

公告本 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：97105472

※ 申請日期：97.2.15

※ IPC 分類：~~C07D~~ A61K^{31/46} (2006.01)

C07D^{451/62} (2006.01)

A61P^{1/00} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷化合物之結晶型

CRYSTALLINE FORMS OF AN 8-AZABICYCLO[3.2.1]OCTANE
COMPOUND

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商施萬製藥

THERAVANCE, INC.

代表人：(中文/英文)

傑佛瑞 A 荷根漢

HAGENAH, JEFFREY A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州南舊金山市林蔭大道901號

901 GATEWAY BOULEVARD SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080

U. S. A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 席恩 M 戴立
DALZIEL, SEAN M
2. 利堤西雅 M 裴瑞拉
PREZA, LETICIA M.
3. 麥洛史夫 瑞帕達
RAPTA, MIROSLAV
4. 彼瑞 珍 寇森
COLSON, PIERRE-JEAN

國 籍：(中文/英文)

1. 澳大利亞 AUSTRALIA
2. 美國 U.S.A.
3. 斯洛伐克 SLOVAK REPUBLIC
4. 法國 FRANCE

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年02月28日；60/904,090

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺或其溶劑合物之結晶硫酸鹽。本發明亦提供包含此等結晶鹽形式之醫藥組合物、使用此等結晶鹽形式來治療與 μ 類鴉片受體活性相關之疾病的方法，及適用於製備此等結晶鹽形式之方法。

六、英文發明摘要：

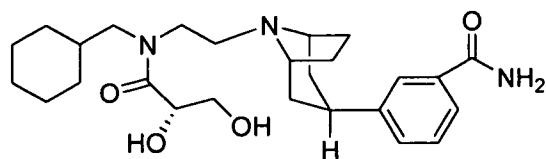
The invention provides a crystalline sulfate salt of 3-*endo*-(8-{2-[cyclohexylmethyl-((S)-2,3-dihydroxypropionyl)amino]ethyl}-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-yl)benzamide or a solvate thereof. The invention also provides pharmaceutical compositions comprising such crystalline salt forms, methods of using such crystalline salt forms to treat diseases associated with mu opioid receptor activity, and processes useful for preparing such crystalline salt forms.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

1

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

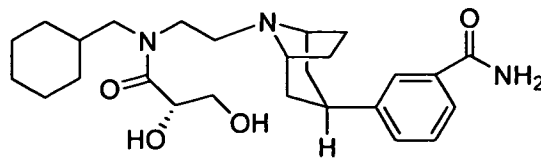
本發明係關於8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷化合物之結晶鹽形式，其適用作 μ 類鴉片受體拮抗劑。本發明亦關於包含此等結晶化合物之醫藥組合物、使用此等化合物來治療或改善由 μ 類鴉片受體活性介導之醫學病況的方法，及適用於製備此等化合物之方法。

本申請案主張2007年2月28日申請之美國臨時申請案第60/904,090號之權利，該案之全部揭示內容以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

共同讓渡之2006年3月1日申請之美國臨時申請案第60/777,962號及2006年8月30日申請之美國臨時申請案第60/841,028號，及美國申請案第11/711,961號揭示8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷化合物，其為 μ 類鴉片受體拮抗劑，預期其適用於治療或改善由 μ 類鴉片受體活性介導之醫學病況。詳言之，在此等申請案中特別揭示化合物3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽顯示 μ 類鴉片受體拮抗劑活性。

3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺(下文中之化合物1)之化學結構如下所示：



1

為有效地將此化合物用作治療劑，將需要具有可易於製造且具有可接受之化學及物理穩定性的固態鹽形式。舉例而言，將極需具有例如在超過約175°C或約180°C之溫度下熱穩定，且既不吸濕亦不易潮解的鹽形式，藉此促進該物質之加工及儲存。對於增強製品之純度及穩定性而言，結晶固體一般優於非晶型。

先前未報導化合物1之結晶鹽形式。因此，存在對既不吸濕亦不易潮解且顯示有利熱穩定性之穩定、結晶鹽形式之化合物1的需要。

【發明內容】

本發明提供3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺或其溶劑合物之結晶硫酸鹽。在一態樣中，本發明之結晶鹽形式為化合物1之結晶硫酸鹽。在另一態樣中，本發明之結晶鹽形式為化合物1之硫酸鹽的結晶水合物。

令人驚訝地，已發現本發明之結晶硫酸鹽顯示在約190°C至約205°C範圍內之熔融溫度以下無顯著熱事件且當曝露於室溫下介於約2%與約90%之間的某一範圍之相對濕度時顯示小於約0.3%之重量變化。此外，當曝露於室溫下高達約90%相對濕度時，本發明之結晶硫酸鹽及其水合物均不易潮解。

除其他用途之外，預期本發明之結晶鹽形式適用於製備供治療或改善由 μ 類鴉片受體活性介導之醫學病況的醫藥組合物。因此，在本發明之另一組合物態樣中，本發明提供包含醫藥學上可接受之載劑及3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺或其溶劑合物之結晶硫酸鹽的醫藥組合物。

本發明亦提供治療或改善藉由以 μ 類鴉片受體拮抗劑治療而改善之疾病或病況之方法，該疾病或病況例如為胃腸道能動性減小病症，該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺或其溶劑合物的結晶硫酸鹽。

本發明另外提供治療類鴉片誘導之腸功能障礙或術後腸塞絞痛之方法，該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺或其溶劑合物的結晶硫酸鹽。

在另一方法態樣中，本發明提供製備本發明之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含使3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺與硫酸接觸以形成反應混合物，及自反應混合物分離結晶硫酸鹽。

本發明提供製備本發明之結晶硫酸鹽的其他方法，該方法包含將3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)

胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺之硫酸鹽的結晶水合物分散於包含甲醇之稀釋劑中以形成反應混合物，及自反應混合物分離結晶硫酸鹽。

在又一方法態樣中，本發明提供製備化合物1之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含：(a)使經保護之化合物1前軀體(其中羥基經保護)與硫酸接觸以形成第一反應混合物；(b)自第一反應混合物分離化合物1之中間級固體硫酸鹽；(c)將中間級固體硫酸鹽分散於包含甲醇之稀釋劑中以形成第二反應混合物；及(d)自第二反應混合物分離結晶硫酸鹽。

在一相關組合物態樣中，本發明提供N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苄酯亞硫酸氫鹽加合物，其適用於製備上述經保護之化合物1前軀體。

本發明亦提供如本文所述之適用於療法中或適用作藥物的本發明之結晶硫酸鹽，以及本發明之結晶硫酸鹽在製造藥物中之用途，尤其用於製造治療哺乳動物與 μ 類鴉片受體活性相關之病症的藥物。

【實施方式】

參考隨附圖式來說明本發明之多個態樣。

本發明提供3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺或其溶劑合物之結晶硫酸鹽。

定義

當描述本發明之化合物、組合物及方法時，除非另作說明，否則以下術語具有以下含義。

術語"治療有效量"意謂當投與需要治療之患者時足以實現治療之量。

如本文中所用之術語"治療"意謂治療諸如哺乳動物(尤其人類)之患者的疾病、病症或醫學病況，其包括：

- (a) 預防疾病、病症或醫學病況發生，亦即對患者之預防性治療；
- (b) 改善疾病、病症或醫學病況，亦即消除患者之疾病、病症或醫學病況或使之消退，包括抵消其他治療劑之效果。
- (c) 抑制疾病、病症或醫學病況，亦即減緩或遏止患者之疾病、病症或醫學病況的發展；或
- (d) 減輕患者之疾病、病症或醫學病況的症狀。

術語"溶劑合物"意謂由一或多個溶質分子(意即，本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽)與一或多個溶劑分子形成之錯合物或聚集體。此等溶劑合物通常為具有大體上固定之溶質與溶劑莫耳比的結晶固體。代表性溶劑包括(例如)水、甲醇、乙醇、異丙醇、乙酸及其類似物。當溶劑為水時，將形成之溶劑合物特定稱為水合物。

如本文中所用之術語"結晶硫酸鹽"或者"結晶硫酸鹽(無水形式)"或"無水硫酸鹽"意謂在晶格中不包括大體上固定之溶劑分子莫耳分數的結晶固體，亦即不為溶劑合物或水合物之物質。本發明之溶劑合物，或特別水合物經明確鑑別。

須注意除非內容另外明確規定，否則如本說明書及隨附

申請專利範圍中所用，單數形式"一"及"該"可包括複數個提及物。

活性劑

呈本發明鹽形式之活性劑，亦即化合物1係稱為3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺。或者，如依AutoNom軟體(MDL Information Systems, GmbH, Frankfurt, Germany)實施之使用IUPAC慣例，將化合物表示為3-((1*R*,3*R*,5*S*)-8-{2-[環己基甲基-((*S*)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺。本文中所用名稱因此對應於IUPAC符號，其中明確表示經取代之苯基相對於8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷基團之內定向。在其他常用命名法中，將分子之"((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基"部分以不同方式稱為((S)-2,3-二羥基-1-側氧基丙基)胺基或((S)-2,3-二羥基丙醯胺基)。

本發明之鹽形式

在一態樣中，本發明提供3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺結晶硫酸鹽。

在一態樣中，本發明之結晶硫酸鹽係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰(包括三個或三個以上及四個或四個以上繞射峰)的x射線粉末繞射(XRPD)圖來表徵： 6.58 ± 0.20 、 7.52 ± 0.20 、 9.35 ± 0.20 、 14.69 ± 0.20 、 16.01 ± 0.20 、 17.45 ± 0.20 、 17.99 ± 0.20 、 18.62 ± 0.20 、 $19.76\pm$

0.20、 21.11 ± 0.20 、 22.07 ± 0.20 、 23.18 ± 0.20 、 23.74 ± 0.20 、 24.56 ± 0.20 、 25.63 ± 0.20 、 26.45 ± 0.20 、 27.86 ± 0.20 、 28.31 ± 0.20 、 29.54 ± 0.20 、 30.59 ± 0.20 、 31.58 ± 0.20 、 33.89 ± 0.20 及 36.02 ± 0.20 。詳言之，在此態樣中，該結晶型係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰(包括三個或三個以上及四個或四個以上繞射峰)的x射線粉末繞射圖來表徵： 14.69 ± 0.20 、 16.01 ± 0.20 、 21.11 ± 0.20 、 22.07 ± 0.20 及 23.18 ± 0.20 。

如在粉末x射線繞射領域中所熟知，相較於相對峰高，XRPD光譜之峰位置對諸如試樣製備及儀器幾何尺寸之細節之實驗細節的敏感度相對較低。因此在一態樣中，化合物1之結晶硫酸鹽係由峰位置大體上與圖1中所示之彼等峰位置一致之x射線粉末繞射圖來表徵。

該結晶硫酸鹽結構已進一步由單晶x射線繞射分析來表徵，其提供以下晶格參數：單位晶胞為斜方晶，其尺寸為 $a=6.8239 \text{ \AA}$ ， $b=16.2275 \text{ \AA}$ ， $c=24.2021 \text{ \AA}$ ， $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ；晶胞體積(V)為 2680.0 \AA^3 ；計算密度為 1.38 g/cm^3 ；空間群為 $P2_12_12_1$ (#19)。所得分子結構證實化學組成為硫酸鹽平衡離子與化合物1之莫耳比為1:1之化合物1硫酸鹽的化學組成且不對稱單位晶胞不含有水或其他溶劑分子。自導出原子位置預測之x射線粉末繞射峰與所觀察之XRPD圖極為一致。

在另一態樣中，本發明之結晶硫酸鹽係由其在曝露於高溫時之行為來表徵。如圖2中所表明，高度結晶試樣之差

示掃描熱量測定(DSC)迹線顯示在約190°C至約205°C範圍內吸熱熱流之峰值，其鑑別為熔融轉變。熱解重量分析(TGA)展示在熔點以下之溫度下無顯著重量損失。熱分解大致緊接著熔融發生。

在又一態樣中，結晶硫酸鹽係由其紅外吸收光譜來表徵，該光譜在以下各處展示顯著吸收帶：約430、590、639、705、867、1036、1053、1105、1171、1231、1277、1375、1391、1452、1476、1553、1596、1639、1664、2852、2907、2928、2967、3168及3357 cm^{-1} 。

已證實化合物1之結晶硫酸鹽具有可逆吸附/解吸附概況，其具有如圖3中所示之格外低水平之吸濕性(亦即在室溫下在2%相對濕度至90%相對濕度之濕度範圍內增重小於約0.3%)。

另外，已發現在曝露於高溫及高濕後，化合物1之結晶硫酸鹽為穩定。在40°C及75%相對濕度下儲存4週後，HPLC分析展示無化學降解且DSC、TGA或XRPD結果無可偵測變化。

在另一態樣中，本發明提供化合物1之硫酸鹽的結晶水合物。

在一態樣中，本發明之硫酸鹽的結晶水合物係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰(包括三個或三個以上及四個或四個以上繞射峰)的x射線粉末繞射(XRPD)圖來表徵：9.41±0.20、9.98±0.20、15.17±0.20、16.70±0.20、18.59±0.20、19.46±0.20、19.91±0.20、20.63±

0.20、 21.35 ± 0.20 、 21.89 ± 0.20 、 23.00 ± 0.20 、 24.20 ± 0.20 、 25.40 ± 0.20 、 26.03 ± 0.20 、 27.44 ± 0.20 、 28.46 ± 0.20 、 29.45 ± 0.20 、 31.22 ± 0.20 、 31.82 ± 0.20 、 33.17 ± 0.20 、 33.56 ± 0.20 及 36.89 ± 0.20 。詳言之，在此態樣中，該結晶型係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰(包括三個或三個以上及四個或四個以上繞射峰)的x射線粉末繞射圖來表徵： 16.70 ± 0.20 、 18.59 ± 0.20 、 19.46 ± 0.20 、 19.91 ± 0.20 、 23.00 ± 0.20 及 24.20 ± 0.20 。

在另一態樣中，化合物1之硫酸鹽的結晶水合物係由峰位置大體上與圖4中所示之彼等峰位置一致之x射線粉末繞射圖來表徵。

本發明之硫酸鹽的結晶水合物亦係由其差示掃描熱量測定(DSC)圖形來表徵，該圖形顯示兩個吸熱事件：當在 $10^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 之加熱速率下分析時，吸熱熱流在約 125°C 至約 133°C 範圍內之第一峰及在約 178°C 至約 183°C 範圍內之第二峰，如圖5中說明。熱解重量分析(TGA)圖形展示在約 60°C 與約 140°C 之間的第一熱事件及在約 140°C 與約 190°C 之間的第二熱事件。在第一熱事件中蒸發之物質的TGA偶合IR分析係與具有約一莫耳水/莫耳化合物1硫酸鹽之水合物組成一致。

令人驚訝地，化合物1之硫酸鹽的結晶水合物顯示較低吸濕性。如圖6中說明，結晶水合物在室溫下在約2%至約90%相對濕度之整個範圍內顯示可逆吸附/解吸附概況，同時在整個相對濕度範圍內增重小於約0.3%。

在下文實例中進一步說明本發明之鹽形式的此等特性。

合成程序

自易於獲得之起始物質，使用下文實例中所述之程序或使用列於本申請案【先前技術】部分中之共同讓渡之美國申請案中所述的程序可製備活性劑，3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺。

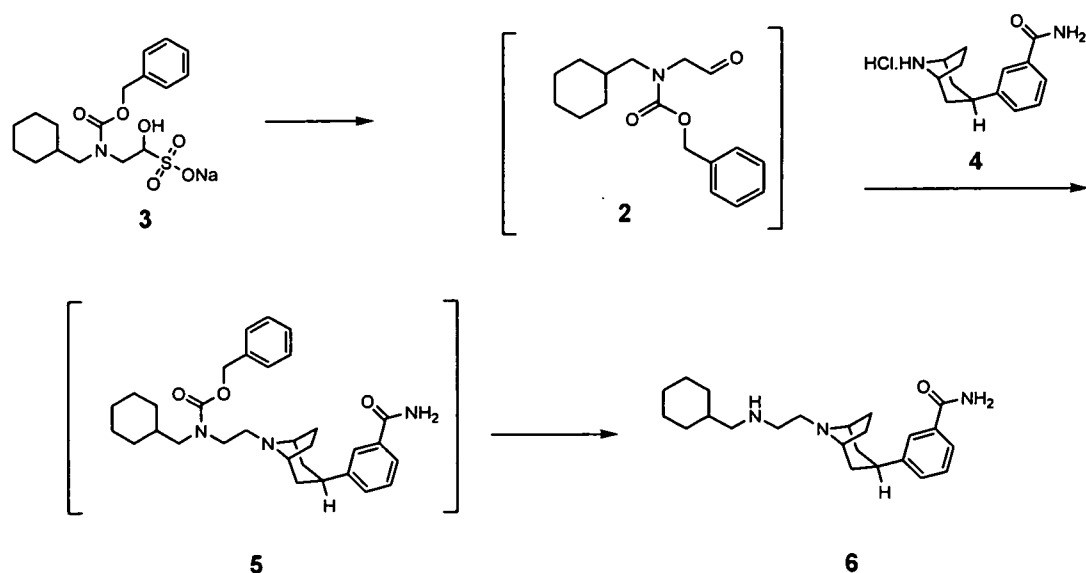
在一製備方法中，藉由使3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺與約0.5至約1.5莫耳當量(包括約1莫耳當量)硫酸接觸來製備本發明之結晶硫酸鹽。此反應一般係在惰性稀釋劑中在約0°C至約65°C，包括約60°C至約65°C範圍內之溫度下進行。除包含約10%水之甲醇水組合外，合適惰性稀釋劑包括(例如)甲醇、甲苯、二氯甲烷及諸如甲苯與乙腈、二氯甲烷與乙腈，及甲苯、乙腈與水之組合。使用此等稀釋劑，製備具有在約5 mg/mL與約400 mg/mL之間，包括在約50 mg/mL與約100 mg/mL之間濃度的反應混合物且保持約2小時至約24小時，視情況伴以攪動。在該保持期間可將混合物冷卻至約5°C與約20°C之間。

反應完成後，可藉由任何習知方法，諸如過濾、濃縮、離心及其類似方法使本發明之結晶鹽自反應混合物分離。

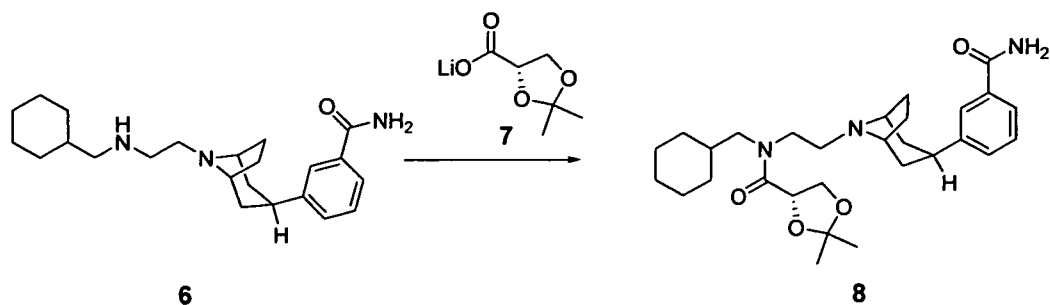
或者，藉由使水合形式再結晶來製備本發明之結晶硫酸鹽。以在約5 mg/ml與約400 mg/ml之間的濃度將結晶水合物分散於如上所述之惰性稀釋劑中。甲醇或呈約3:1至約

9:1比率之甲醇：水組合為尤其適用於此反應之稀釋劑。將反應混合物保持在約0°C至約65°C範圍內之溫度下(通常伴以攪動)約1小時至約24小時，包括約1小時至約6小時。在保持期間，通常將反應混合物自約65°C冷卻至約5°C與約20°C之間。為改良產率，溶液體積可減少約50%，隨後將反應混合物在約5°C與約20°C之間的溫度下保持約1小時與約24小時之間，包括約1小時與約6小時之間的時段。以習知方式回收所得晶體。

化合物1之結晶硫酸鹽及化合物1之硫酸鹽之結晶水合物兩者均有利地自經保護之化合物1前軀體製備。如下文實例中所述，為製備活性劑，使經保護之醛2，N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苄酯(自其亞硫酸氫鹽加合物3再生)與3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺鹽酸鹽4偶合以提供經保護之中間物5，將其去保護以提供3-內-[2-(環己基甲基胺基)乙基]-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基}苄醯胺6。



中間物6與(4S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊環-4-甲酸鋰7之反應提供經保護之中間物(S)-2,2-二甲基-[1,3]二氧戊環-4-甲酸{2-[3-(3-胺甲醯基-苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]乙基}環己基甲基-醯胺8



在約20°C與約30°C之間的溫度下，使經保護之中間物8與約0.8至約1.3當量，通常約1至約1.2當量之硫酸水溶液在諸如乙酸乙酯或乙酸異丙酯之情性稀釋劑中接觸。反應混合物中通常包括可與反應混合物混溶且產物溶解性較小之第二稀釋劑。乙腈適用作第二稀釋劑。通常將反應混合物攪拌約2小時與約72小時之間的時段，使化合物8去保護且形成化合物1之中間級固體硫酸鹽，其通常主要為化合物1之硫酸鹽的結晶水合物。可以習知方式(例如)藉由過濾來分離中間級產物。

可藉由使中間級硫酸鹽產物再結晶來獲得水合形式，例如藉由在加熱下將中間級產物懸浮於乙腈中、添加水以促進溶解、冷卻至環境溫度且分離再結晶水合形式，如下文實例2中所述。

化合物1之結晶硫酸鹽可由上述去保護步驟之中間級固態產物獲得。以約5 mg/mL與約400 mg/mL之間，包括約

50 mg/mL與約200 mg/mL之間的濃度將中間級產物分散於包含甲醇之惰性稀釋劑中。令人驚訝地，已確定具有至多25%水，包括約0%與約15%之間的水，及約5%與約15%之間的水之甲醇水組合為製備無水結晶鹽之適用稀釋劑。詳言之，包含約10%水之甲醇水組合適用於將中間級產物再結晶為本發明之無水硫酸鹽。

在一典型再結晶方法中，加熱反應混合物直至獲得完全溶解，例如將反應混合物加熱至約65°C，且接著歷經約2小時與約24小時之間的時段冷卻至約5°C與約22°C之間。視情況而言，當反應混合物在溶解溫度以下時，可添加無水硫酸鹽之晶種。以習知方式(例如)藉由過濾來回收所得晶體。

根據又一方法，水合形式可自結晶硫酸鹽(無水)形式製備。通常例如藉由凍乾或快速蒸發自結晶硫酸鹽製備之溶液來將結晶硫酸鹽首先轉化為溶解性較大的非晶型。接著將非晶固體硫酸鹽物質分散於例如25%水與75%乙腈之水性溶劑系統中，且視情況在約0°C至約65°C範圍內之溫度下，攪動約12小時以上或約24小時以上之時段。通常首先將溫度升高至約65°C且接著降低至約5°C與約20°C之間。以習知方式回收所得結晶水合物形式。

因此，在一方法態樣中，除其他方法之外，本發明提供製備化合物1之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含：(a)使經保護之化合物1前軀體(其中羥基經保護)與硫酸接觸以形成第一反應混合物；(b)自第一反應混合物分離化合物1之中

間級固體硫酸鹽；(c)將中間級固體硫酸鹽分散於包含甲醇之稀釋劑中以形成第二反應混合物；及(d)自第二反應混合物分離結晶硫酸鹽。

此外，在一組合物態樣中，本發明提供適用於製備化合物1之N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苄酯亞硫酸氫鹽加合物3。如製備1中所述，可藉由使用三乙醯氧基氫硼化鈉使環己烷甲醛經2,2-二乙氧基乙胺還原性胺化，接著添加胺基保護基、使醛官能基去保護，且藉由與亞硫酸氫鈉反應轉化成亞硫酸氫鹽加合物來製備亞硫酸氫鹽加合物3。或者可藉由催化氫化來執行初始還原性胺化。合適之氫化催化劑包括(但不限於)鈀、鉑及阮尼(Raney)鎳催化劑。

醫藥組合物

通常以醫藥組合物或調配物之形式向患者投與本發明之結晶硫酸鹽形式。可藉由任何可接受之投藥途徑向患者投與此等醫藥組合物，可接受之投藥途徑包括(但不限於)經口、經直腸、經陰道、經鼻、吸入、局部(包括經皮)及非經腸投藥模式。

因此，在本發明之一組合物態樣中，本發明係關於包含醫藥學上可接受之載劑或賦形劑及治療有效量之化合物1或其溶劑合物之結晶硫酸鹽的醫藥組合物。視情況而言，若需要，則此等醫藥組合物可含有其他治療劑及/或調配劑。當討論組合物時，應瞭解術語"本發明之鹽"包括化合物1以及其溶劑合物，尤其水合物之結晶硫酸鹽。

本發明之醫藥組合物通常含有治療有效量之以本發明之鹽形式存在的活性劑。通常此等醫藥組合物將含有約0.1重量%至約95重量%活性劑；較佳約5重量%至約70重量%；且更佳約10重量%至約60重量%活性劑。

任何習知載劑或賦形劑可用於本發明之醫藥組合物中。特定載劑或賦形劑，或載劑或賦形劑之組合的選擇將視用以治療特定患者或醫學病況或疾病病況類型之投藥模式而定。就此而言，用於特定投藥模式之合適醫藥組合物的製備完全在熟習製藥技術者之範疇內。另外，用於本發明之醫藥組合物的載劑或賦形劑可為外購。藉由進一步說明，在以下文獻中描述習知調配技術：*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第20版，Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000)；及H.C. Ansel等人*Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*，第7版，Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)。

可充當醫藥學上可接受之載劑之物質的代表性實例包括(但不限於)以下各者：糖，諸如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，諸如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素，諸如微晶纖維素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；粉末黃耆膠；麥芽；明膠；滑石；賦形劑，諸如可可脂及栓劑蠟；油，諸如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油及大豆油；二醇，諸如丙二醇；多元醇，諸如丙三醇、山梨糖醇、甘露糖醇及聚乙二醇；

酯，諸如油酸乙酯及月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，氫氧化鎂及氫氧化鋁；褐藻酸；無熱原質水；等張鹽水；林格氏溶液(Ringer's solution)；乙醇；磷酸鹽緩衝液；及其他用於醫藥組合物中之無毒性相容物質。

通常藉由充分及緊密混合或摻合活性劑與醫藥學上可接受之載劑及一或多種可選成份來製備醫藥組合物。接著可使用習知程序及設備將所得均勻摻合之混合物成形或裝填於錠劑、膠囊、丸劑及其類似物中。

本發明之醫藥組合物較佳以單位劑型包裝。術語"單位劑型"係指適用於對患者給藥之實體離散單元，意即，每一單元含有預定量之活性劑，其經計算以單獨或與一或多個額外單元組合來產生所需治療效果。舉例而言，此等單位劑型可為膠囊、錠劑、丸劑及其類似物，或適用於非經腸投與之單位包裝。

在一實施例中，本發明之醫藥組合物適合於經口投與。用於經口投與之合適醫藥組合物可呈膠囊、錠劑、丸劑、口含劑、扁膠劑、糖衣藥丸、散劑、顆粒劑之形式；或呈水性或非水性液體中之溶液或懸浮液之形式；或呈水中油型或油中水型液體乳液之形式；或呈醃劑或糖漿之形式；及其類似劑型；每一者含有預定量之本發明之化合物作為活性成份。

當意欲以固體劑型(亦即以膠囊、錠劑、丸劑及其類似劑型形式)經口投與時，本發明之醫藥組合物將通常包含活性劑及一或多種醫藥學上可接受之載劑，諸如檸檬酸鈉

或磷酸二鈣。視情況或其他，此等固體劑型亦可包含：填充劑或增補劑，諸如澱粉、微晶纖維素、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇及/或矽酸；黏合劑，諸如羧甲基纖維素、褐藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、蔗糖及/或阿拉伯膠；保濕劑，諸如甘油；崩解劑，諸如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、褐藻酸、某些矽酸鹽，及/或碳酸鈉；溶液阻滯劑，諸如石蠟；吸收促進劑，諸如第四銨化合物；濕潤劑，諸如十六醇及/或單硬脂酸甘油酯；吸附劑，諸如高嶺土及/或膨潤土；潤滑劑，諸如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉及/或其混合物；著色劑；及緩衝劑。

脫模劑、濕潤劑、塗佈劑、甜味劑、調味劑及芳香劑、防腐劑及抗氧化劑亦可存在於本發明之醫藥組合物中。醫藥學上可接受之抗氧化劑之實例包括：水溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸、半胱胺酸鹽、硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉、亞硫酸鈉及其類似物；油溶性抗氧化劑，諸如棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基大茴香醚、丁基化羥基甲苯、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及其類似物；及金屬螯合劑，諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸、山梨糖醇、酒石酸、磷酸及其類似物。用於錠劑、膠囊、丸劑及其類似劑型之塗佈劑包括用於腸溶衣之塗佈劑，諸如鄰苯二甲酸乙酸纖維素、聚乙酸乙烯酯鄰苯二甲酸酯、鄰苯二甲酸羥丙基甲基纖維素、甲基丙烯酸甲基丙烯酸酯共聚物、苯偏三酸乙酸纖維素、羧甲基乙基纖維素、丁二酸乙酸羥丙基甲基纖維

素及其類似物。

亦可使用(例如)不同比例之羥丙基甲基纖維素；或其他聚合物基質、脂質體及/或微球體來調配本發明之醫藥組合物以提供活性劑之緩慢或受控釋放。另外，本發明之醫藥組合物可視情況含有乳濁劑，且可經調配以使其僅或優先在胃腸道之特定部分視情況以延時方式釋放活性成份。可使用之嵌埋組合物的實例包括聚合物質及蠟。活性劑亦可呈用(若適當)一或多種上述賦形劑微囊封之形式。

用於經口投與之合適液體劑型包括(例如)醫藥學上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿及酞劑。液體劑型通常包含活性劑及惰性稀釋劑(諸如水或其他溶劑)、增溶劑及乳化劑(諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇)、油(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇及脫水山梨糖醇之脂肪酸酯及其混合物。除活性成份以外，懸浮液可含有懸浮劑，諸如乙氧基化異硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇及脫水山梨糖醇酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂及黃蓍膠及其混合物。

本發明之鹽亦可非經腸投與(例如藉由靜脈內、皮下、肌肉內或腹膜內注射)。對於非經腸投與而言，活性劑通常與用於非經腸投與之合適媒劑混合，該合適媒劑包括(例如)無菌水溶液、生理食鹽水、諸如丙二醇之低分子量醇、聚乙二醇、植物油、明膠、諸如油酸乙酯之脂肪酸

酯，及其類似物。非經腸調配物亦可含有一或多種抗氧化劑、增溶劑、穩定劑、防腐劑、濕潤劑、乳化劑或分散劑。可藉由使用無菌可注射介質、滅菌劑、過濾、照射或熱來使此等調配物無菌。

或者，本發明之醫藥組合物經調配以藉由吸入投與。用於藉由吸入來投與之合適醫藥組合物通常將呈氣霧劑或粉末之形式。一般使用諸如定量吸入器、乾粉吸入器、噴霧器或類似傳遞裝置之熟知傳遞裝置來投與此等組合物。

當藉由使用加壓容器吸入投藥時，本發明之醫藥組合物將通常包含活性成份及諸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合適氣體之合適推進劑。另外，醫藥組合物可呈膠囊或藥筒(例如由明膠製得)之形式，其包含本發明之化合物及適於粉末吸入器中使用之粉末。合適之粉末基質包括(例如)乳糖或澱粉。

本發明之鹽亦可使用已知經皮傳遞系統及賦形劑來經皮投與。舉例而言，活性劑可與諸如丙二醇、聚乙二醇單月桂酸酯、氮雜環烷-2-酮及其類似物之滲透增強劑混合，且併入貼片或類似傳遞系統中。若需要，則包括膠凝劑、乳化劑及緩衝劑之額外賦形劑可用於此等經皮組合物中。

若需要，則本發明之鹽可與一或多種其他治療劑組合投與。在此實施例中，本發明之鹽與其他治療劑物理混合以形成含有兩者藥劑之組合物；或各藥劑以獨立且不同之組合物形式存在，該等組合物係同時或依次投與患者。

舉例而言，可使用習知程序及設備將本發明之鹽與第二

治療劑組合以形成包含化合物1及第二治療劑之組合物。另外，治療劑可與醫藥學上可接受之載劑組合以形成包含本發明之鹽、第二治療劑及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在此實施例中，通常混合或摻合組合物之組份以產生物理混合物。接著使用本文所述之任何途徑以治療有效量投與該物理混合物。或者，治療劑在投與患者之前可保持獨立且不同。在此實施例中，藥劑在投與之前並不物理上混合在一起，但作為獨立組合物同時或在獨立時間投與。此等組合物可獨立包裝或可以套組形式包裝在一起。套組中之兩種治療劑可藉由相同投藥途徑或藉由不同投藥途徑來投與。

任何與本發明活性劑相容之治療劑可用作第二治療劑。詳言之，經由不同於 μ 類鴉片受體拮抗作用之機制起作用之胃腸道蠕動促進劑(prokinetic agent)可與本發明之化合物組合使用。例如5-HT₄受體促效劑，諸如替加色羅(tegaserod)、倫紫必利(renzapride)、莫沙必利(mosapride)、普卡必利(prucalopride)、1-異丙基-1H-吡啶-3-甲酸{(1S,3R,5R)-8-[2-(4-乙醯基哌嗪-1-基)乙基]-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基}醯胺、1-異丙基-2-側氧基-1,2-二氫喹啉-3-甲酸{(1S,3R,5R)-8-[(R)-2-羥基-3-(甲烷磺醯基-甲基-胺基)丙基]-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基}醯胺或4-(4-[(2-異丙基-1H-苯并咪唑-4-羰基)胺基]甲基)-哌啶-1-基甲基)哌啶-1-甲酸甲酯可用作第二治療劑。

其他適用之胃腸道蠕動促進劑包括(但不限於)5-HT₃受體

促效劑(例如 pamosetrag)、5-HT_{1A}受體拮抗劑(例如 AGI 001)、 α -2- δ 配位體(例如 PD-217014)、氯離子通道開啟劑(例如魯比前列酮(lubiprostone))、多巴胺拮抗劑(例如伊托必利(itopride)、減吐靈(metaclopramide)、多潘立酮(domperidone))、GABA-B促效劑(例如氯苯胺丁酸、AGI 006)、 κ 類鴉片促效劑(例如阿西馬朵林(asimadoline))、蕁毒鹼M₁及M₂拮抗劑(例如acotiamide)、腸動素促效劑(例如米坦西諾(mitemcinal))、鳥苷酸環化酶活化劑(例如MD-1100)及饑餓激素(ghrelin)促效劑(例如Tzp 101、RC 1139)。

另外，本發明之鹽可與類鴉片治療劑組合。此等類鴉片劑包括(但不限於)嗎啡鹼、哌替啶(pethidine)、可待因(codeine)、雙氫可待因(dihydrocodeine)、奧施康定(oxycontin)、氧可酮(oxycodone)、氫可酮(hydrocodone)、舒芬太尼(sufentanil)、芬太尼(fentanyl)、瑞芬太尼(remifentanil)、丁丙諾啡(buprenorphine)、美沙酮(methadone)及海洛英(heroin)。

在此項技術中已知此等治療劑之大量其他實例且任何此等已知治療劑可與本發明之化合物組合使用。第二藥劑(若包括)係以治療有效量存在，亦即以與本發明之化合物共投與時產生治療有利效果之任何量存在。與本發明之化合物組合投與之其他治療劑的合適劑量通常在約0.05微克/天至約100毫克/天之範圍內。

因此，本發明之醫藥組合物視情況包括如上所述之第二

治療劑。

以下實例說明本發明之代表性醫藥組合物：

調配物實例A：用於經口投與之硬明膠膠囊

充分摻合本發明之鹽(50 g)、噴霧乾燥乳糖(200 g)及硬脂酸鎂(10 g)。將所得組合物裝填於硬明膠膠囊中(260 mg組合物/膠囊)。

調配物實例B：用於經口投與之硬明膠膠囊

充分摻合本發明之鹽(20 mg)、澱粉(89 mg)、微晶纖維素(89 mg)及硬脂酸鎂(2 mg)且接著使其通過第45號網目美國篩。將所得組合物裝填於硬明膠膠囊中(200 mg組合物/膠囊)。

調配物實例C：用於經口投與之明膠膠囊

充分摻合本發明之鹽(10 mg)、聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯(50 mg)及澱粉(250 mg)且接著將其裝填於明膠膠囊中(310 mg組合物/膠囊)。

調配物實例D：用於經口投與之錠劑

將本發明之鹽(5 mg)、澱粉(50 mg)及微晶纖維素(35 mg)通過第45號網目美國篩且充分混合。將聚乙炔吡咯啉酮(10重量%在水中，4 mg)溶液與所得粉末混合，且接著使此混合物通過第14號網目美國篩。使如此產生之顆粒在50-60°C下乾燥且通過第18號網目美國篩。接著添加先前已通過第60號網目美國篩之羧甲基澱粉鈉(4.5 mg)、硬脂酸鎂(0.5 mg)及滑石(1 mg)至顆粒中。混合之後，在製錠機上壓縮混合物以得到重100 mg之錠劑。

調配物實例E：用於經口投與之錠劑

充分摻合本發明之鹽(25 mg)、微晶纖維素(400 mg)、煙霧狀二氧化矽(10 mg)及硬脂酸(5 mg)且接著將其壓縮以形成錠劑(440 mg組合物/錠劑)。

調配物實例F：用於經口投與之單面刻痕錠劑(Single-scored Tablet)

充分摻合本發明之鹽(15 mg)、玉米澱粉(50 mg)、交聯羧甲纖維素鈉(25 mg)、乳糖(120 mg)及硬脂酸鎂(5 mg)且接著將其壓縮以形成單面刻痕錠劑(215 mg組合物/錠劑)。

調配物實例G：用於經口投與之懸浮液

充分混合以下成份以形成用於經口投與之懸浮液，其含有100 mg活性成份/10 mL懸浮液：

成份	量
本發明之鹽	0.1 g
反丁烯二酸	0.5 g
氯化鈉	2.0 g
對羥基苯甲酸甲酯	0.15 g
對羥基苯甲酸丙酯	0.05 g
砂糖	25.5 g
山梨糖醇(70%溶液)	12.85 g
維格姆(Veegum)k(Vanderbilt Co.)	1.0 g
調味劑	0.035 mL
著色劑	0.5 mg
蒸餾水	適量補足至100 mL

調配物實例H：乾粉組合物

將微米尺寸化之本發明鹽(1 mg)與乳糖(25 mg)摻合且接著裝填於明膠吸入藥筒中。使用粉末吸入器來投與藥筒內容物。

調配物實例J：可注射調配物

將本發明之鹽(0.1 g)與0.1 M檸檬酸鈉緩衝溶液(15 mL)摻合。使用1 N鹽酸水溶液或1 N氫氧化鈉水溶液將所得溶液之pH值調節為pH 6。接著添加在檸檬酸鹽緩衝劑中之無菌生理食鹽水以提供20 mL之總體積。

應瞭解適用於特定投藥模式之任何形式的本發明之鹽(亦即結晶鹽或溶劑合物)可用於上文討論之醫藥組合物中。

效用

本發明之活性劑，3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽為 μ 類鴉片受體拮抗劑且因此預期本發明之鹽適用於治療由 μ 類鴉片受體介導或與 μ 類鴉片受體活性相關之醫學病況，亦即藉由用 μ 類鴉片受體拮抗劑治療而得以改善之醫學病況。詳言之，預期本發明之鹽適用於治療與使用類鴉片止痛劑相關之不良反應，亦即諸如便秘、胃排空性減小、腹痛、氣脹、噁心及胃食道逆流之症狀，其統稱為類鴉片誘導之腸功能障礙。亦預期本發明之鹽形式適用於

治療術後腸塞絞痛，即在腹部或其他手術之後發生之胃腸道能動性減小之病症。另外，已提出諸如化合物1之 μ 類鴉片受體拮抗劑化合物可用於逆轉類鴉片誘導之噁心及嘔吐。

因為已展示在動物模型中化合物1增加胃腸(GI)道之能動性，所以預期本發明之鹽適用於治療由包括人類之哺乳動物能動性減小引起之GI道病症。此等GI能動性病症包括(例如)慢性便秘、以便秘為主之大腸急躁症(C-IBS)、糖尿病性胃輕癱及自發性胃輕癱及功能性消化不良。

因此在一態樣中，本發明提供增加哺乳動物胃腸道能動性之方法，該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之包含醫藥學上可接受之載劑及本發明之鹽的醫藥組合物。

當用以治療GI道能動性減小之病症或由 μ 類鴉片受體介導之其他病況時，本發明之鹽通常將以單一日劑量或以每天多次劑量來經口投與，儘管可使用其他投藥形式。舉例而言，尤其當用以治療術後腸塞絞痛時，本發明之化合物可非經腸投與。每劑量投與之活性劑之量或每天投與之總量將通常由醫師根據相關情況，包括待治療之病況、所選投藥途徑、實際所投與之化合物及其相對活度、個別患者之年齡、體重及反應、患者症狀之嚴重程度及其類似情況來決定。

用於治療GI道能動性減小病症或由 μ 類鴉片受體介導之其他病症的合適劑量將在約0.0007毫克/公斤/天活性劑至約20毫克/公斤/天活性劑，包括約0.0007毫克/公斤/天活性

劑至約1.4毫克/公斤/天活性劑之範圍內。對於平均70公斤之人類而言，此將等於約0.05毫克/天活性劑至約100毫克/天活性劑。

在本發明之一態樣中，本發明之化合物係用以治療類鴉片誘導之腸功能障礙。當用以治療類鴉片誘導之腸功能障礙時，本發明之化合物將通常以單一日劑量或以每天多次劑量來經口投與。用於治療類鴉片誘導之腸功能障礙之劑量較佳將在約0.05毫克/天至約100毫克/天之範圍內。

在本發明之另一態樣中，本發明之化合物係用以治療術後腸塞絞痛。當用以治療術後腸塞絞痛時，本發明之化合物將通常以單一日劑量或以每天多次劑量來經口或靜脈內投與。用於治療術後腸塞絞痛之劑量較佳將在約0.05毫克/天至約100毫克/天之範圍內。

本發明亦提供治療具有與 μ 類鴉片受體活性相關之疾病或病況的哺乳動物之方法，該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之本發明之化合物或包含本發明之化合物的醫藥組合物。

本發明之活性劑視情況與另外一或多種治療劑組合投與，尤其與經由非 μ 類鴉片機制起作用之胃腸道蠕動促進劑組合投與。因此在另一態樣中，本發明之方法及組合物另外包含治療有效量之另一胃腸道蠕動促進劑。

如上所述，本發明之鹽為 μ 類鴉片受體拮抗劑。因此本發明另外提供拮抗哺乳動物之 μ 類鴉片受體的方法，該方法包含向哺乳動物投與本發明之鹽。

除其他特性之外，已發現呈游離鹼及硫酸鹽形式之本發明活性劑在 μ 受體功能檢定中顯示與 μ 類鴉片受體之有效結合且很少有或無促效作用。因此，本發明之鹽為有效 μ 類鴉片受體拮抗劑。另外，在動物模型中，活性劑已顯示與中樞神經系統活性比較主要為周邊活性。因此，可預期本發明之鹽逆轉類鴉片誘導之GI能動性減小，而不干擾鎮痛之有利中樞效應。使用熟習此項技術者熟知之各種活體外及活體內檢定，可證明本發明化合物之此等特性以及效用。在以下實例中進一步詳細描述代表性檢定。

實例

提供以下合成及生物實例以說明本發明，且不應以任何方式將其視為限制本發明之範疇。在以下實例中，除非另作說明，否則以下縮寫具有以下含義。未在下文定義之縮寫具有其一般接受之含義。

DIPEA	=	<i>N,N</i> -二異丙基乙胺
DMF	=	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
EtOAc	=	乙酸乙酯
EtOH	=	乙醇
MeTHF	=	2-甲基四氫呋喃
MTBE	=	第三丁基甲基醚
NaHMDS	=	雙(三甲基矽烷基)醯胺鈉
PyBop	=	六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三吡咯啶基鎂
psi	=	磅/平方吋
R _t	=	滯留時間

THF = 四氫呋喃

試劑及溶劑係購自商業供應商 (Aldrich、Fluka、Sigma 等)，且未經進一步純化即使用。除非另外規定，否則反應係在氮氣氛下進行。藉由薄層層析 (TLC)、分析高效液相層析 (分析 HPLC) 及質譜分析來監測反應混合物之進程。藉由 HPLC 分析使用下述協定來測定產物之內/外比。反應混合物係如各反應中具體所述而處理；其一般藉由萃取及其他諸如溫度及溶劑依賴性結晶及沈澱之純化法加以純化。通常藉由質譜及 $^1\text{H-NMR}$ 光譜測定法進行反應產物之表徵。對於 NMR 量測而言，將試樣溶解於氘化溶劑 (CD_3OD 、 CDCl_3 或 $\text{DMSO-}d_6$) 中，且 $^1\text{H-NMR}$ 光譜係用 Varian Gemini 2000 儀器 (300 MHz) 在標準觀測條件下獲得。藉由電噴霧電離法 (ESMS) 使用 Applied Biosystems (Foster City, CA) 型號 API 150 EX 儀器或 Agilent (Palo Alto, CA) 型號 1100 LC/MSD 儀器進行化合物之質譜鑑別。

通用 HPLC 條件

管柱： Zorbax SB-Aq, 5 μm . 4.6 \times 250 mm
 管柱溫度： 40 $^\circ\text{C}$
 流速： 1.0 mL/min
 移動相： A=水/ACN (98:2)+0.1% TFA
 B=水/ACN (10:90)+0.1% TFA，
 注射體積： 10 μL
 偵測器波長： 214 nm

HPLC方法1

以約1 mg/mL將粗化合物溶解於水/ACN(50:50)中且使用以下梯度歷經20 min加以分析，(時間(min)/% B)：0/10、2.5/20、9/75、15/90、17/90、18/10、20/10。

HPLC方法2

以約1 mg/mL將化合物溶解於水/ACN(90:10)中且使用以下梯度歷經30 min加以分析，(時間(min)/% B)：0/10、13/10、23/65、28/90、29/90、30/10。

HPLC方法3

以約1 mg/mL將化合物溶解於水/ACN(90:10)中且使用以下梯度歷經55 min加以分析，(時間(min)/% B)：0/10、10/20、46/75、47/90、50/10、55/10。

製備1：N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苄酯亞硫酸氫鹽加合物之合成

a. N-環己基甲基-(2,2-二乙氧基乙基)胺之製備

向2,2-二乙氧基乙胺(209 mL, 1.43 mol)與MeTHF(1050 L)之混合物中添加環己烷甲醛(107 mL, 0.89 mol)。將反應混合物在室溫下攪拌30 min且冷卻至0°C。歷經40 min添加三乙醯氧基硼氫化鈉(378 g, 1.79 mol)且將反應混合物攪拌2 h且冷卻至0°C。添加1 M NaOH(1 L)。以於水中之鹽水(1:1, 2 × 1 L)洗滌有機層且將體積縮減至約20%。添加MeTHF(1 L)且將體積縮減至約20%。將粗標題中間物之溶液直接用於下一步驟中。

b. N-環己基甲基-(2,2-二乙氧基乙基)胺基甲酸苄酯之製備

向先前步驟之產物(約 213 g, 約 0.9 mol)中添加 MeTHF(2 L)及 DIPEA(233 mL, 1.34 mol)。將反應混合物冷卻至 0°C 且逐滴添加氯甲酸苄酯(140 mL, 0.98 mol)。將反應混合物在 0°C 下攪拌 30 min, 在 0°C 至室溫下攪拌 2 h, 且接著在室溫下攪拌 1 h。添加水(1.6 L)且將反應混合物攪拌 10 min。分離各相且以碳酸氫鈉(1.6 L)及水(1.6 L)洗滌有機層。分離各層且將有機層縮減至約 20%。添加 MeTHF(1 L)且將體積縮減至約 20%。將粗標題中間物之溶液直接用於下一步驟中。

c. N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苄酯亞硫酸氫鹽加合物之合成

向先前步驟之產物(約 302 g, 約 0.62 mol)及乙腈(2 L)中添加 1 M HCl(2 L)且在 30°C 下攪拌反應混合物 7 h。添加乙酸乙酯(2 L)且攪拌反應混合物 10 min。分離各相, 以 1 M HCl(1.5 L)洗滌有機層, 再分離各相且以 0.5 M HCl(1 L)洗滌有機層。添加亞硫酸氫鈉(71.4 g, 0.69 mol)且將反應混合物攪拌隔夜且接著過濾。以乙酸乙酯(1 L)洗滌反應器及濾餅。將所得溶液在空氣中乾燥 2 h 且在真空下乾燥隔夜以得到呈白色固體狀之標題化合物(199 g, 根據 HPLC 純度大於 99% 面積)。由相同程序處理濾液以得到第二批標題化合物(30 g)。

製備 2 : 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺之合成**a. 8-苄基-3-外-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-醇**

之製備

向3 L燒瓶中添加氯化銻粉末(194 g, 0.79 mol)。以氮吹拂燒瓶且添加THF(800 mL)。在25°C下攪拌反應混合物1 h。向混合物中逐滴添加約1 M在THF中之3-甲氧基苯基溴化鎂(800 mL, 0.87 mol)。在3°C下攪拌所得漿料1.5小時。接著添加逐滴8-苄基-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-酮(120.4 g, 0.56 mol)於THF(200 mL)中之溶液，同時保持內部溫度在-5°C。攪拌所得溶液15 min。添加反應混合物至將溫度保持在10°C並含有6 N HCl(800 mL)的燒瓶中。藉由旋轉蒸發移除溶劑之後，將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。藉由過濾來分離固體，將其以6 N HCl(70 mL)及乙腈(3 × 70 mL)洗滌，且乾燥以得到呈奶白色固體狀之標題中間物的鹽酸鹽(161 g)。

b. 8-苄基-3-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-2-烯之製備

向3 L燒瓶中添加8-苄基-3-外-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-醇鹽酸鹽(383.9 g, 1.06 mol)、6 M HCl(800 mL)及MeTHF(200 mL)。將所得漿料在氮下在70°C下加熱2.5 h。將反應混合物轉移至12 L反應器中且冷卻至10°C。將反應燒瓶以MeTHF(1 L)洗滌並將其添加至12 L反應器中。添加NaOH(50重量%在水中, 200 mL)且逐份添加另外NaOH(50重量%, 150 mL)直至達到pH值約13。分離各相，以MeTHF(1 L)萃取水層，且以鹽水(1 L)洗滌經組合之MeTHF層。藉由在30°C至40°C下旋轉蒸發來減少溶劑，產生呈稠厚油狀之標題中間物(360 g)。添加EtOH(1.5 L)且

將體積縮減至約 500 mL 且接著調節為 1.8 L。

c. 3-內-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷之製備

向先前步驟中製備之 8-苄基-3-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-2-烯(在 95% EtOH 中, 400 mL, 0.20 mol) 中添加 6 M HCl(45 mL) 且接著添加 MeTHF(50 mL)。將反應混合物以氮淨化, 加熱至 40°C 且添加鈀/碳(10 重量%, 8 g)。將反應器以氮(3 × 20 psi)加壓且接著在 20 psi 下在 40°C 下氫化 18 h。將反應混合物經由矽藻土過濾、濃縮、以 MeTHF(2 × 100 mL)洗滌、經由粗糙玻璃過濾器過濾、以 MeTHF(10 mL)洗滌且在過濾器上乾燥以得到呈白色固體狀之標題中間物的鹽酸鹽(31 g, 單一異構體, (由 HPLC 不可偵測外異構體))。自母液中回收另外 5.2 g 產物。

d. 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苯酚之製備

向 500 mL 燒瓶中添加 3-內-(3-甲氧基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛烷鹽酸鹽(115 g, 0.45 mol) 及 氫溴酸(48 重量% 在水中, 100 mL, 0.88 mol)。將混合物加熱至 120°C 且在攪拌下保持於該溫度 24 h。添加另外 氫溴酸溶液(25 mL) 且將反應混合物在攪拌下加熱 6 小時且接著冷卻至 70°C。添加 乙腈(200 mL) 且將所得漿料冷卻至 10°C 且接著過濾, 且以 乙腈(50 mL) 洗滌濾餅以產生呈白色顆粒固體狀之標題中間物的 氫溴酸鹽(99 g, 純度大於 99%)。

e. 2,2,2-三氟-1-[3-內-(3-羥苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]乙酮之製備

歷經 20 min 向 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苯酚 氫溴

酸鹽(54.4 g, 0.19 mol)、甲苯(210 mL)及三乙胺(40 mL, 0.29 mol)之溶液中添加三氟乙酸酐(54 mL, 0.38 mol)。在40°C下攪拌反應混合物2 h。添加乙酸乙酯(370 mL)及於水中之鹽水(1:1, 265 mL)。攪拌反應混合物15 min, 分離各相。向有機層中添加飽和碳酸氫鈉(300 mL)且將混合物劇烈攪拌隔夜。分離各相且將有機層以於水中之鹽水(1:1, 265 mL)洗滌, 經硫酸鈉乾燥且藉由旋轉蒸發移除大部分溶劑。添加甲苯(100 mL)且藉由旋轉蒸發移除溶劑以得到粗標題中間物。

f. 三氟甲烷磺酸3-內-[8-(2,2,2-三氟-乙醯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基]苯酯之製備

向500 mL燒瓶中添加先前步驟之中間物(32.8 g, 0.11 mol)與三乙胺(23 mL, 0.17 mol)之乙酸乙酯溶液(220 mL)。將溶液冷卻至5°C且逐滴添加三氟甲烷磺醯氯(14 mL, 0.13 mol)。將混合物溫至25°C且在該溫度下攪拌1 h。添加飽和碳酸氫鈉(200 mL), 分離各層, 添加鹽水(150 mL)至有機層, 再分離各層, 且自有機層中移除溶劑以得到粗標題中間物。

g. 3-內-[8-(2,2,2-三氟乙醯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基]-苯甲腈之製備

向100 mL燒瓶中添加三氟甲烷磺酸3-內-[8-(2,2,2-三氟-乙醯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基]苯酯(25.3 g, 58.7 mmol)、參(二亞苄基丙酮)二鈾(0)(0.81g, 0.9 mmol)、1,1'-雙(二苯膦基)二茂鐵(1.01 g, 1.8 mmol)及氰化鋅(4.2

g, 35.8 mmol)。三次以氮淨化燒瓶5 min且接著將其置於室內真空下歷時5 min。向燒瓶中添加DMF(150 mL)及蒸餾水(2.5 mL)。將該溶液在攪拌下以氮淨化10 min, 加熱至120°C且在120°C下在氮下攪拌4 h。當反應完成時, 添加20 g來自藉由相同程序製備之先前批次之產物, 且攪拌20 min。

藉由蒸餾移除大部分溶劑且將溶液冷卻至22°C。向溶液中添加乙酸乙酯(445 mL)且將所得溶液經由矽藻土過濾。添加碳酸氫鈉(450 mL)且攪拌溶液15 min。分離各層且以稀鹽水(2 × 95 mL)洗滌有機層, 且經由硫酸鈉過濾。藉由移除乙酸乙酯將體積縮減至約50 mL。添加異丙醇(150 mL)且在22°C下攪動溶液1 h。藉由過濾分離固體且將其以異丙醇(2 × 25 mL)洗滌以得到呈奶白色/淺褐色固體狀之標題中間物(33.5 g, 根據HPLC純度為100%)。自濾液中分離第二批產物(6.3 g, 根據HPLC純度大於98%)。

h. 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺之合成

在攪拌下將3-內-[8-(2,2,2-三氟乙醯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基]-苯甲腈(10 g, 32 mmol)在硫酸(96%, 12 mL)中之溶液加熱至50°C且在攪拌下保持於該溫度歷時2 h。將反應混合物冷卻至22°C且將其緩慢添加至含有5 N NaOH(90 mL)及甲醇(100 mL)並冷卻至10°C之500 mL燒瓶中。過濾鹽沈澱物且在22°C下攪拌濾液1 h。在減壓下濃縮反應混合物。向殘餘物中添加MeTHF(150 mL)且在22°C下攪拌反應混合物5 min。分離各層且添加MeTHF(100

mL)至水層中。分離各層且添加鹽水(150 mL)至經組合之有機層中。分離各層且將有機層以碳酸鉀乾燥且過濾，且移除溶劑。在攪拌下添加EtOH(25 mL)與濃鹽酸(2.6 mL)之混合物至殘餘物中，且接著添加MTBE(25 mL)且在22°C下攪拌溶液。將沈澱之固體過濾且風乾以得到呈白色固體狀之標題化合物的鹽酸鹽(8 g，根據HPLC純度為97%)。

製備3：3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺之合成

a. 三氟-甲烷磺酸8-苄基-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-2-烯-3-基酯之製備

向500 mL燒瓶中添加8-苄基-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-酮鹽酸鹽(50.4 g，200 mmol)、EtOAc(160 mL)及4 N NaOH(50 mL)。將反應混合物加熱至30°C且在該溫度下攪拌1 h。分離各層且棄去水層。藉由旋轉蒸發將有機層之體積縮減至約40 mL且添加THF(270 mL)。

將所得溶液添加至1 L燒瓶中且冷卻至-20°C。歷經15 min添加NaHMDS溶液(1 M在THF中，230 mL，230 mmol)至燒瓶中。在-20±5°C下攪拌反應混合物1 h。歷經5 min逐份添加N-苄基-雙(三氟甲烷磺醯亞胺)(82.2 g，230 mmol)至反應混合物中且在-20°C至-10°C下攪拌混合物1 h。向反應混合物中添加1 N NaOH(200 mL)且使混合物在攪拌下溫至22°C。藉由在30°C下旋轉蒸發部分移除溶劑至450 mL之體積。向剩餘反應混合物中添加EtOAc(300 mL)及庚烷(150 mL)。在22°C下攪拌混合物5 min。分離各層且棄去水層。以1 N NaOH(3 × 450 mL)洗滌有機層。棄去水層。藉

由旋轉蒸發濃縮有機層以得到標題中間物(77 g, 根據HPLC方法1純度大於96%)。

^1H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 7.25-7.35 (m, 5H), 6.05 (d, $J=5.2$, 1H), 3.64 (q, $J=13.2$, 2H), 3.40-3.44 (m, 2H), 2.77 (d, $J=16.4$, 1H), 1.79-2.09 (m, 5H), 1.52-1.59 (m, 1H)。

b. 3-(8-苄基-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-2-烯-3-基)苄醯胺之製備

向先前步驟之粗產物中添加THF(420 mL)且以氮淨化溶液5 min。向2 L燒瓶中添加3-胺甲醯基苯基醯酸(98%, 33.0 g, 200 mmol)、乙酸鈮(II)(98%, 0.46 g, 2 mmol)、1,1'-雙(二苯膦基)二茂鐵(97%, 1.1 g, 2 mmol)及氟化鉀(34.9 g, 600 mmol), 接著添加三氟-甲烷磺酸8-苄基-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-2-烯-3-基酯之THF溶液。將所得混合物以氮淨化5 min, 在氮下加熱至回流(67°C)且攪拌2 h。將反應混合物冷卻至30°C, 接著添加EtOAc(500 mL)及1 N NaOH(500 mL)且在22°C下攪拌混合物10 min。分離各層且棄去水層。將有機層以鹽水(250 mL)與水(250 mL)之混合物洗滌且攪拌5 min。分離各層且棄去水層。將有機層暫時經 Na_2SO_4 乾燥、過濾且部分移除溶劑。在溶劑移除期間, 產物沈澱為淺黃色固體。過濾所得漿料(約200 mL)且將固體以冷EtOAc(0°C, 100 mL)洗滌, 且在高真空下在25°C下乾燥以得到呈淺黃色固體狀之標題中間物(42.5 g)。

組合並濃縮母液及上文洗滌液, 且在5°C下攪拌所得漿料(約100 mL)30 min且過濾。將經過濾之固體以冷

EtOAc(0°C, 30 mL)洗滌且在高真空下乾燥以得到第二批標題中間物(7 g, 組合產率為78%, 根據HPLC方法1純度大於98.5%)。

(m/z): $[M+H]^+$ $C_{21}H_{22}N_2O$ 之計算值, 319.18; 實驗值319.4。¹H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 7.9 (s, 1H), 7.63 (d, $J=6.4$, 1H), 7.57 (d, $J=6.4$, 1H), 7.21-7.42 (m, 6H), 6.38 (d, $J=4.4$, 1H), 6.13 (s, br, 1H), 5.83 (s, br, 1H), 3.68-3.76 (m, 2H), 3.46-3.51 (m, 2H), 2.92 (d, $J=17.2$, 1H), 2.18-2.26 (m, 1H), 2.04-2.12 (m, 2H), 1.86-1.92 (m, 1H), 1.58-1.65 (m, 1H)。

c. 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺之合成

向1 L氫化容器中添加3-(8-苄基-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-2-烯-3-基)苄醯胺(40 g, 125 mmol)、EtOH(800 mL)、6 M HCl(42 mL)及水(80 mL), 且在22°C下攪拌混合物直至觀察到完全溶解。以氫淨化反應混合物5 min同時歷經5 min將其加熱至30°C。向混合物中添加10重量% Pd/C(50%在水中, 4 g)。在加熱之同時, 在大氣壓下以氫淨化混合物5-10 min。在50°C下, 在低於5 psi(低於0.34個大氣壓)之氫流下攪拌混合物5 h, 使得反應物轉化率大於99%(根據HPLC分析)。將溶液冷卻至30°C且經由矽藻土過濾以得到標題化合物之粗鹽酸鹽的溶液, 根據HPLC方法2內:外比為約93:7, 內 $R_t=10.97$, 外 $R_t=12.67$ 。(m/z): $[M+H]^+$ $C_{14}H_{18}N_2O$ 之計算值, 231.15; 實驗值231.2。

藉由在30°C下在EtOH(約80 mL)中共沸蒸餾而自粗產物

中移除水以得到漿料，將該漿料加熱至 60°C 直至完全溶解。將溶液冷卻至 35°C 且添加產物之晶種 (0.05 g)。(根據製備 2 中所述之方法製備晶種。)在 22°C 下攪拌所得漿料 30 min，緩慢添加 MTBE (120 mL)，且將漿料在 22°C 下攪拌 4 h 且接著在 0°C 下攪拌 1 h。將所得固體過濾，以冷 EtOH 洗滌且在高真空下乾燥以得到呈白色粉末狀之標題化合物的鹽酸鹽 (24.5 g) (75% 產率，根據 HPLC 方法 3 純度大於 98.5%，小於 0.4% 外異構體，內 $R_t=8.67$ ，外 $R_t=9.43$)。

(m/z): $[M+H]^+$ $C_{14}H_{18}N_2O$ 之計算值，231.15；實驗值 231.2。¹H NMR (d_6 -DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 9.13 (s, br, 1H), 9.03 (s, br, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.73 (d, $J=7.6$, 1H), 7.58 (d, $J=7.6$, 1H), 7.40 (t, $J=7.6$, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.17-3.23 (m, 1H), 2.39-2.46 (m, 2H), 2.19-2.24 (m, 2H), 1.86-1.89 (m, 2H), 1.59-1.63 (m, 2H)。

實例 1A：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺結晶硫酸鹽之合成

a. N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苜酯之製備

向 100 mL 燒瓶中添加 N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苜酯亞硫酸氫鹽加合物 (3.94 g, 1 mmol) 及 MeTHF (35 mL)，接著添加水 (25 mL)。在室溫下攪拌所得漿料 5 分鐘且添加 1 M NaOH (8 mL)。在室溫下攪拌反應混合物 45 min。分離各層且將有機層之體積縮減至約 8 mL 以得到粗標題中間物。

b. 2-[3-內-(3-胺甲醯基苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]-乙基}環己基甲基-胺基甲酸苄酯之製備

向先前步驟之產物中添加 DMF (15 mL) 接著添加 3-內-(8-氮雜雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺鹽酸鹽 (2.67 g, 1 mmol) 且接著添加 DMF (10 mL)。將混合物在室溫下攪拌 30 min, 冷卻至 10°C 且接著添加三乙醯氧基硼氫化鈉 (4.25 g, 2 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌 90 分鐘且接著冷卻至 10°C。添加乙酸異丙酯 (100 mL), 接著添加 1 M NaOH (50 mL)。攪拌混合物 15 min, 且分離各相。以於水中之鹽水 (1:1, 2 × 50 mL) 洗滌有機層, 且將有機層之體積縮減至約 10 mL 以得到粗標題中間物。

c. 3-內-{8-[2-(環己基甲胺基)乙基]-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基}苄醯胺之製備

向先前步驟之產物中添加 EtOH (30 mL) 及濃 HCl (1.5 mL)。以氮淨化溶液, 添加 10% 鈀/碳 (470 mg) 且以氮淨化混合物 5 分鐘且接著在 30 psi 下氫化隔夜。以氮淨化 2 min 之後, 經由矽藻土過濾溶液且移除溶劑至約 10 mL。添加乙酸異丙酯 (40 mL) 及 1 M NaOH (20 mL)。分離各層且以鹽水 (20 mL) 洗滌有機層, 分離各相且移除有機溶劑至 5-10 mL。添加乙酸異丙酯 (20 mL) 且將體積縮減至約 8 mL, 向其中添加乙酸異丙酯 (20 mL)。在室溫下攪拌所得漿料 2 h。藉由過濾來分離產物, 以乙酸異丙酯 (10 mL) 洗滌反應燒瓶及濾餅以產生呈奶白色固體狀之標題中間物 (2.4 g, 98% 純度)。

d. 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺硫酸鹽(水合形式)之製備

向 500 mL 燒瓶中添加 3-內-{8-[2-(環己基胺基)乙基]-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基}苜醯胺 (31 g, 83.9 mmol) 及 DMF (150 mL)。攪拌混合物 10 分鐘且接著添加六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基參(吡咯啉基)-磷 (56.8 g, 109 mmol) 及 (4S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊環-4-甲酸鋰 (15.6 g, 92.3 mmol)，且在室溫下攪拌混合物 2 h。添加乙酸乙酯 (600 mL) 及 0.5 M NaOH (300 mL) 且分離各相。有機層含有未經分離之粗 (S)-2,2-二甲基-[1,3]二氧戊環-4-甲酸 {2-[3-(3-胺甲醯基-苄基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]乙基}環己基甲基-醯胺 (約 84 mmol)。

以於水中之鹽水 (1:1, 2 × 300 mL) 洗滌有機層且分離各相。向有機層中添加 2 M H₂SO₄ (42 mL) 且將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。添加乙腈 (300 mL) 且攪拌所得漿料 2 h。藉由過濾來分離產物，將濾餅以乙腈 (200 mL) 洗滌，在空氣中乾燥 2 h 且接著在真空下在室溫下乾燥 20 h 以得到呈白色粉末狀之標題化合物 (40 g, 根據 HPLC 純度為 97%)。

e. 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺結晶硫酸鹽之合成

向 100 mL 燒瓶中添加 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺硫酸鹽水合形式 (2 g) 及 MeOH (40 mL)。將所得漿料在

氮下加熱至65°C歷時20 min，使其完全溶解。在攪拌下將溶液冷卻至室溫。在輕微減壓下移除約20 mL溶劑且將所得漿料在室溫下攪拌隔夜。藉由過濾來分離產物，且以乙腈(2 × 5 mL)洗滌燒瓶及濾餅。將濾餅在空氣中乾燥2 h且接著在真空下在室溫下乾燥隔夜以得到呈白色粉末狀之標題化合物(1.71 g，根據HPLC純度大於99%，約85%產率)。

根據上文程序製備之試樣係由¹H NMR(400 MHz，DMSO *d*₆)表徵：δ (ppm) 9.08 & 8.94 (兩組 brs, 1H), 7.99-8.04 (m, 2H), 7.74-7.76 (m, 1H), 7.68-7.70 (m, 1H), 7.41-7.45 (m, 2H), 4.81, 5.00及5.30 (三組 brs, 2H), 4.34 (變形 m, 1H), 4.00及4.05 (變形 m, 2H), 3.01-3.25及3.47-3.55及3.75-3.82 (三組 m, 10H), 2.50-2.55 (m, 2H), 1.99 (變形 m, 2H), 1.56-1.70(m, 8H), 1.15-1.19 (m, 3H), 0.89-0.99 (m, 2H)。

實例1B：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺結晶硫酸鹽之合成

a. 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽之製備

將3-內-{8-[2-(環己基甲胺基)乙基]-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基}苄醯胺(100 g，270.6 mmol)與DMF(480 mL)之混合物攪拌10分鐘且接著冷卻至0°C。在0°C下整份添加六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基參(吡咯啶基)鎂(183 g，352 mmol)及(4S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊環-4-甲酸鋰(49.3 g，324

mmol)。在室溫下攪拌反應混合物 6 h。添加乙酸異丙酯 (2.0 L) 及 1 M NaOH (1.0 L)，攪拌反應混合物 15 min 且分離各相。以於水中之鹽水 (1:1, 2 × 1.0 L) 洗滌有機層且分離各相。將有機層縮減至四分之一體積 (約 500 mL)，添加乙腈 (500 mL) 且攪拌反應混合物直至均質以得到中間物 (S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊環-4-甲酸 2-[3-內-(3-胺甲醯基-苯基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]-乙基-環己基甲基醯胺於乙酸異丙酯及乙腈中之溶液。

使上文中間物 (3.03 g, 6.09 mmol) 於乙酸異丙酯/乙腈 (22.5 mL) 中之溶液的等分試樣與 2.0 M 硫酸水溶液 (3.68 mL) 組合且保持在 25°C 歷時 20 h，且接著在攪拌下保持在 10°C 歷時 5 h。過濾反應溶液，且以乙腈 (25 mL) 洗滌濾餅且將其乾燥以產生呈白色固體狀、主要呈結晶水合物形式之標題化合物的中間級硫酸鹽 (2.91 g，根據 HPLC 純度為 99.4%)。

b. 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)-胺基]-乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺結晶硫酸鹽之合成

在攪拌下歷經 45 min 將如在先前步驟中製備之 3-內-(8-2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)-胺基]-乙基-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)-苄醯胺中間級硫酸鹽 (154.0 g, 277.1 mmol) 與甲醇/10% 水 (616 mL) 之混合物加熱至 65°C。將反應混合物冷卻至 55°C，添加標題產物之晶種 (120 mg)，在 55°C 下攪拌反應混合物 1 h，且以 10°C/h 之速率將溫度降至 20°C 且接著保持 8 h。將反應混合物冷卻至 5°C，保持 30

min，且過濾。以甲醇(2 × 25 mL)洗滌濾餅且在高真空下乾燥隔夜以產生標題化合物(126.3 g，99.9%純度)。

實例 2：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺硫酸鹽(水合形式)之再結晶

將化合物 1 硫酸鹽(水合形式)(920 mg)懸浮於乙腈(5 mL)中且加熱至 65°C。接著逐滴添加水(2.4 mL)直至達成完全溶解。歷經 20 min 將所得溶液冷卻至環境溫度。在約 35°C 觀察到晶核生成。藉由真空過濾分離固體，將其以乙腈(5 mL)洗滌且乾燥以得到標題化合物。

實例 3：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺硫酸鹽之結晶

將化合物 1 硫酸鹽(水合形式)(50 mg)分散於水(10%)與甲醇(90%)之溶劑混合物(0.83 mL)中且在攪拌下加熱至 60°C。歷經 2 h 使所得溶液冷卻至環境溫度。藉由真空過濾分離所得固體以得到標題化合物(8 mg)。

實例 4：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺硫酸鹽之結晶

將化合物 1 硫酸鹽(水合形式)(42 mg)分散於水(25%)與甲醇(75%)之溶劑混合物(0.42 mL)中且在攪拌下加熱至 60°C。使所得溶液冷卻至環境溫度。藉由旋轉蒸發將體積縮減 50%且將溶液保持在環境溫度下隔夜。藉由真空過濾分離所得固體以得到標題化合物(8 mg)。

實例 5：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)

胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽之結晶

將化合物 1 (11 mg) 溶解於甲苯 (22%) 與乙腈 (78%) 之溶劑混合物 (0.2 mL) 中。添加乙腈 (0.15 mL)，接著添加在乙腈中之 0.04 M 硫酸 (0.59 mL)。添加酸後即形成固體沈澱物。將反應混合物保持在環境溫度歷時 12 h。藉由過濾分離所得固體以得到標題化合物。

實例 6：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽之結晶

將化合物 1 (38 mg) 溶解於二氯甲烷 (0.5 mL) 中。向溶液中添加在乙腈中之 0.04 M 硫酸 (1.91 mL)。添加酸後即形成固體沈澱物。將反應混合物保持在環境溫度歷時 12 h。藉由過濾分離所得固體以得到標題化合物。

實例 7：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽之結晶

將化合物 1 (22 mg) 溶解於甲苯 (23%) 與乙腈 (77%) 之溶劑混合物 (0.41 mL) 中。向溶液中添加在乙腈中之 0.04 M 硫酸 (1.20 mL)。添加酸後即形成固體沈澱物。添加水 (0.16 mL) 至反應混合物中以溶解沈澱物。2 h 之後觀察到晶核生成。藉由真空過濾分離所得固體以得到標題化合物。

實例 8：3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺硫酸鹽(水合形式)之結晶

將結晶化合物 1 硫酸鹽 (7.1 g) 溶解於水 (42 mL) 與乙腈 (25 mL) 之溶劑混合物中。將溶液凍乾以產生非晶硫酸鹽。將

非晶鹽 (6.6 g) 分散於乙腈 (75%) 與水 (25%) 之溶劑混合物 (34.6 mL) 中，且在攪拌下加熱至 65°C 歷時 10 min 且使其在攪拌下冷卻，直至達到環境溫度。12 h 之後，藉由真空過濾分離所得固體以得到標題化合物 (5.4 g)。

實例 9-17：本發明之鹽形式的特性

藉由 x 射線粉末繞射 (XRPD)、差示掃描熱量測定 (DSC)、熱解重量分析 (TGA)、紅外光譜法 (IR) 及離子層析來分析如實例 1A 中製備之 3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺(化合物 1)之結晶硫酸鹽的試樣及如實例 2 中製備之化合物 1 硫酸鹽之結晶水合物的試樣。

實例 10：X 射線粉末繞射

以 Rigaku 繞射計使用 Cu K α (30.0 kV, 15.0 mA) 輻射獲得圖 1 及圖 4 之 X 射線粉末繞射圖。使用以 3°/分鐘，0.03° 步長，在 2° 至 40° 之範圍內之連續掃描模式運作之測角器來進行分析。在石英樣品固持器上將試樣製備為薄層粉末物質。以矽標準物校正儀器。

實例 11：熱分析

使用 TA 儀器型號 Q-100 模組進行差示掃描熱量測定 (DSC)。使用 Q Series™ 軟體之 TA Instruments Thermal Advantage 收集及分析資料。將約 1-10 mg 之試樣精確稱量至有蓋鋁盤中。使用 10°C/min 之線性加熱勻變，自 5°C 至 (通常) 265°C 評估試樣。在使用期間用乾氮淨化 DSC 單元。

圖 2 及圖 5 中分別展示化合物 1 之結晶硫酸鹽試樣及化合物 1

之硫酸鹽之結晶水合物試樣的代表性DSC圖形。

使用TA儀器型號Q-500模組進行熱解重量分析(TGA)。使用Q Series™軟體之TA Instruments Thermal Advantage收集及分析資料。將重約1-5 mg之試樣置於鉑托架上之鋁盤中，且以10°C/min之線性加熱速率自環境溫度至300°C掃描。在使用期間以氮淨化天平及爐腔。圖2及圖5中亦分別展示化合物1之結晶硫酸鹽試樣及化合物1之硫酸鹽之結晶水合物試樣的代表性TGA圖形。

實例12：動態吸濕評估

在25°C下使用VTI大氣微量天平SGA-100系統(VTI Corp., Hialeah, FL 33016)來進行動態吸濕(DMS)評估。使用約5-10 mg之試樣尺寸，且在分析起始時將濕度設為環境值。典型DMS分析由三個掃描組成：以5% RH/步之掃描速率，環境濕度至2%相對濕度(RH)、2% RH至90% RH、90% RH至5% RH。每兩分鐘量測質量且當試樣質量5個連續點穩定在0.02%內時將RH換為下一值($\pm 5\%$ RH)。圖3及圖6中分別展示化合物1之結晶硫酸鹽試樣及化合物1之硫酸鹽之結晶水合物試樣的代表性DMS圖形。

實例13：紅外分析

使用配備有漫反射紅外傅裏葉變換光譜(diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy, DRIFTS)模組之Avatar 360 FT-IR光譜儀在4000 cm^{-1} 至400 cm^{-1} 之頻率範圍內測定紅外(IR)吸收光譜。本發明之結晶硫酸鹽試樣之代表性IR吸收光譜在以下各處具有顯著吸收

帶：430±1、590±1、639±1、705±1、867±1、1036±1、1053±1、1105±1、1171±1、1231±1、1277±1、1375±1、1391±1、1452±1、1476±1、1553±1、1596±1、1639±1、1664±1、2852±1、2907±1、2928±1、2967±1、3168±1及3357±1 cm⁻¹。

實例 14：X射線繞射晶體結構分析

將具有 0.43 × 0.05 × 0.031 mm 尺寸之化合物 1 硫酸鹽塊狀晶體安裝於玻璃纖維上。使用由 SMART 5.630 版軟體 (Bruker, 2003) 控制之具有 13.5 cm 視窗直徑之 Bruker SMART 6K CCD x 射線區域偵測器，使用 Cu K α 輻射來獲得 X 射線繞射晶體結構資料。試樣至偵測器之距離為 5.039 cm。在 -153±1°C 之溫度下收集資料且使用 SHELXS 6.14 版 (Bruker, 2003) 軟體加以分析。導出以下晶格參數：單位晶胞為斜方晶，尺寸為 a=6.8239 Å, b=16.2275 Å, c=24.2021 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ；晶胞體積 (V) 為 2680.0 Å³；計算密度為 1.38 g/cm³；空間群為 P2₁2₁2₁(#19)。藉由目測判斷根據 Mercury 1.4 軟體自導出原子位置預測之粉末 x 射線繞射峰與圖 1 之實驗結果極為一致。

實例 15：固態穩定性評估

在 20°C 及 60% 相對濕度 (RH) 下及在 40°C 及 75% RH 下，將本發明之硫酸鹽試樣儲存於多個開口玻璃小瓶中。以特定時間間隔，移除代表性小瓶之內容物且藉由 DSC、TGA、PXRD 進行分析且藉由 HPLC 進行化學純度分析。儲存 4 週之後，在任一條件下儲存之試樣的 DSC 或 TGA 熱分析圖中

以及XRPD圖中均不存在可偵測變化。根據HPLC，儲存試樣之化學純度在99.7%不變。

實例16：平衡離子含量之測定

藉由硫酸根離子層析法，使用配備有陰離子自我再生抑制器、電導率偵測器、IonPac AS11-HC分析陰離子交換管柱及IonPac AG11-HC保護管柱之Dionex ICS-2000離子層析系統來分析本發明之硫酸鹽試樣。試樣之硫酸根含量測定為17.1%，其與每莫耳母化合物一莫耳當量硫酸根離子之17.6%的理論硫酸根含量相當。

實例17：水合物之水含量之測定

藉由對初始重量損失期間所蒸發之物質進行TGA偶合IR分析來分析本發明之水合物試樣。TGA圖形展示在100°C以下重量損失為3.2%，其可與化合物1硫酸鹽之單水合物的3.1%理論重量損失相當。所蒸發物質之IR光譜係與水之參考IR光譜一致。

檢定1：對人類 μ 、人類 δ 及豚鼠 κ 類鴉片受體之放射性配位子結合檢定

a. 膜製備

使穩定轉染有人類 μ 類鴉片或豚鼠 κ 受體cDNA之CHO-K1(中國倉鼠卵巢)細胞於培養基中於5% CO₂、加濕恆溫箱中37°C下生長，該培養基由補充有10% FBS、100單位/毫升青黴素(penicillin)100 μ g/mL鏈黴素(streptomycin)及800 μ g/mL遺傳黴素(Geneticin)之Ham's-F12培養基組成。

在膜放射性配位子結合檢定中，使用 [³H]-二丙諾啡([³H]-

Diprenorphine)(比活性約 50-55 Ci/mmol)來測定受體表現量(B_{max} 分別為約 2.0及約 0.414 pmol/mg蛋白質)。

使細胞生長至 80%-95%融合(小於 25 繼代培養代)。對於細胞株繼代而言，將細胞單層在室溫下培育 5 分鐘且藉由在補充有 5 mM EDTA 之 10 mL PBS 中機械攪動來收集。再懸浮之後，將細胞轉移至 40 mL 新鮮生長培養基中且在 1000 rpm 下離心 5 分鐘且以適當分流比(split ratio)將其再懸浮於新鮮生長培養基中。

對於膜製備而言，藉由以於 PBS 中之 5 mM EDTA 溫和機械攪動接著離心(2500 g 歷時 5 分鐘)來收集細胞。將離心塊再懸浮於 pH 7.4 之檢定緩衝液(50 mM 4-(2-羥乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸 *N*-(2-羥乙基)哌嗪-*N'*-(2-乙烷磺酸)(HEPES))中，且在冰上以 polytron 破碎器均質化。將所得勻漿離心(1200 g 歷時 5 分鐘)，棄去離心塊且將上清液離心(40,000 g 歷時 20 分鐘)。藉由再懸浮於檢定緩衝液中將離心塊洗滌一次，接著再離心(40,000 g 歷時 20 分鐘)。將最終離心塊再懸浮於檢定緩衝液(等效 1 T-225 燒瓶/1 mL 檢定緩衝液)中。使用 Bio-Rad Bradford 蛋白質檢定套組來測定蛋白質濃度且將膜以冷凍等分試樣形式在 -80°C 下儲存，直至需要為止。

自 Perkin Elmer 購得人類 δ 類鴉片受體(hDOP)膜。所報導之藉由在 [^3H]-納曲啉(Natrindole)放射性配位子結合檢定中之飽和分析測定之此等膜的 K_d 及 B_{max} 分別為 0.14 nM($pK_d = 9.85$)及 2.2 pmol/mg 蛋白質。使用 Bio-Rad Bradford 蛋白

質檢定套組來測定蛋白質濃度。將膜以冷凍等分試樣形式在 -80°C 儲存，直至需要為止。

b. 放射性配位子結合檢定

在Axygen 1.1 mL深度孔之96孔聚丙烯檢定板中，在200 μL 之總檢定體積中進行放射性配位子結合檢定，該總檢定體積含有在補充有0.025%牛血清白蛋白(BSA)之檢定緩衝液中適當量之膜蛋白(對於 μ 、 δ 及 κ 分別為約3、約2及約20 μg)。使用在0.001 nM-5 nM範圍內之8-12個不同濃度之 $[^3\text{H}]$ -二丙諾啡進行用於測定放射性配位子之 K_d 值的飽和結合研究。用對於 μ 、 δ 及 κ 分別為0.5 nM、1.2 nM及0.7 nM之 $[^3\text{H}]$ -二丙諾啡及在10 pM-100 μM 範圍內之11個濃度之化合物進行用於測定化合物之 pK_i 值的置換檢定。

藉由用GraphPad Prism套裝軟體(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)，使用單位點競爭之3參數模型進行非線性回歸分析來分析結合資料。如在10 μM 納洛酮(naloxone)存在下測定，將曲線最小值確定為非特異性結合之值。使用程-普方程式(Cheng-Prusoff equation) ($K_i = \text{IC}_{50} / (1 + ([L] / K_d))$)，其中 $[L] = [^3\text{H}]$ -二丙諾啡之濃度，在Prism中自最佳擬合 IC_{50} 值及放射性配位子之 K_d 值計算測試化合物之 K_i 值。將結果表示為 K_i 值之負的以十底數之對數， pK_i 。

在此等檢定中具有較高 pK_i 值之測試化合物對 μ 、 δ 或 κ 類鴉片受體具有較高之結合親和力。化合物1之硫酸鹽顯示對人類 μ 類鴉片受體9.9的 pK_i 值。

檢定 2：由表現人類 μ 類鴉片受體之 CHO-K1 細胞製備之膜中促效劑介導之 μ 類鴉片受體的活化

在此檢定中，藉由量測在由表現人類 μ 類鴉片受體之 CHO-K1 細胞製備的膜中受體活化之後所存在的結合 GTP-Eu 之量來測定測試化合物之效能及固有活性值。

a. μ 類鴉片受體膜製備：

人類 μ 類鴉片受體 (hMOP) 膜係如上所述來製備或自 Perkin Elmer 購得。所報導之藉由在 [3 H]-二丙諾啡放射性配位子結合檢定中之飽和分析測定的所購膜之 pK_d 及 B_{max} 分別為 10.06 及 2.4 pmol/mg 蛋白質。使用 Bio-Rad Bradford 蛋白質檢定套組測定蛋白質濃度。將膜以冷凍等分試樣形式在 -80°C 下儲存，直至需要為止。將凍乾 GTP-Eu 及 GDP 於再蒸餾水中分別稀釋至 10 μM 及 2 mM，接著混合且於室溫下置放 30 分鐘，隨後將其轉移至個別等分試樣中以在 -20°C 下儲存。

b. 人類 μ GTP-Eu 核苷酸交換檢定

使用 AcroWell 96 孔濾板中之 DELPHIA GTP 結合套組 (Perkin/Elmer) 根據製造商說明書來進行 GTP-Eu 核苷酸交換檢定。如上所述來製備膜，且在開始檢定之前，將等分試樣於檢定緩衝液中 (50 mM HEPES, pH 7.4 在 25°C 下) 稀釋至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度，接著使用 Polytron 均質機均質化 10 秒鐘。得到呈於 DMSO 中之 10 mM 儲備溶液形式之測試化合物，將其於含有 0.1% BSA 之檢定緩衝液中稀釋至 400 μM ，且接著製成連續 (1:5) 稀釋物以產生在 40 pM 至 80 μM

範圍內之十個濃度之化合物，分別將GDP及GTP-Eu於檢定緩衝液中稀釋至4 μM 及40 nM。在含有稀釋於10 mM MgCl_2 、50 mM NaCl及0.0125% BSA(最終檢定濃度)中之5 μg 膜蛋白、在10 pM-20 μM 範圍內之測試化合物、1 μM GDP及10 nM GTP-Eu之100 μL 總體積中進行檢定。在每個板上包括DAMGO(Tyr-D-Ala-Gly-(甲基)Phe-Gly-ol)濃度-反應曲線(在12.8 pM-1 μM 範圍內)。

在檢定之前，在添加25 μL 檢定緩衝液、25 μL 測試化合物及25 μL GDP及GTP-Eu之後，立即製備檢定板。藉由添加25 μL 膜蛋白啟始檢定且使其培育30分鐘。接著將檢定板以連接至調節至10-12吋Hg之室內真空之Waters真空歧管過濾且以室溫GTP洗滌溶液(2 \times 300 mL)洗滌。吸乾板之底部以移除過量液體。接著立即讀取板以藉由量測在Packard Fusion Plate Reader Vehicle上之時間分辨螢光(TRF)來測定結合GTP-Eu之量：DMSO不超過1%最終檢定濃度。

結合GTP-Eu之量與 μ 類鴉片受體由測試化合物之活化程度成比例。表示為百分比之固有活性(IA)係按所觀察之由測試化合物活化之結合GTP-Eu的量與所觀察之由DAMGO活化之量(其假定為完全促效劑(IA=100))的比率來測定。在此檢定中，化合物1之硫酸鹽顯示-5之固有活性。由此，已展示本發明之硫酸鹽為拮抗劑。

檢定3：活體內功效之大鼠模型

在此檢定中，在胃腸通過(gastrointestinal transit)模型

(其評估周邊活性)中評估測試化合物之功效。此研究係由 Theravance, Inc. 之實驗動物管理及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准且符合由國家科學院 (National Academy of Sciences) 公布之實驗動物管理及使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (©1996)。

a. 大鼠胃排空檢定

在大鼠胃排空檢定中評估測試化合物以測定其逆轉洛哌丁胺 (loperamide) 誘導之延遲胃排空之能力。使大鼠禁食隔夜，隨後藉由靜脈內、皮下、肌肉內或經口投藥途徑以在 0.001 毫克/公斤至約 30 毫克/公斤 (mg/kg) 範圍內之劑量投與測試化合物或媒劑。投與測試化合物之後皮下投與 1 mg/kg 劑量之洛哌丁胺或媒劑。投與洛哌丁胺或媒劑五分鐘後，經口管飼投與無營養、不可吸收之炭粗粉且允許動物自由獲取水歷時實驗之六十分鐘持續時間。接著經由二氧化碳窒息對動物施以安樂死，接著進行開胸術且謹慎地切除胃。將胃在下食道括約肌及幽門括約肌處結紮以防止在組織移除期間之額外排空。接著在移除結紮之後測定胃重量。

b. 資料分析及結果

使用 GraphPad Prism 套裝軟體 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 來分析資料。藉由使用 S 形劑量反應 (可變斜率) 模型之非線性回歸分析來構建百分比逆轉曲線且計算最佳擬合 ID_{50} 值。將曲線最小值及最大值分別確定為洛

哌丁胺對照值(指示0%逆轉)及媒劑對照物(指示100%逆轉)。將結果表示為ID₅₀，即50%逆轉洛哌丁胺效應之所需劑量，毫克/公斤。經口投與之化合物1的硫酸鹽在胃排空模型中顯示0.26 mg/kg之ID₅₀值。

儘管本發明已參考其特定實施例加以描述，但熟習此項技術者應瞭解，在不脫離本發明之真正精神及範疇的情況下可作出各種改變且可替代等效物。此外，可作出許多修改以使特定情況、材料、物質組合、方法、方法步驟或步驟適用於本發明之目標、精神及範疇。所有此等修改意欲在本文隨附申請專利範圍之範疇內。此外，上文引用之所有公開案、專利及專利文件均以全文引用之方式併入本文中，其引用程度就如同以引用之方式個別地併入一般。

【圖式簡單說明】

圖1展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的結晶硫酸鹽之x射線粉末繞射(XRPD)圖。

圖2展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的結晶硫酸鹽之差示掃描熱量測定(DSC)圖形(右側垂直軸)及熱解重量分析(TGA)圖形(左側垂直軸)。

圖3展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的結晶硫酸鹽之動態吸濕(DMS)圖形。

圖4展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥

基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的硫酸鹽之結晶水合物的x射線粉末繞射(XRPD)圖。

圖5展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的硫酸鹽之結晶水合物的差示掃描熱量測定(DSC)圖形(右側垂直軸)及熱解重量分析(TGA)圖形(左側垂直軸)。

圖6展示本發明之3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺的硫酸鹽之結晶水合物的動態吸濕(DMS)圖形。

102年3月21日修(更)正本

十、申請專利範圍：

1. 一種結晶鹽形式，其為3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苄醯胺或其溶劑合物之硫酸鹽。
2. 如請求項1之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式為結晶硫酸鹽。
3. 如請求項2之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰的x射線粉末繞射圖來表徵： 6.58 ± 0.20 、 7.52 ± 0.20 、 9.35 ± 0.20 、 14.69 ± 0.20 、 16.01 ± 0.20 、 17.45 ± 0.20 、 17.99 ± 0.20 、 18.62 ± 0.20 、 19.76 ± 0.20 、 21.11 ± 0.20 、 22.07 ± 0.20 、 23.18 ± 0.20 、 23.74 ± 0.20 、 24.56 ± 0.20 、 25.63 ± 0.20 、 26.45 ± 0.20 、 27.86 ± 0.20 、 28.31 ± 0.20 、 29.54 ± 0.20 、 30.59 ± 0.20 、 31.58 ± 0.20 、 33.89 ± 0.20 及 36.02 ± 0.20 。
4. 如請求項3之結晶鹽形式，其中該x射線粉末繞射圖包含兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處的繞射峰： 14.69 ± 0.20 、 16.01 ± 0.20 、 21.11 ± 0.20 、 22.07 ± 0.20 及 23.18 ± 0.20 。
5. 如請求項2之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由峰位置與圖1中所示之圖之峰位置一致的x射線粉末繞射圖來表徵。
6. 如請求項2之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由以 $10^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 之加熱速率記錄之差示掃描熱量測定圖形來表

- 徵，該圖形展示在190°C與205°C之間的溫度下吸熱熱流之最大值。
7. 如請求項2之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由與圖2中所示之圖形一致之差示掃描熱量測定圖形來表徵。
 8. 如請求項1之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式為硫酸鹽之水合物。
 9. 如請求項8之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由具有兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處之繞射峰的x射線粉末繞射圖來表徵： 9.41 ± 0.20 、 9.98 ± 0.20 、 15.17 ± 0.20 、 16.70 ± 0.20 、 18.59 ± 0.20 、 19.46 ± 0.20 、 19.91 ± 0.20 、 20.63 ± 0.20 、 21.35 ± 0.20 、 21.89 ± 0.20 、 23.00 ± 0.20 、 24.20 ± 0.20 、 25.40 ± 0.20 、 26.03 ± 0.20 、 27.44 ± 0.20 、 28.46 ± 0.20 、 29.45 ± 0.20 、 31.22 ± 0.20 、 31.82 ± 0.20 、 33.17 ± 0.20 、 33.56 ± 0.20 及 36.89 ± 0.20 。
 10. 如請求項9之結晶鹽形式，其中該x射線粉末繞射圖包含兩個或兩個以上在選自以下各值之 2θ 值處的繞射峰： 16.70 ± 0.20 、 18.59 ± 0.20 、 19.46 ± 0.20 、 19.91 ± 0.20 、 23.00 ± 0.20 及 24.20 ± 0.20 。
 11. 如請求項8之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由峰位置與圖4中所示之圖之峰位置一致的x射線粉末繞射圖來表徵。
 12. 如請求項8之結晶鹽形式，其中該結晶鹽形式係由與圖5中所示之圖形一致之差示掃描熱量測定圖形來表徵。
 13. 一種醫藥組合物，其包含醫藥學上可接受之載劑及如請

求項1至12中任一項之結晶鹽形式。

14. 一種製備3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含：

(a)使羥基經保護之經保護3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺前軀體與硫酸接觸以形成第一反應混合物；

(b)自該第一反應混合物分離3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺之中間物級固體硫酸鹽；

(c)將該中間物級固體硫酸鹽分散於包含甲醇之稀釋劑中以形成第二反應混合物；及

(d)自該第二反應混合物分離該結晶硫酸鹽。

15. 如請求項14之方法，其中該經保護之前軀體為(S)-2,2-二甲基-[1,3]二氧戊環-4-甲酸{2-[3-(3-胺甲醯基-苜基)-8-氮雜雙環[3.2.1]辛-8-基]乙基}環己基甲基-醯胺。

16. 如請求項15之方法，其中該包含甲醇之稀釋劑另外包含至多25%之水。

17. 如請求項15之方法，其中該包含甲醇之稀釋劑包含5%與15%之間的水。

18. 一種製備3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含：

(a)使3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺與硫酸接觸以形成反應混合物；及

(b)自該反應混合物分離該結晶硫酸鹽。

19. 一種製備3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺之結晶硫酸鹽的方法，該方法包含：

(a)將3-內-(8-{2-[環己基甲基-((S)-2,3-二羥基-丙醯基)胺基]乙基}-8-氮雜-雙環[3.2.1]辛-3-基)苜醯胺之硫酸鹽的結晶水合物分散於包含甲醇之稀釋劑中以形成反應混合物；及

(b)自該反應混合物分離該結晶硫酸鹽。

20. 如請求項19之方法，其中該包含甲醇之稀釋劑另外包含至多25%之水。

21. 一種N-環己基甲基-(2-側氧基乙基)-胺基甲酸苜酯之亞硫酸氫鹽加合物。

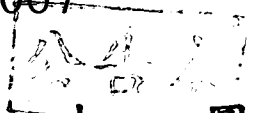
22. 如請求項1至12中任一項之結晶鹽形式，其係用於療法中。

23. 一種如請求項1至12中任一項之結晶鹽形式的用途，其係用於製造供治療哺乳動物與 μ 類鴉片受體活性相關之疾病或醫學病況的藥物。

24. 如請求項23之用途，其中該疾病或病況為類鴉片誘導之腸功能障礙或術後腸塞絞痛。

25. 一種如請求項1至12中任一項之結晶鹽形式的用途，其

係用於製造供治療哺乳動物胃腸道能動性減小病症之藥物。



十一圖式：

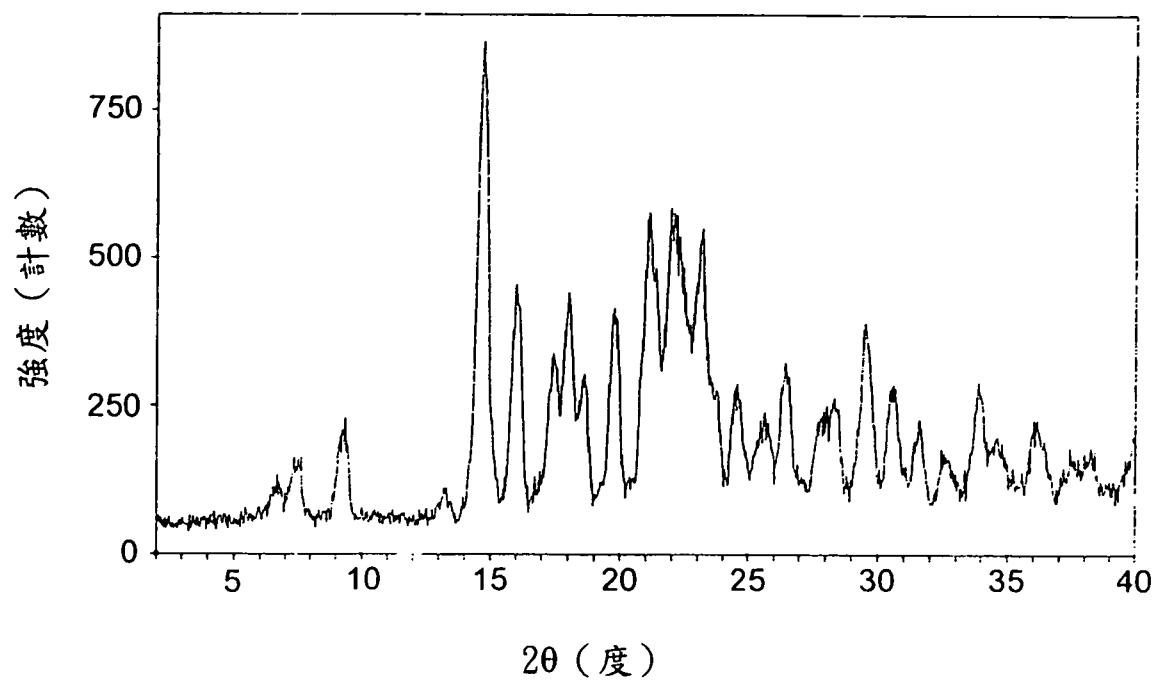


圖1

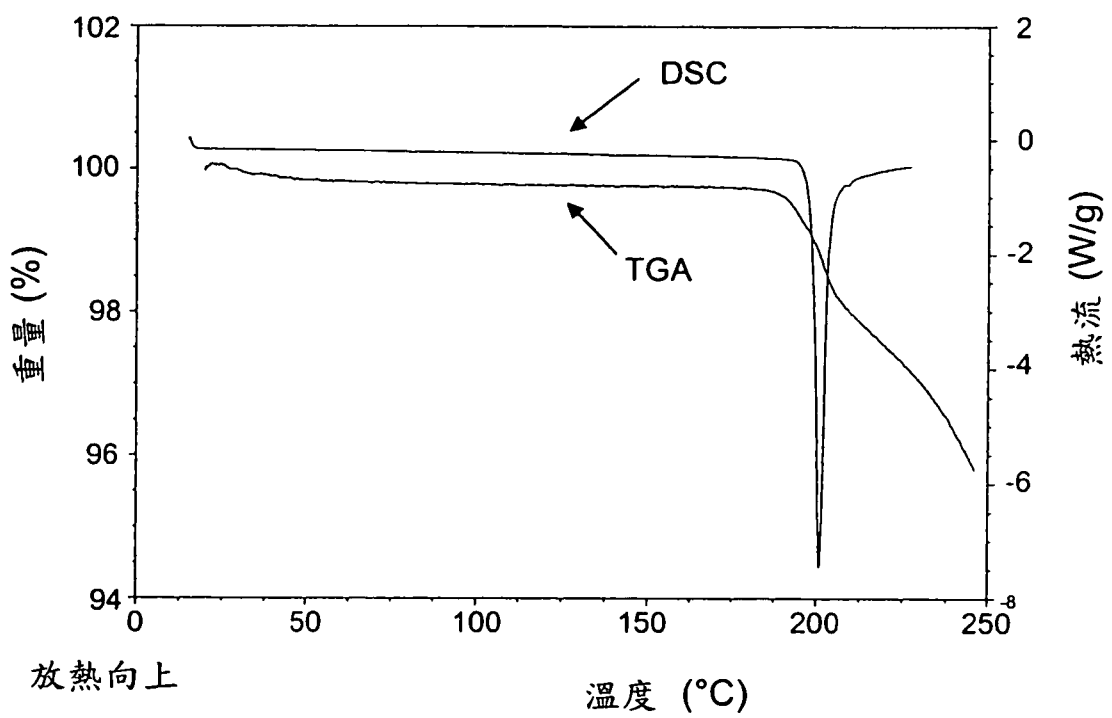


圖2

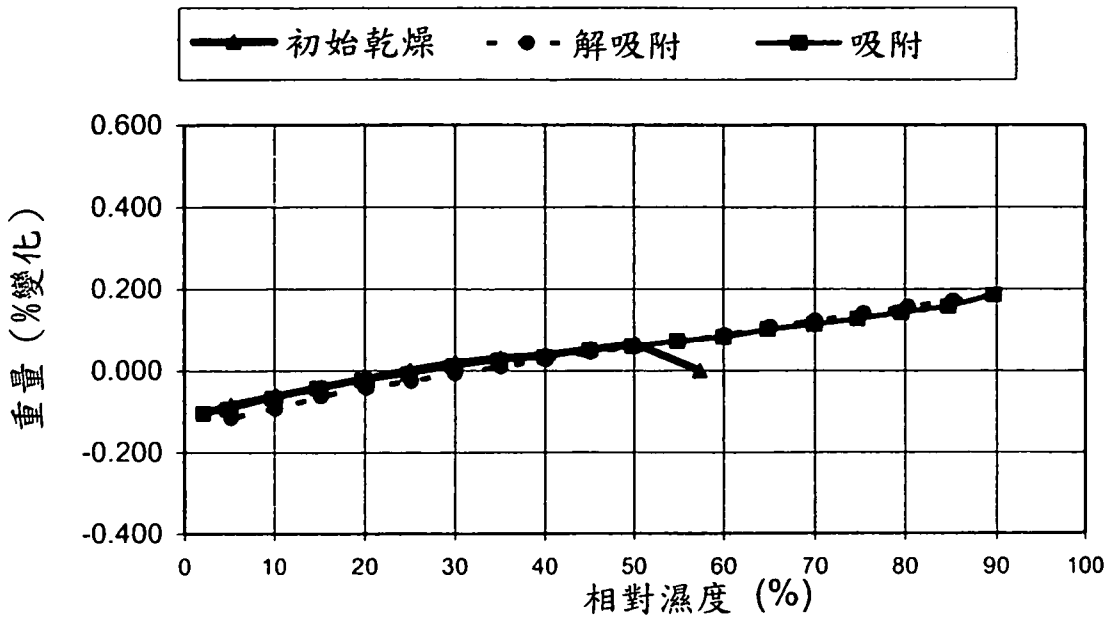


圖3

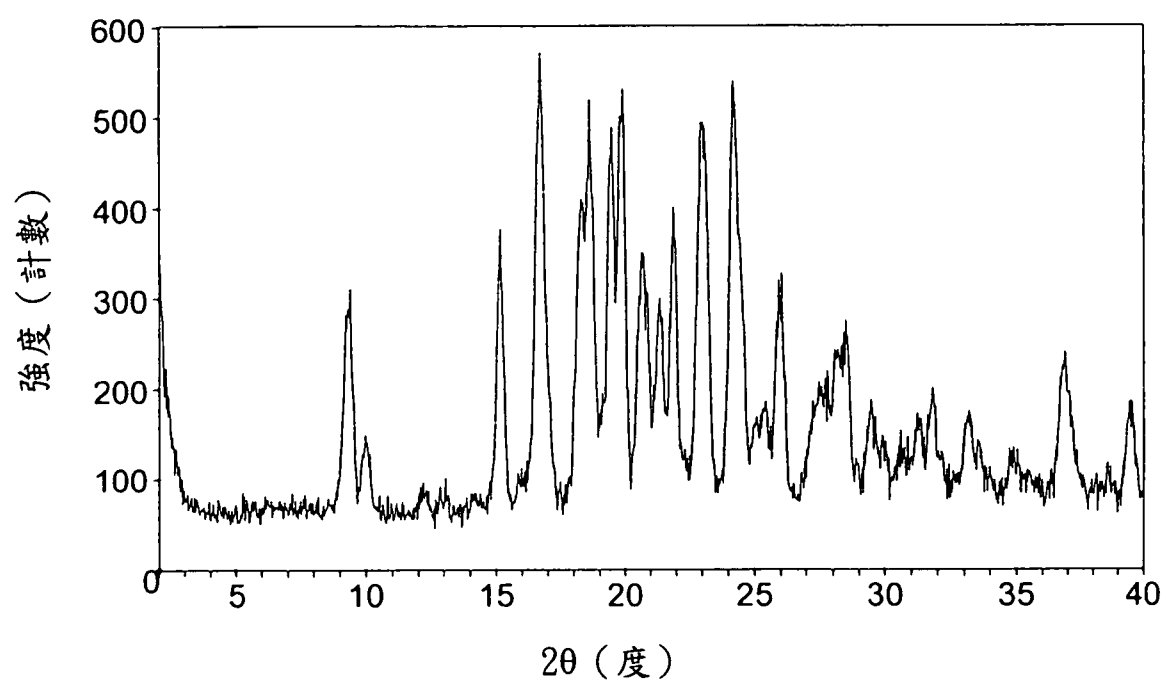


圖4

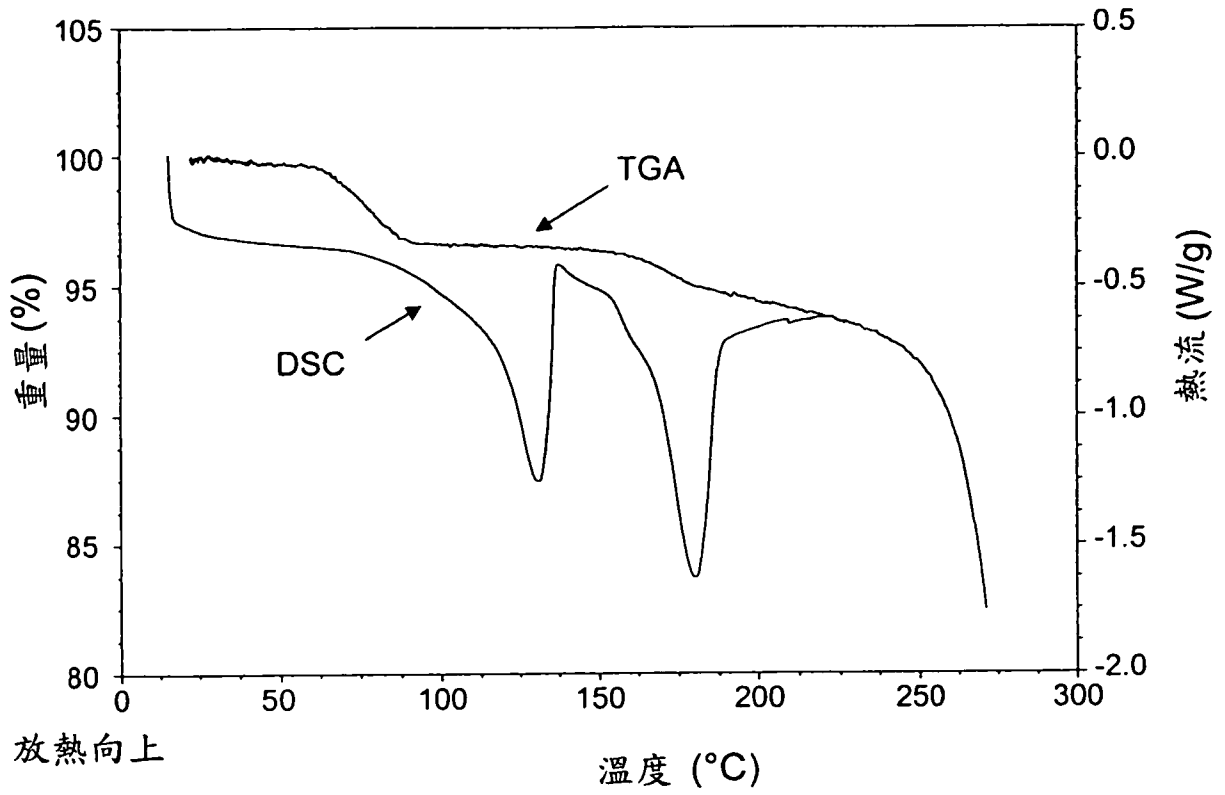


圖5

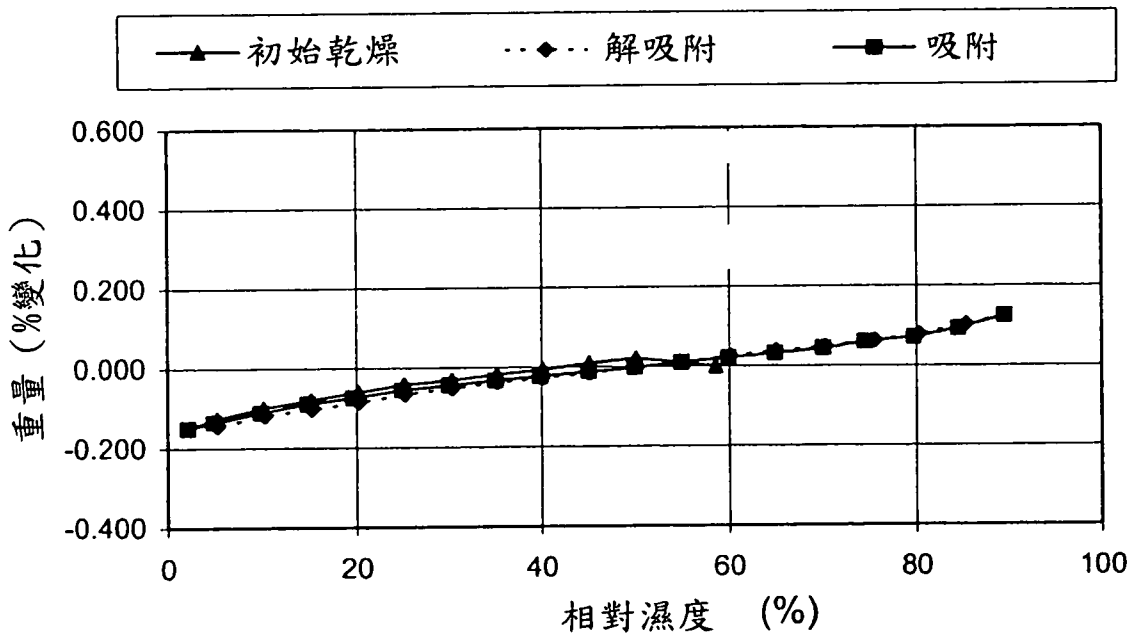


圖6