6-HIS標記之人類CD73 (胺基酸1-547)係藉由用CD73基因瞬時轉染HEK293F哺乳動物細胞而在該細胞中表現，且使用Ni²⁺親和力及Superdex 200尺寸排阻層析純化。如上文所描述來表現及純化C端6-HIS標記之小鼠CD73 (胺基酸1-549)。如先前所描述來表現及純化C端6-HIS標記之大鼠CD73 (胺基酸1-549)。

【0168】

用於腺苷及腺苷純化之質譜法

Agilent 300 RapidFire 自動化萃取系統(Agilent, Santa Clara, CA)與三個HPLC四元泵(quaternary pumps)一起使用，耦合至具有電噴霧電離(ESI)介面源之Sciex 6500三重四極(triple quadrupole)質譜儀(AB Sciex, Framingham, MA)。RapidFire質譜系統負載可再用的RapidFire HILIC (H1)固相萃取(SPE)筒(G9203-80109)。

【0169】 用於樣品負載及洗滌之溶劑A為含有5% (v/v) ACN之50 mM甲酸銨(pH 4.0)。用於樣品溶離之溶劑B為含0.3%甲酸 + 2%氫氧化銨之70% ACN/30% MeOH。藉由在真空下直接自多孔培養盤抽吸10 μ L至收集環來連續分析樣品。使用溶劑A以1.25毫升/分鐘之流動速率藉由四元泵1將10 μ L樣品負載至HILIC筒上且洗3000 ms。使用溶劑B以1.25毫升/分鐘之流動速率藉由四元泵3使殘留分析物溶離至質譜儀持續3000 ms。使用溶劑A以1.25 mL/min之流動速率藉由四元泵1使系統再平衡3000 ms。

【0170】 三重四極質譜儀裝備電噴霧電離(ESI)源且使用所選反應監測(SRM)正模式(M+H)⁺監測分析物。在*m/z* 268.05/136.0監測腺苷且在*m/z* 348.1/136.0監測單磷酸腺苷。使用¹³C5腺苷及¹⁵N5 AMP作為內部標準物分別計算腺苷及單磷酸腺苷之面積比值。

【0171】

人類CD73生物化學分析

此分析之目的應為鑑別及表徵CD73酶活性之抑制劑。將含有2 μ M單磷酸腺苷(Sigma #01930)、10 mM Tris pH 7.5、100 mM NaCl、0.01% BSA、0.2 mM辛基葡萄糖苷及50 pMCD73蛋白之反應混合物(20 μ L)添加至384孔培養盤(Nunc #264573)。在RT下培育30分鐘後，藉由添加含有2%

甲酸及10 μM $^{13}\text{C}5$ -腺苷(用 $^{13}\text{C}5$ 核糖標記)之20 μL 停止溶液(Cambridge Isotope Laboratories - #CLM-3678-0)，隨後添加40 μL dH_2O 來終止反應。利用如上文所描述之質譜法來測定腺苷- $^{13}\text{C}5$ 及腺苷核糖- $^{13}\text{C}5$ (內部標準物)含量。使用信號比(腺苷峰整合/腺苷內部標準物峰整合)來定量各反應。藉由使用方程式{抑制% = $100 \times [1 - (X - \text{MIN})/(\text{MAX} - \text{MIN})]$ }來計算抑制百分比，其中在存在 $> 10 \times \text{IC}_{50}$ 之已知競爭性抑制劑的情況下，X等於孔信號比，MAX等於DMSO對照組之中位值信號比，且MIN等於酶活性之信號比。出於篩選之目的，在1% DMSO中以50 μM 測試各化合物。藉由在0.0025至50 μM 之10個濃度下測試各化合物來測定各化合物之 IC_{50} (使用1:3稀釋流程)。

【0172】 5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之 IC_{50} 為0.028 μM 。

【0173】 5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之 IC_{50} 為0.043 μM 。

【0174】 本文中所揭示之實例之所有化合物呈現小於0.062 μM 之 IC_{50} 。

【0175】

人類CD73機制分析

此分析之目的為測定所關注化合物之作用機制。如上所指示對人類CD73生物化學分析進行分析。使用1:3稀釋流程在0.023至50 μM 之8個不同濃度下，但使用3倍稀釋流程在0.023至50 μM 之AMP之8個不同濃度下來測試各化合物。使用GraphPad Prism 7.00標繪且使用專用混合模型抑制擬合不同抑制劑之面積比及底物濃度以測定抑制之 V_{max} 、 K_{m} 、 K_{i} 及 α

值 $\{ (V_{max_{app}} = V_{max} / (1 + [I] / (\alpha * K_i)) ; K_{m_{app}} = K_m * (1 + [I] / K_i) / (1 + [I] / (\alpha * K_i)) ; Y = V_{max_{app}} * X / (K_{m_{app}} + X) \}$ ，其中 α 、 V_{max} 、 K_m 及 K_i 共用於各化合物}。

【0176】 5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮及5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮中之每一者為結合至酶-磷酸酯錯合物，但並未結合至酶蛋白自身的無競爭性抑制劑。

【0177】 隨著無競爭性抑制劑，例如5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之 IC_{50} 值降低，增加AMP之底物濃度增強了該等抑制劑之效能，如表1中所示。

AMP (uM)	IC50 (uM)
50.0	0.008327
16.7	0.006557
5.6	0.008799
1.9	0.02028
0.61	0.06279
0.21	0.1513
0.069	0.2903
0.023	0.4094

【0178】

小鼠CD73機制分析

此分析之目的為關於小鼠CD73酶活性之抑制來評定抑制劑。如上文所描述對人類CD73生物化學分析進行此分析，不同之處在於使用3 μ M AMP及50 pM小鼠CD73酶。

【0179】 5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之 IC_{50} 為0.175 μ M。

【0180】

Calu6人類細胞分析

此分析之目的為在基於細胞之分析中針對CD73測試化合物。使Calu6細胞(1500個細胞/孔)在96孔經聚-D-賴胺酸塗佈之培養盤(BD #356640)中生長，該培養盤含有100 μ L介質MEM (Gibco #11095-072) + 1%丙酮酸鈉(Gibco #11360-070) + 1% NEAA (Gibco #11140-050) + 10% FBS (Hyclone #SH30071)。在RT下培育培養盤30分鐘，隨後在37°C/5% CO₂下培育隔夜。細胞用分析緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 7.2，10 mM D-葡萄糖，1 mM KCl，125 mM NaCl，2 mM MgCl₂) (90微升/孔)洗滌兩次。隨後，將90 μ L分析緩衝液添加至各孔中，隨後添加10微升/孔之AMP及化合物預混合物(50 μ M AMP，化合物於1% DMSO中之不同濃度)。在室溫下培育培養盤60分鐘。接著，移除10 μ L上澄液/孔且添加至新的培養盤，隨後添加20 μ L停止溶液(2%甲酸，1.2 μ M腺苷核糖-¹³C5 (Cambridge Isotope Laboratories - #CLM-3678-0))及90 μ L ddH₂O以用於質譜分析。藉由利用如上文所描述之質譜法(Agilent RapidFire)來測定腺苷-¹³C5及腺苷核糖-¹³C5 (內部標準物)含量以用於人類CD73生物化學分析。亦如上文所描述來計算抑制百分比。

【0181】 5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之IC₅₀為0.0073 μ M (實例2之化合物)。

【0182】 5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之IC₅₀為0.028 μ M。

【0183】

離體標靶抑制分析

此分析之目的為在基於離體分析中針對小鼠血液中之鼠類CD73來測

試化合物。在腫瘤達至約400 mm³之後動物(6隻/組)經口給藥有在20% HPBCD (2-羥丙基-β-環糊精) (pH 2)中調配之各化合物。在治療之後，將血液收集至肝素管中且用於將¹³C10-¹⁵N5-AMP轉化為經標記腺苷、肌苷及次黃嘌呤的離體分析，如針對使用自經由經口給藥經受化合物治療之動物收集之全血的離體分析所描述。

【0184】 在來自用不同劑量之化合物治療之動物的小鼠全血中，5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮抑制AMP轉化為腺苷、肌苷及次黃嘌呤，如表2中所示。

組	抑制(%)	p值
媒劑	0.0	1.000
1 mg/kg	-10.6	0.9139
2.5 mg/kg	25.2	0.162
6.4 mg/kg	37.0	0.0127*
16 mg/kg	56.5	<0.0001*
40 mg/kg	88.6	<0.0001*
100 mg/kg	94.3	<0.0001*

*：統計顯著性。

【0185】 5-[5-[(1S,2S)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮之IC₅₀為0.0073 uM。

【0186】

人類CD73分析之基於Calu6腫瘤之活體內標靶抑制

此分析之目的為在活體內標靶抑制分析中針對來源於人類癌症Calu6細胞之異種移植腫瘤中的人類CD73來測試化合物。使Calu6細胞(ATCC)在補充有10%胎牛血清之HBSS介質中生長。收集具有胰蛋白酶之亞匯合細胞且用無血清之生長介質沖洗兩次。藉由在裸鼠(The Harlon Laboratory)之後側腹中注射5 × 10⁶之HBSS及MATRIGEL® (BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ)之1:1混合物來引發皮下腫瘤之生長。當平均腫瘤體積達至約400-500 mm³時，藉由腫瘤大小及體重隨機分配動物且如所指示將其置放至各別治療組。治療後，在含有如下文所描述之內部標準物的1 mL冰冷萃取緩衝液中收集且處理腫瘤樣本(各自50-80 mg)。

【0187】 將箔條及液體N₂添加至砂漿中以預冷。將腫瘤組織滴至箔條上，且添加液體N₂。將另一箔條經放於腫瘤組織頂部上且用研杵錘擊直至腫瘤徹底磨碎為止。將50至100 mg之腫瘤組織置放於導管(Fishers Scientific，目錄號02-681-302)中且置放於乾冰上。將一種金屬珠粒(Qiagen目錄號69989)及含有內部標準物¹³C₅-腺苷、¹³C₅-AMP、¹⁵N₅-GTP、¹⁵N₄-肌苷5'-單磷酸及¹³C-¹⁵N-次黃嘌呤(Cambridge Isotope Lab及Cayman Chemical)的1 mL 80%甲醇添加至導管中，且在-80°C下儲存樣本直至用於LC/MS分析為止。

【0188】 亦將血液收集至肝素管中且用於將¹³C₅-¹⁵N₅-AMP轉化為經標記腺苷、肌苷及次黃嘌呤的離體分析，如針對使用自經由經口給藥經受化合物治療之動物收集之全血的離體分析所描述。

【0189】 如表3中所示，在用不同劑量之化合物治療之Calu6腫瘤中，5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮抑制AMP轉化為腺苷。

化合物治療組(mg/kg)	抑制(%)	p值
0.0	0	1.000
1.0	39.1	0.0057*
2.5	68.5	<0.0001*
6.4	64.3	<0.0001*
16.0	77.5	<0.0001*
40.0	82.1	<0.0001*
100.0	89.3	<0.0001*

*：統計顯著性。

【0190】**T細胞抑制分析**

將羧基螢光素二乙酸丁二醯亞胺基酯(CFSE)用作標記藥劑人類PBMC，或經分離CD4細胞(0.5×10^6 - 1×10^8 個細胞)用含有5% HI FBS (Gibco # 10082)之標記緩衝液(RPMI 1640 w/L-麩醯胺酸，GIBCO目錄號11875)洗滌且懸浮於1 ml標記緩衝液中。將細胞與含有50 μ M CFSE (Biolegend目錄號423801)之110 μ l PBS混合，且在室溫下培育5 min。經標記細胞用含有5% HI FBS (Gibco # 10082)之PBS洗滌一次且用含有1 \times 青黴素/鏈黴素之T細胞正常生長介質(X-Vivo 15，Lonza，目錄號04-744Q)洗滌一次，且懸浮於用於PBMC及CD4細胞之生長介質中。

【0191】**T細胞活化及處理**

將經CFSE標記之人類PBMC (600,000個細胞/毫升)或CD4細胞 (500,000個細胞/毫升)與Dynabeads®人類T-活化子CD3/CD28 (Gibco，目錄號11131D)以細胞/珠粒及人類IL-2 (60 IU/ml，Roche，目錄號：11011456001)之1:1比率混合。將細胞置放於37°C水浴中10分鐘以預活化T細胞。將PBMC (125微升/孔)或CD4細胞(100微升/孔)轉移至96孔培養盤(Costar 3799, Corning Inc.)。為使用PBMC測試化合物，在含有400-600 μ M AMP之細胞正常生長介質(125 μ L)中製備呈各種濃度之測試化合物。為使用CD4細胞測試化合物，在含有200-250 μ M AMP之細胞正常生長介質(100 μ L)中製備呈各種濃度之測試化合物。在37°C、5% CO₂下培養經處理細胞68-70小時。

【0192】 將含有經處理PBMC之介質(160 μ l)轉移至培養盤且將用

於細胞介素分析之剩餘介質轉移至AcroPrep 96培養盤(AcroPrep 96過濾
器板，Omega 3K NTRL 350 ul孔，Pall Life Science目錄號8033)以用於
製備用於代謝物之LC-MS分析的樣本。

【0193】 將含有CD4細胞之介質(100 μ l)轉移至另一培養盤且經由
以1500 g離心2小時經由AcroPrep培養盤過濾至另一培養盤。將經過濾介
質(50 μ l/孔)與相同體積之80%甲醇、1% NH₄OH及內部標準物(250
ng/mL ¹³C5-AMP及250 ng/mL ¹³C5-腺苷)混合以用於代謝物之LC-MS分
析。

【0194】 經處理PBMC或CD4細胞經收集且針對流式細胞測量術染
色以定量T細胞增殖。

【0195】

流式細胞測量術

PBMC或CD4細胞在DPBS中以1:200稀釋用Zombie Aqua
(Biolegend，目錄號423102，批號B195875)染色15 min，且隨後在冰上
在流式染色緩衝液(DPBS-2%HIFBS-0.5%BSA)中以1:5稀釋用人類Fc受
體結合抑制劑(eBioscience目錄號14-9161-73)阻斷於15分鐘。用
APC/Cy7抗人類CD3 (Biolegend目錄號300426，1:20稀釋)、APC抗人類
CD4 (Biolegend，目錄號317416，1:20稀釋)及Pacific Blue抗人類CD8a
(Biolegend，目錄號300927，1:20稀釋)之混合液染色PBMC，且在冰上
用含APC抗人類CD4 (Biolegend，目錄號317416，1:20稀釋)之流式染色
緩衝液中染色CD4細胞30分鐘。

【0196】 藉由BD FACS Verse獲得流式資料。適當地補償各螢光通
道。用以下選通策略在FloJo版本7.6.5上處理資料：在FSC相對於SSC點

陣圖上選通的淋巴球；在SSC相對於Zombie Aqua點陣圖上選通的淋巴球之活細胞；在APC-Cy7相對於Zombie Aqua點陣圖上選通的可存活淋巴球之CD3細胞；在APC相對於Pacific Blue點陣圖上選通的CD4細胞及CD8細胞；在APC相對於CFSE (FITC)及Pacific Blue相對於CFSE (FITC)點陣圖上進一步選通的CD4及CD8細胞。藉由增殖工具分析CD4及CD8細胞之增殖。增殖指數(PI)如總細胞數量/起始細胞數量所限定，且化合物拯救%經計算為 $(PI_{w/o \text{ AMP w/o cpd}} - PI_{\text{sample}})/(PI_{w/o \text{ AMP w/o cpd}} - PI_{w \text{ AMP w/o cpd}}) * 100$ 。

【0197】如表4中所示，藉由5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮來抑制CD73拯救了腺苷介導之T細胞增殖之抑制，其與生長介質中腺苷含量之劑量依賴性降低相關。

化合物(uM)	T細胞增殖之拯救(%)	腺苷(uM)
5.00	107	0.017
1.66667	106	0.027
0.55556	104	0.046
0.18519	95	0.086
0.06173	37	0.15
0.02058	-2	0.21
0.00686	-3	0.28
0.00229	-6	0.28
0.00	0	0.30

【0198】

細胞介素分析

來自經處理PBMC之介質用來自細胞介素ELISA套組之1× ELISA/ELISPOT稀釋劑以1:7.5、1:2.5及1:50稀釋，並且基於製造商之手冊使用人類TNF α ELISA Ready-SET-GO!套組(eBioscience目錄號88-7346-22)分析TNF α ，使用人類IL-1 β ELISA ready-SET-GO!套組(第2代)

(eBioscience, 目錄號88-7261-22)分析IL-1 β , 且使用人類IFN γ ELISA ready-SET-GO!套組(eBioscience, 目錄號88-7316-22)分析IFN γ 。

【0199】 如表5中所示, 藉由5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮來抑制CD73增加了CD4⁺ T細胞中之TNF- α 含量。

化合物(uM)	TNF- α (pg/mL)
6.000	1985.5
2.000	1183.9
0.667	1618.1
0.222	1265.5
0.074	782.0
0.025	557.8
0.008	419.9
0.003	386.3
0.000	357.0

【0200】 如表6中所示, 藉由5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噁嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮抑制CD73增加CD4⁺ T細胞中之TNF- γ 含量。

化合物(uM)	INF- γ (pg/mL)
6.000	105.3
2.000	99.5
0.667	147.8
0.222	146.7
0.074	59.4
0.025	51.1
0.008	29.5
0.003	34.5
0.000	9.0

【0201】

活體內模型

視需要, 可例如根據此項技術中所闡述之方法進行本發明化合物或

其醫藥學上可接受之鹽之CD73抑制作用之臨床前模型化，該等方法例如闡述於Rongvaux A等人, *Annual Rev. Immunology* 2013; 31: 635-74及其中所引用之文獻；Sanmamed MF等人, *Annals of Oncology* 2016; 27: 1190-1198及其中所引用之文獻中。

【0202】

用於量測人類血清中之CD73活性的基於LC/MS之分析

在室溫下以1,500 g使新鮮正常人類血液離心15分鐘，且收集含有血清之上層溶離份。將所收集血清(25微升/孔)轉移至含有各種濃度之實例2之化合物及固定濃度之左旋咪唑(1,500 uM)的96深孔培養盤(DWP，Analytical Sales & Services Inc.目錄號968820)。在冰上培育60 min後，將¹³C5-¹⁵N5-AMP (50 uM)添加至培養盤中之各孔中，且在室溫下培育培養盤15 min。接著隨著添加200微升/孔之17.3 TCA而將培養盤置放於乾冰上，隨後用培養盤震盪機(Qiagen)以26 fps震盪3分鐘。隨後在4°C下以2940 g使培養盤離心20 min。離心後，將來自各孔之100微升/孔之上澄液轉移至新的96深孔培養盤且在冰上與18.4微升/孔之2.5M Na₂CO₃混合，隨後添加含有內部標準物(為：¹³C5-AMP、¹³C5-腺苷、¹³C5-次黃嘌呤及¹⁵N4-肌苷)之200 ul萃取溶液。在4°C下以2940 g進一步離心20 min後，200微升/孔之上澄液用於藉由如上文所描述之LC/MS進行¹³C10-¹⁵N5-腺苷、¹³C10-¹⁵N5-肌苷及¹⁵N5-次黃嘌呤之分析。對於EC50計算，用來源於電腦(in silico)模型之未結合溶離份(%)或以實驗方式校正血清中之CD73抑制劑濃度。

【0203】 表7含有藉由5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮(實例2之化合物)來抑制人類血清中之CD73活性

的資料。

實例2之化合物(uM)	抑制(%)
4.6800	76.9
1.5600	71.1
0.5200	56.8
0.1733	39.6
0.0578	25.4
0.0193	15.4
0.0064	8.4
0.0021	3.7
0.0007	0.7
0	0.0

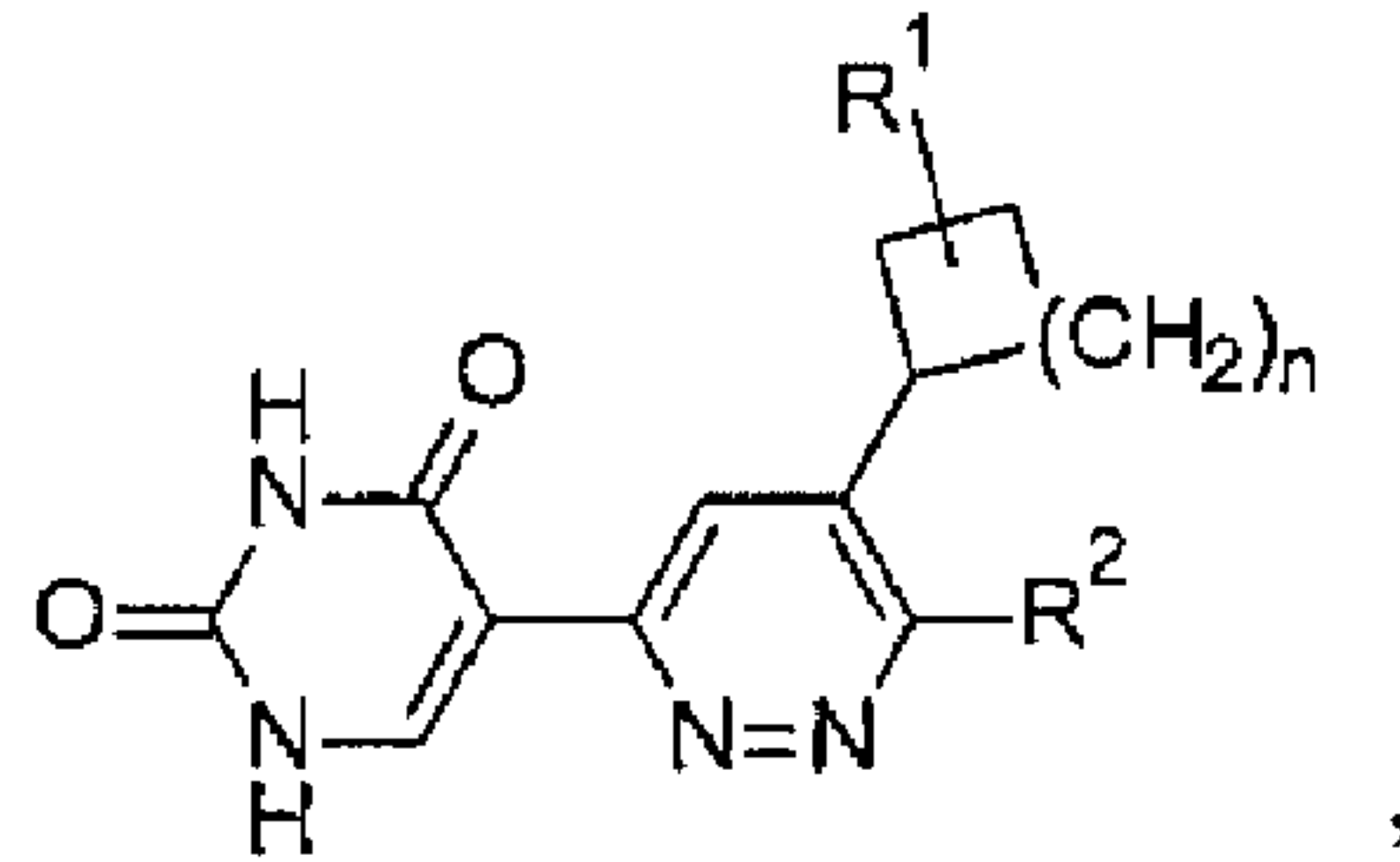
【0204】 表8含有藉由本文中所揭示之某些化合物來抑制人類血清中之CD73活性的資料。

實例	EC50 (uM)
1	0.1
2	0.213
3	0.051
8	0.179
9	0.297
10	0.055
22	0.212

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種下式化合物：



其中n為0至3；

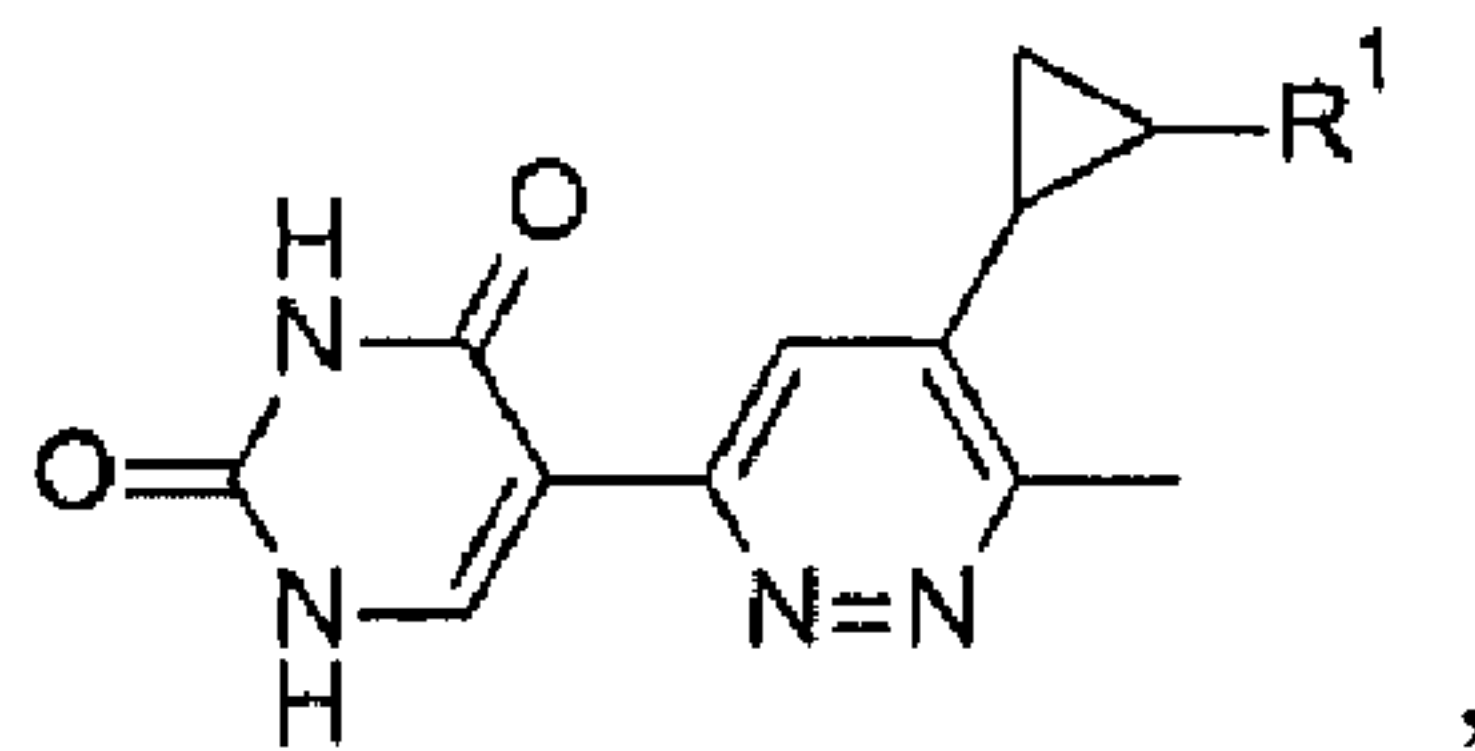
R¹為-H、-F、-偕(gem)-二氟、-偕-二甲基、-C₁₋₄烷基、-CHF₂、-CHF₂CH₃或-CH₂CH₂F；且

-R²選自-H、-CH₃、-F、-Cl、-CN或-OCH₃；

或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項2】

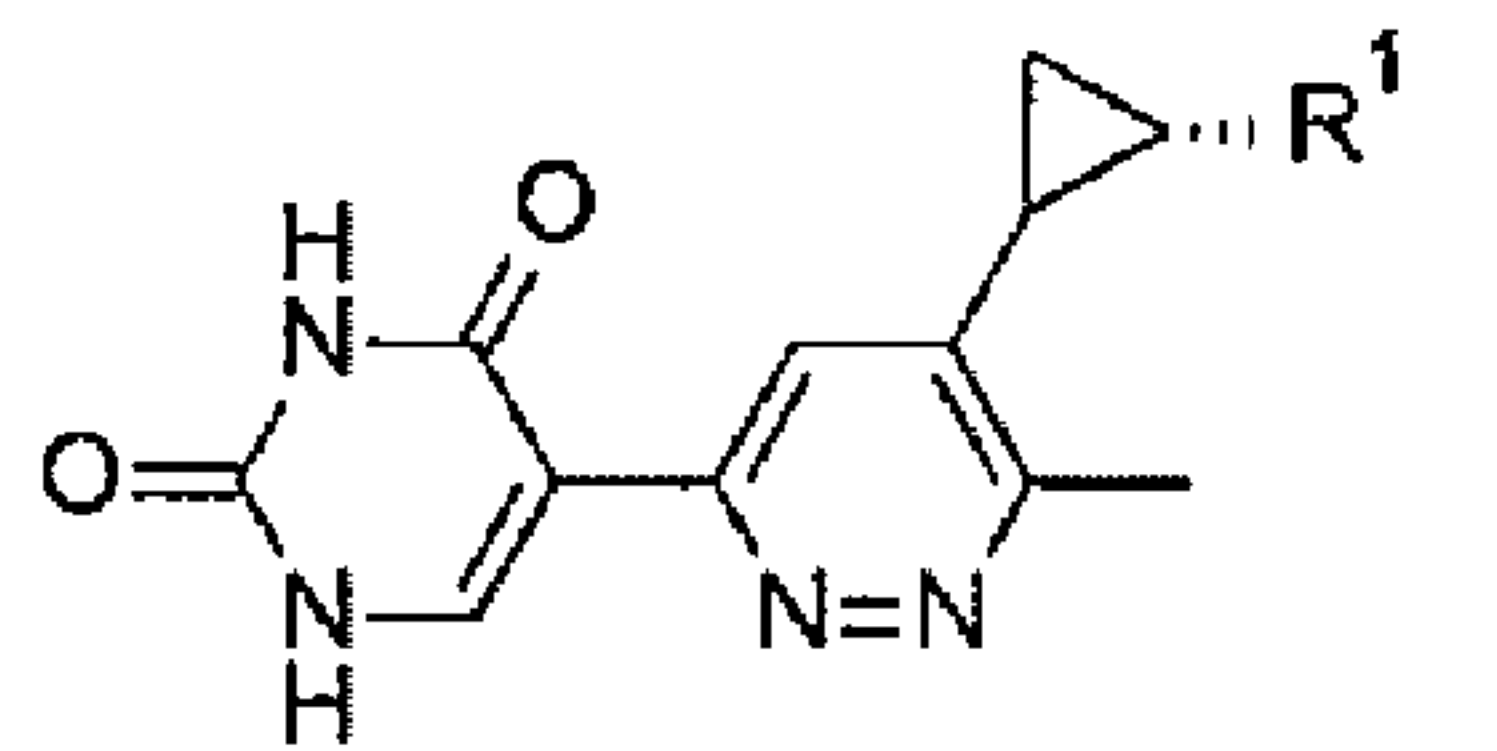
如請求項1之化合物，其為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項3】

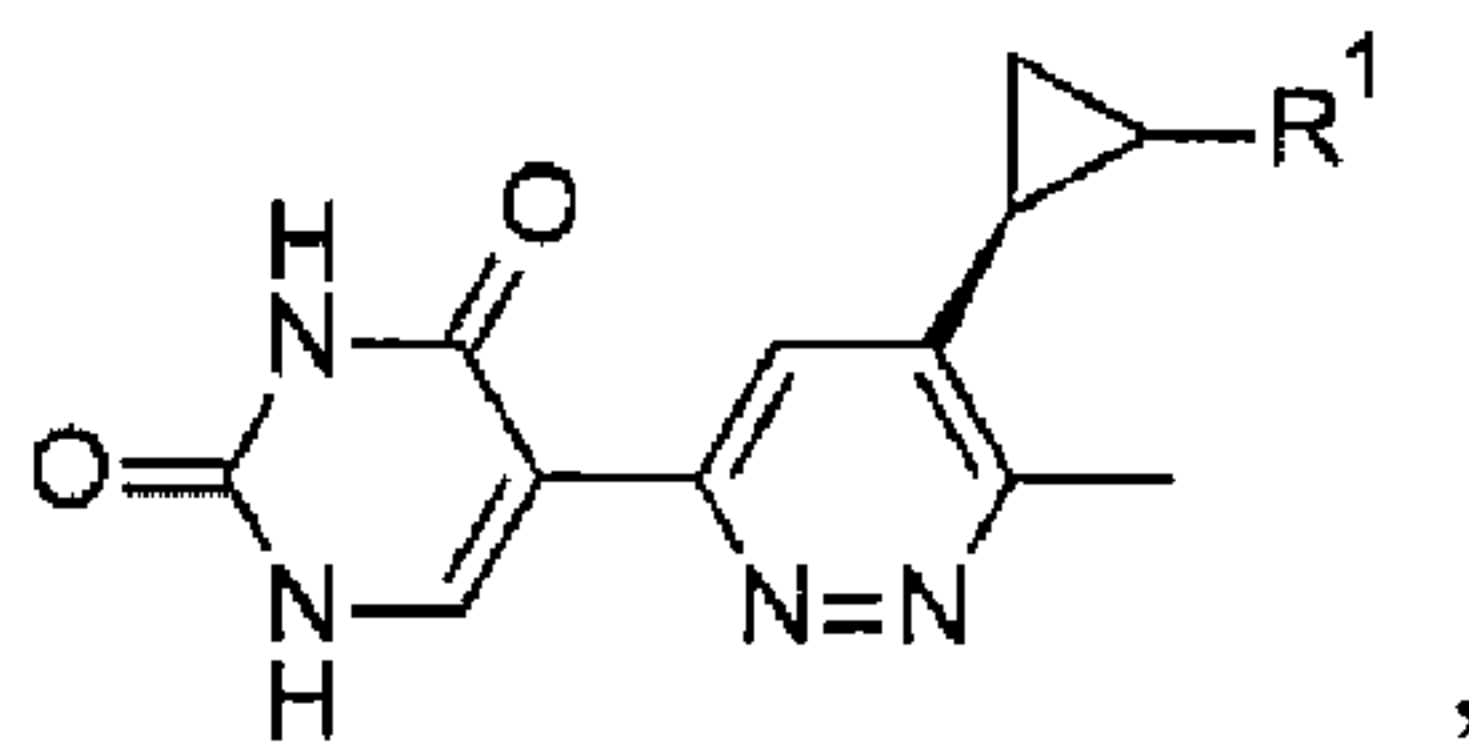
如請求項2之化合物，其為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項4】

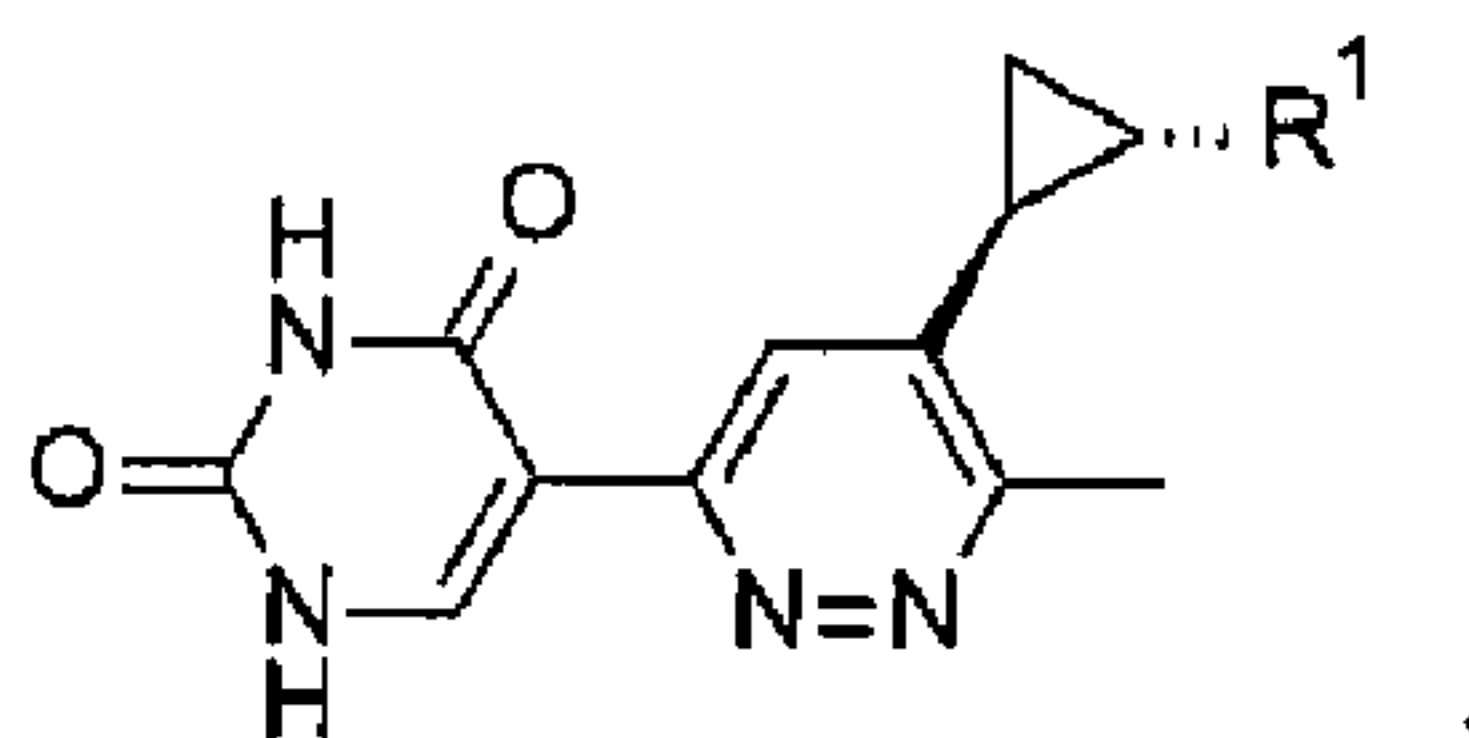
如請求項2之化合物，其為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項5】

如請求項2之化合物，其為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項6】

如請求項1之化合物，

其中n為0，R¹為-C₁₋₄烷基，且R²為-CH₃，

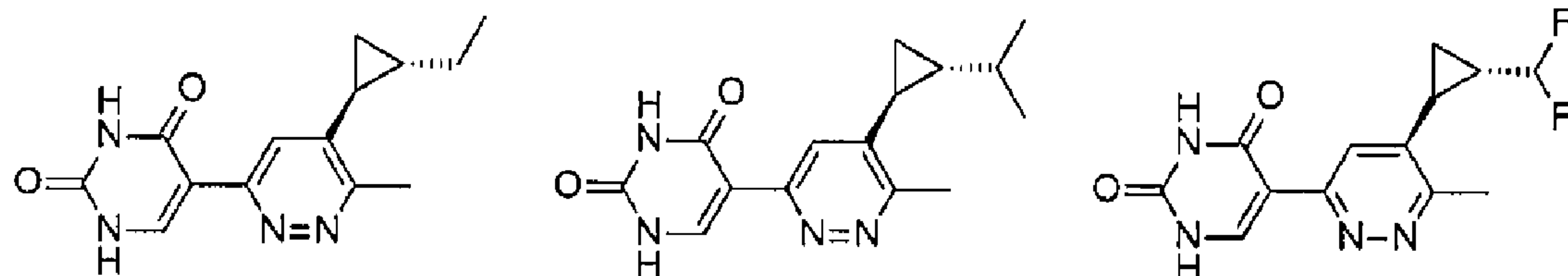
或其醫藥學上可接受之鹽。

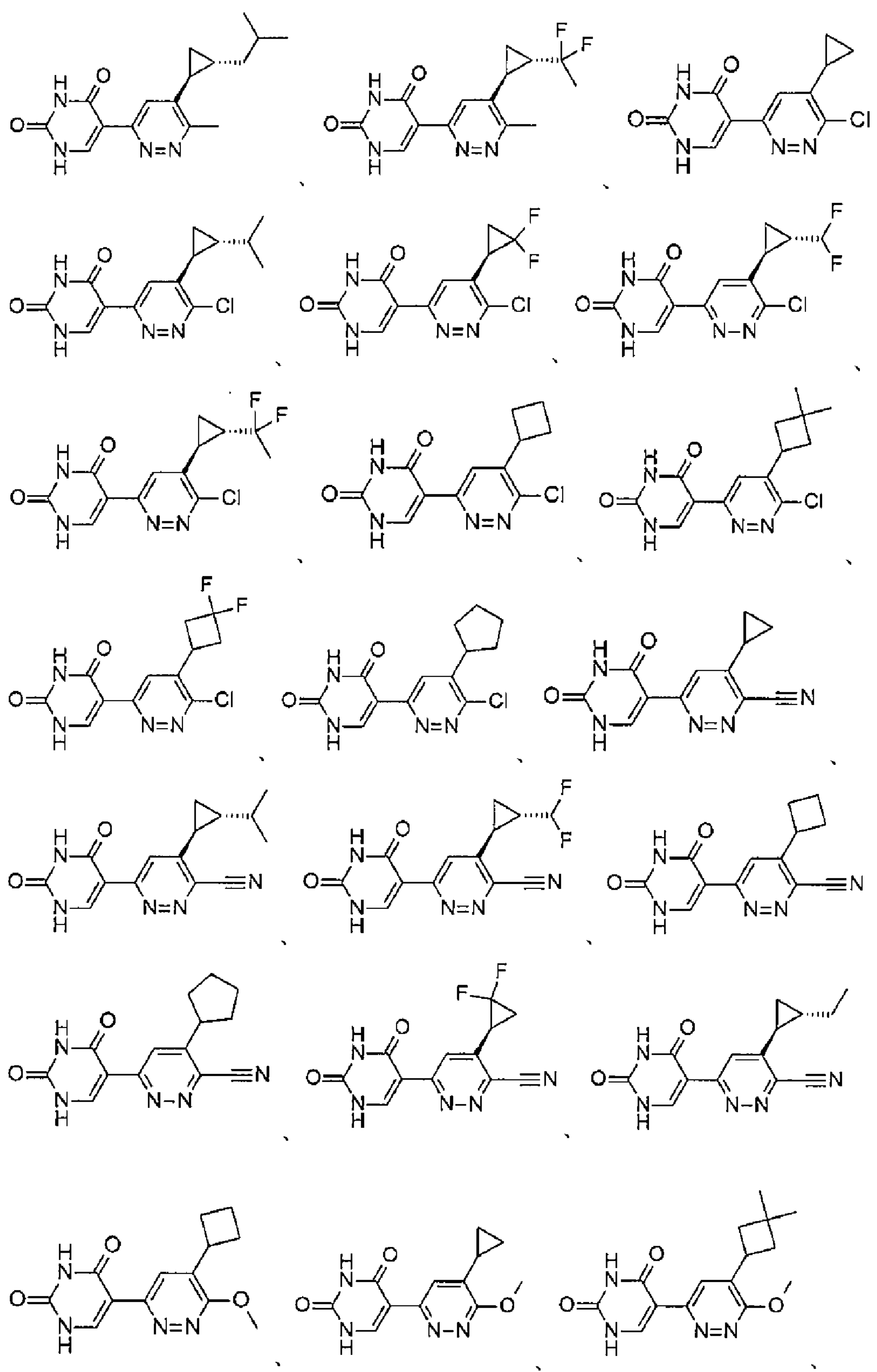
【請求項7】

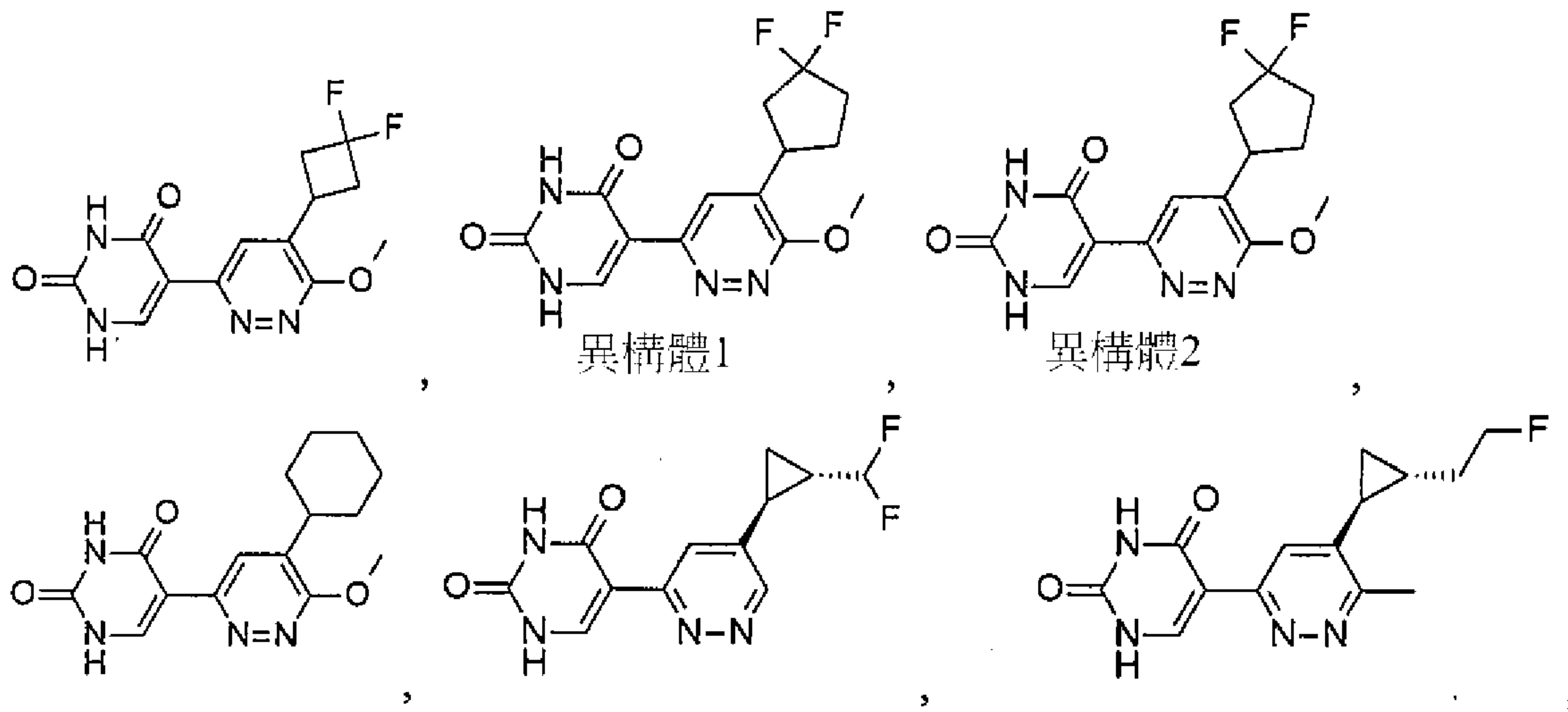
如請求項6中之化合物，其中R¹為異丙基，或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項8】

如請求項1之化合物，其為



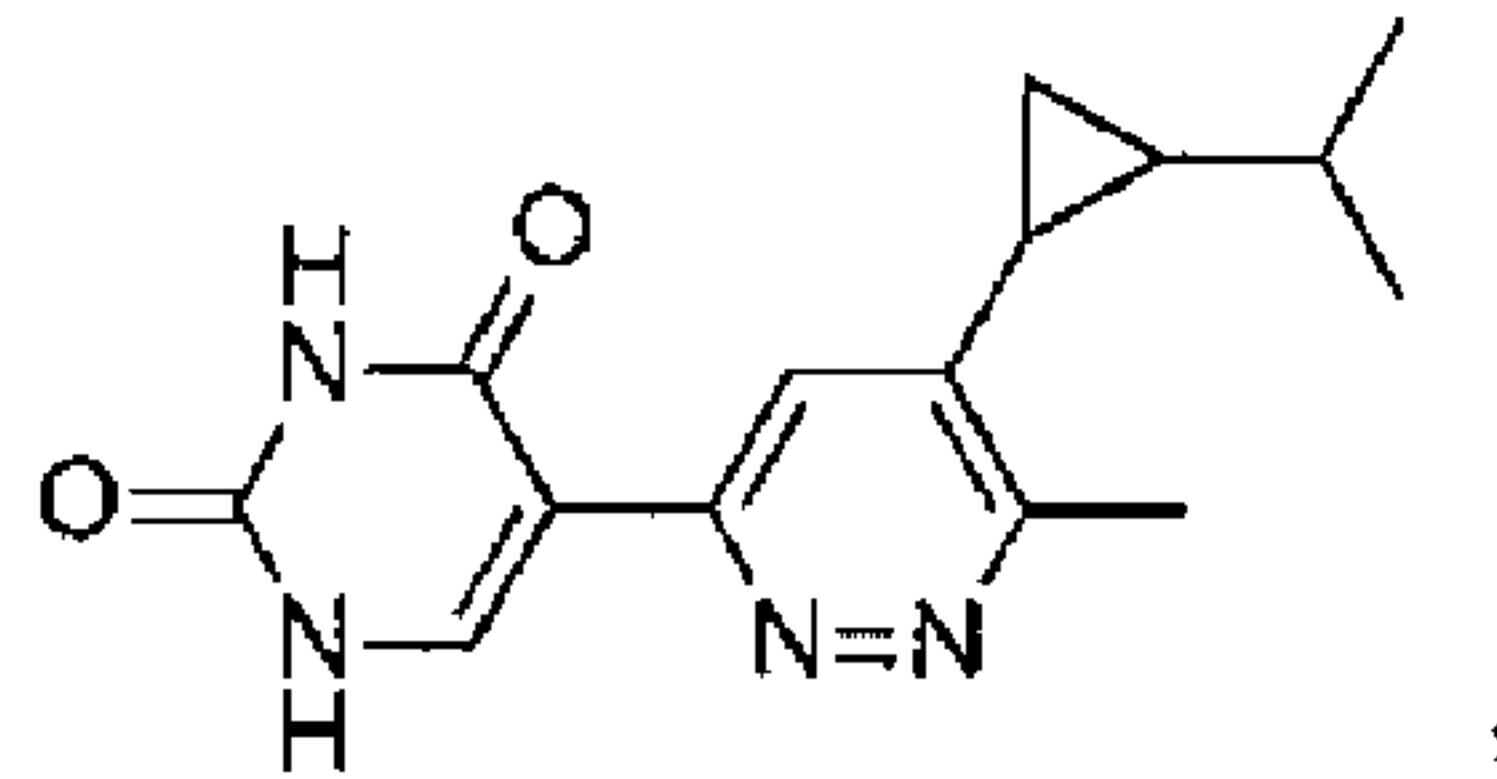




或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之化合物，其為：



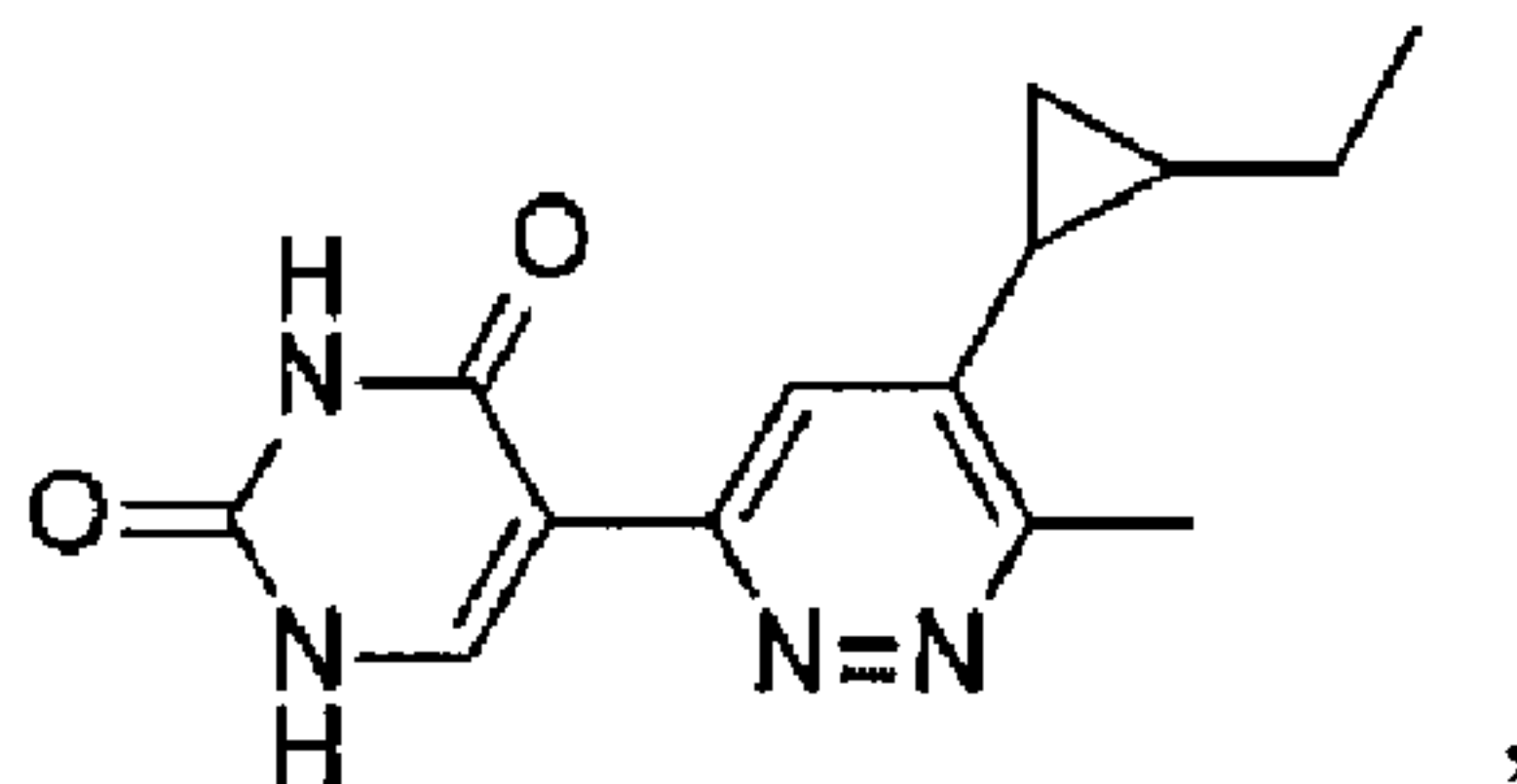
或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項10】

如請求項1至8中任一項之化合物，其為5-[5-[(1S,2R)-2-異丙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘧啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項11】

如請求項1至8中任一項之化合物，其為：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項12】

如請求項1至8中任一項之化合物，其為5-[5-[(1S,2S)-2-乙基環丙基]-6-甲基-噻嗪-3-基]-1H-嘓啶-2,4-二酮，或其醫藥學上可接受之鹽。

【請求項13】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至12中任一項之化合物，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。

【請求項14】

一種用於評定化合物之CD73抑制活性的方法，其包含測定已投與如請求項1至12中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的患者血清中之CD73活性。

【請求項15】

一種用於評定化合物之CD73抑制活性的方法，其包含測定已投與如請求項1至12中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的患者組織中之CD73表現。

【請求項16】

一種如請求項1至12中任一項之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其用於製造用於治療患者之癌症的藥物。

【請求項17】

如請求項16之用途，其中該癌症為膀胱癌、乳癌、膽管癌、直腸癌、結腸癌、胃癌、膽囊癌、神經膠母細胞瘤、頭頸癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、神經管母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌或腎癌。

【請求項18】

如請求項16之用途，其中該患者為已測定血清CD73活性之患者。

【請求項19】

如請求項16之用途，其中該患者為已測定組織CD73表現之患者。