



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201307339 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100142135

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07D471/04 (2006.01)

G01N23/20 (2006.01)

A61K31/4745 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/17 法國

1059456

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：阿洛奇艾瑟密 娜塔莉 AROKIASSAMY, NATHALIE (FR)；比洛特 帕斯科 BILLOT, PASCAL (FR)；凱瑞 尚 克里斯多夫 CARRY, JEAN-CHRISTOPHE (FR)；克雷比瑞斯 派崔克 CLAVIERES, PATRICK (FR)；克勒克 法蘭寇斯 CLERC, FRANCOIS (FR)；克洛可 史多爾戈 維若妮卡 CROCQ-STUERGA, VERONIQUE (FR)；拉查德 希薇提 LACHAUD, SYLVETTE (FR)；連納德 菲利浦 LIENARD, PHILIPPE (FR)；曼諾格圖 傑洛米 MENEGOTTO, JEROME (FR)；斯區歐 勞倫特 SCHIO, LAURENT (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：4 共 60 頁

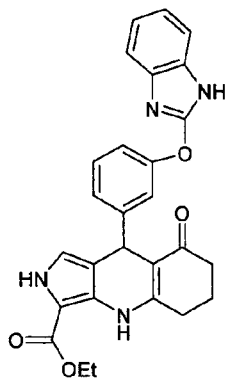
(54)名稱

化合物 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯，鹽，結晶型，共晶體，調配物，製備方法，作為藥物之應用，醫藥組合物及特別作為奧諾拉 (AURORA) 激酶抑制劑之新用途

COMPOUND ETHYL 8-OXO-9-[3-(1H-BENZIMIDAZOL-2-YLOXY)PHENYL]-4,5,6,7,8,9-HEXAHYDRO-2H-PYRROLO[3,4-B]QUINOLINE-3-CARBOXYLATE, SALT, CRYSTALLINE FORM, COCRYSTAL, FORMULATION, PROCESSES FOR PREPARATION, APPLICATION AS MEDICAMENTS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND NEW USE PARTICULARLY AS INHIBITOR OF AURORA KINASES

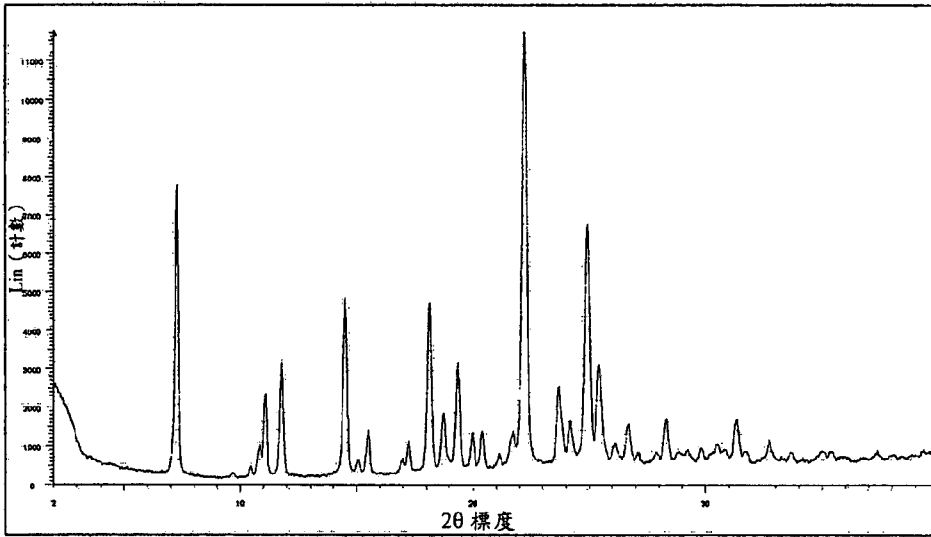
(57)摘要

更特定而言，本發明係關於式(F)之 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之新鹽、共晶體及調配物：



(F)

係關於其製備且係關於其在治療上特別作為奧諾拉(Aurora) A 及 B 激酶之選擇性抑制劑之用途，及其作為抗癌劑之用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201307339 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100142135

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07D471/04 (2006.01)

G01N23/20 (2006.01)

A61K31/4745 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/17 法國

1059456

(71)申請人：賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：阿洛奇艾瑟密 娜塔莉 AROKIASSAMY, NATHALIE (FR)；比洛特 帕斯科 BILLOT, PASCAL (FR)；凱瑞 尚 克里斯多夫 CARRY, JEAN-CHRISTOPHE (FR)；克雷比瑞斯 派崔克 CLAVIERES, PATRICK (FR)；克勒克 法蘭寇斯 CLERC, FRANCOIS (FR)；克洛可 史多爾戈 維若妮卡 CROCQ-STUERGA, VERONIQUE (FR)；拉查德 希薇提 LACHAUD, SYLVETTE (FR)；連納德 菲利浦 LIENARD, PHILIPPE (FR)；曼諾格圖 傑洛米 MENEGOTTO, JEROME (FR)；斯區歐 勞倫特 SCHIO, LAURENT (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：4 共 60 頁

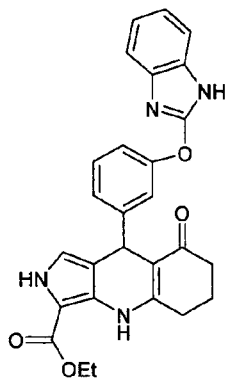
(54)名稱

化合物 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯，鹽，結晶型，共晶體，調配物，製備方法，作為藥物之應用，醫藥組合物及特別作為奧諾拉 (AURORA) 激酶抑制劑之新用途

COMPOUND ETHYL 8-OXO-9-[3-(1H-BENZIMIDAZOL-2-YLOXY)PHENYL]-4,5,6,7,8,9-HEXAHYDRO-2H-PYRROLO[3,4-B]QUINOLINE-3-CARBOXYLATE, SALT, CRYSTALLINE FORM, COCRYSTAL, FORMULATION, PROCESSES FOR PREPARATION, APPLICATION AS MEDICAMENTS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND NEW USE PARTICULARLY AS INHIBITOR OF AURORA KINASES

(57)摘要

更特定而言，本發明係關於式(F)之 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之新鹽、共晶體及調配物：



(F)

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： 160142135

※申請日： 160.11.19

※IPC 分類： C07D471/04 (2006.01)
G01N23/20 (2006.01)
A61K31/4745 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

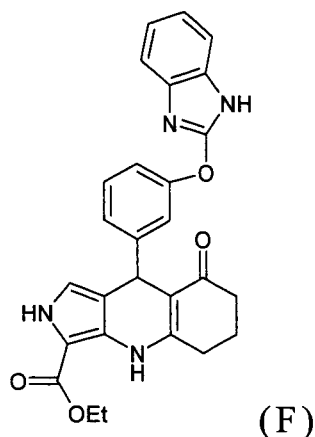
一、發明名稱：(中文/英文)

化合物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯，鹽，結晶型，共晶體，調配物，製備方法，作為藥物之應用，醫藥組合物及特別作為奧諾拉(AURORA)激酶抑制劑之新用途

COMPOUND ETHYL 8-OXO-9-[3-(1H-BENZIMIDAZOL-2-YLOXY)PHENYL]-4,5,6,7,8,9-HEXAHYDRO-2H-PYRROLO[3,4-b]QUINOLINE-3-CARBOXYLATE, SALT, CRYSTALLINE FORM, COCRYSTAL, FORMULATION, PROCESSES FOR PREPARATION, APPLICATION AS MEDICAMENTS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND NEW USE PARTICULARLY AS INHIBITOR OF AURORA KINASES

二、中文發明摘要：

更特定而言，本發明係關於式(F)之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之新鹽、共晶體及調配物：

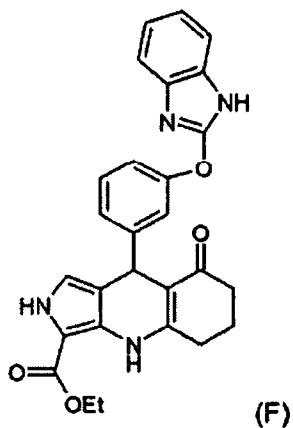


係關於其製備且係關於其在治療上特別作為奧諾拉(Aurora) A及B激酶之選擇性抑制劑之用途，及其作為抗癌

劑之用途。

三、英文發明摘要：

The invention relates more particularly to a new salt, cocrystal and formulations of ethyl 8-oxo-9-[3-(1H-benzimidazol-2-yloxy)phenyl]-4,5,6,7,8,9-hexahydro-2H-pyrrolo[3,4-b]quinoline-3-carboxylate of formula (F):



to preparations thereof and to the use thereof therapeutically, particularly as selective inhibitors of Aurora A and B kinases, and for their use as anti-cancer agents.

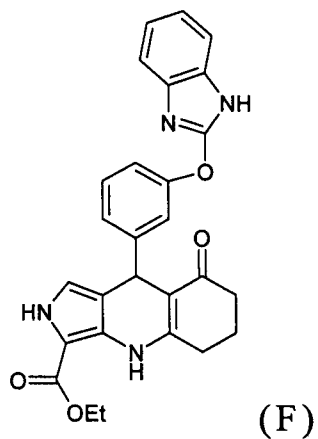
四、指定代表圖：

(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)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

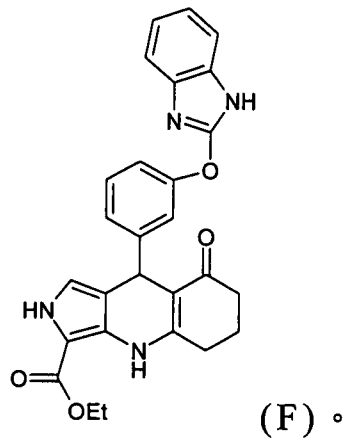


六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

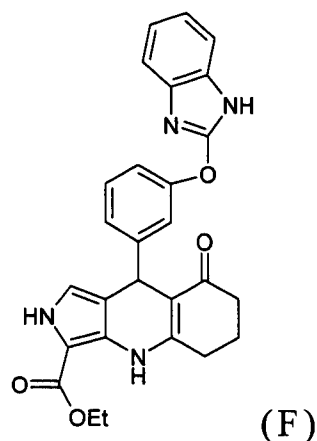
因此，本發明係關於化合物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯、其鹽、結晶型、共晶體、調配物、製備方法、其作為藥物之應用、醫藥組合物及其特別作為奧諾拉激酶抑制劑之新用途。

呈游離鹼形式之化合物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯(在下文中稱為化合物F)符合下式(F)：



在下文中，作為下述本發明實例1中之中間體E1來闡述此化合物(F)之製備。

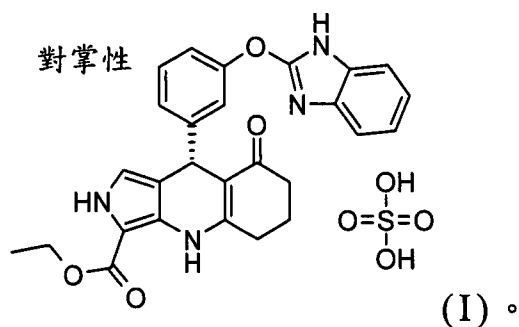
因此，本發明提供化合物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯或下式(F)之化合物F：



此化合物F呈以下形式：

- 該化合物F之硫酸鹽化合物I，
- 或該式(F)之產物之共晶體化合物II，
- 或調配物，其包括如上文所定義之該式(F)之化合物或該式(F)之產物之硫酸鹽化合物I或該式(F)之產物之共晶體化合物II。

因此，本發明提供如上文所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其因此具有下式(I)：



因此，本發明提供如上文所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其特徵在於其呈結晶型形式。

因此，本發明提供如上文所定義之化合物II或式(F)之產

物 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體。

因此，本發明提供如上文所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體，其特徵在於其係與L-蘋果酸之共晶體。

本發明亦提供如上文所定義之調配物，其特徵在於其包括如上文所定義之該式(F)之化合物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯、或該式(F)之產物之硫酸鹽化合物I或該式(F)之產物之共晶體化合物II。

本發明所提供之如上文所定義之化合物I及II或調配物係奧諾拉激酶之選擇性抑制劑。

本發明亦係關於包括該等化合物之醫藥組合物。

該等化合物可用作抗癌劑。

本發明亦係關於獲得該等化合物之方法且係關於該等方法中之一些中間體。

【先前技術】

多種癌症治療策略旨在抑制參與有絲分裂調節之奧諾拉型激酶，特別係奧諾拉A及B；在此方面，參見Nature Reviews 2004, 4, 927-936；Cancer Res. 2002, 94, 1320；Oncogene 2002, 21, 6175；Mol.Cell.Biol. 2009, 29(4), 1059-1071；Expert Opin. Ther. Patents 2005, 15(9), 1169-1182；Clin. Cancer Res. 2008, 14(6), 1639。

目前，正在臨床試驗中評估多種奧諾拉抑制劑化合物(例如，來自 Millennium 之 MLN-8237、來自 Astra-Zeneca 之 AZD-1152 或來自 Sunesis 之 SNS-314)。MLN-8237 對奧諾拉 A 具有選擇性，而 AZD-1152 對奧諾拉 B 具有選擇性。由於在癌症中兩種激酶(奧諾拉 A 及 B)均失調，故抑制奧諾拉 A 及 B 二者比選擇性抑制一種激酶或另一種激酶有利。此外，存在抑制多種激酶(包含奧諾拉 A 及 B)之多激酶化合物，例如來自 Astex 之化合物 AT-9283。對於此類型化合物，難以預測其對奧諾拉激酶之抑制可否在臨床上實際利用，此乃因抑制除奧諾拉 A 及 B 以外之激酶有可能產生副作用。因此，本發明意欲解決之一個技術問題係研發為奧諾拉 A 及 B 之強效且選擇性抑制劑的化合物。

環狀核苷酸磷酸二酯酶 PDE3 在藉由環狀核苷酸 cAMP 及 cGMP 介導之信號轉導中起主要作用，該信號轉導發生於平滑心肌及血管肌之肌細胞中。藉由小分子抑制 PDE3 具有肌力作用及血管舒張作用，可證明此可用於短期治療某些心肌病，該等心肌病之一特徵係心臟收縮之缺陷。然而，已顯示，長期使用該等分子會增加此類型患者之死亡率。此外，在不患有此類型病狀之患者(例如患有癌症之患者)中使用 PDE3 抑制劑可對心節律產生不期望影響。因此，在抗癌療法之情況下不抑制 PDE3 較為重要。在此方面，參見 *Exp. Opin. Invest. drugs* 2002, 11, 1529-1536 「Inhibitors of PDE3 as adjunct therapy for dilated cardiomyopathy」；*Eur. Heart J. 增刊* 2002, 4(增刊 D), D43-

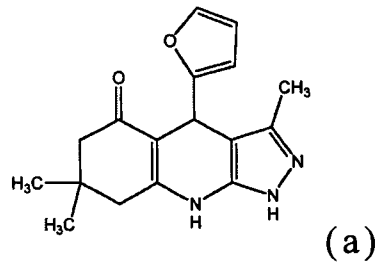
D49 「What is wrong with positive inotropic drugs? Lessons from basic science and clinical trials」。本發明意欲解決之另一技術問題係，使奧諾拉A及B抑制劑化合物不抑制酶PDE3。

同樣重要的是，抗癌劑呈現代謝穩定性(參見「Chimie pharmaceutique」[Pharmaceutical chemistry], G.L. Patrick, De Boeck, published 2003, ISBN 2-7445-0154-9之10.2.2部分)。原因在於醫藥化合物之藥物動力學不足係其研發失敗之主要原因之一(Curr. Pharm. 2005, 11, 3545 「Why drugs fail-a study on side effects in new chemical entities」)。此外，代謝通常係清除、藥物相互作用、藥物動力學之個體內變異性及臨床功效及毒性之主要決定因素(Curr. Drug Metab. 2004, 5(5), 443-462 「Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man」)。本發明意欲解決之另一技術問題係，奧諾拉A及B抑制劑化合物欲展現高化學及代謝穩定性。

Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 12, 1481-1484在表II中闡述具有不同三環結構之化合物6A。

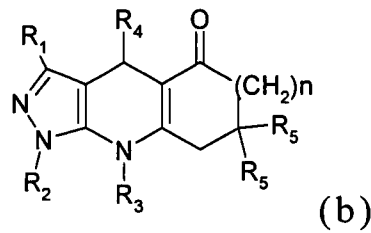
WO 01/36422闡述具有不同三環結構之化合物。

WO 2004/005323闡述式(a)之具有不同三環結構之化合物E5A29：



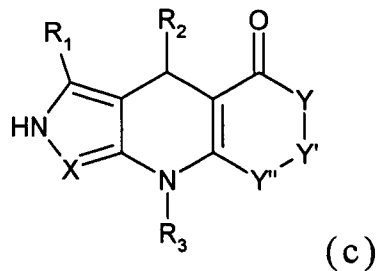
作為EPO受體。此外，該化合物在三環系統之頂部不包含由基團-O-苯并咪唑基取代之苯環。

WO 2005/016245闡述式(b)之具有不同三環結構之抗癌化合物：

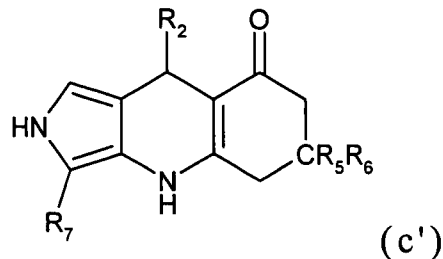


其中R4可表示經取代苯基。未闡述抑或提出由基團-O-苯并咪唑基取代。

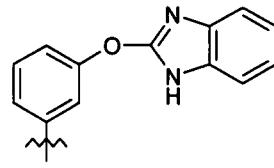
WO 2007/012972及EP 1746097闡述式(c)之抗癌化合物



且，根據一實施例，根據式(c')：

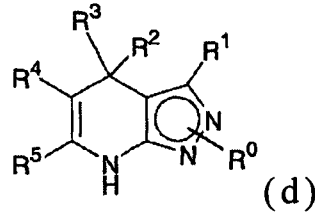


R2表示經取代芳基或雜芳基，X表示N或CR7，R5及R6二者均可表示H或CH₃。在WO 2007/012972中無實例含有表



現式(I)化合物之特徵的基團。此外，在所拆分之化合物中，WO 2007/012972教示右旋化合物對奧諾拉A或B的活性最強(參見第147頁表中的實例119及120)。

WO 02/062795闡述式(d)之化合物：



其中R4及R5可視情況形成5員環或6員環。

【發明內容】

為本發明標的物之結晶硫酸鹽及共晶體已展示大大增強之物理化學性質(可溶性、穩定性)，此允許研發適合於投與人類之調配物。由此調配之結晶硫酸鹽或共晶體已對人類腫瘤在小鼠中之異種移植模型展示顯著活性。

特定而言，本發明提供之優點為：

- 鑒定如上文所定義之為本發明標的物之硫酸鹽(結晶鹽或化合物I)、化合物II及調配物為奧諾拉激酶蛋白質之選擇性抑制劑；
- 此硫酸鹽或化合物I係結晶型，而此產物之鹼及許多其他鹽(例如，鹽酸鹽、磷酸鹽、對甲苯磺酸鹽及萘-1,5-二磺酸鹽)係非晶型；
- 為本發明標的物之此鹽或化合物I、化合物II及調配物比非晶型鹼或化合物F更易溶於水性介質中，且因此允許更好之調配物性質以投與人類。

因此，特定而言，硫酸鹽及與L-蘋果酸之共晶體之優點係在高溫度及濕度之儲存條件下比鹼更穩定。因此，結晶化合物比非晶型鹼易於稱重及分配。特定而言，調配物之優點係適合於靜脈內(iv)投與人類：該調配物使得氧化雜質(實例3)之發生率降低且提供在5°C下穩定數月並適合於臨床使用之溶液。

特定而言，本發明提供如上文所定義之調配物，其特徵在於其係呈膠束溶液形式。

特定而言，本發明提供如上文所定義之調配物，其特徵在於其係呈適合於靜脈內投與之膠束溶液形式。

【實施方式】

用於本發明之分析方法

方法 LC/MS-A

用於分析之產物係在Acquity Beh C18 UPLC管柱(1.7 μm , 2.1 \times 50 mm) (Waters)上恆溫保持在70°C以1 ml/min之流速及自含有0.1%甲酸之乙腈(溶劑B)至含有0.1%甲酸之水(溶劑A)的梯度進行洗脫來分離；洗脫程式：等梯度階段在5%之溶劑B下保持0.15分鐘，梯度在3.15分鐘內自5%至100%之溶劑B，然後經0.1分鐘返回到初始條件。產物係藉由Acquity PDA二極體陣列UV/vis檢測器(Waters，波長掃描範圍：192-400 nm)、Sedex 85光散射檢測器(Sedere，霧化氣體：氮氣，霧化溫度：32°C，霧化壓力：3.8巴)及Acquity SQD質譜儀(Waters，以正及負模式作業，質量掃描範圍：80 amu至800 amu)來檢測。

方法 LC/MS-B

光譜係在 Waters UPLC-SQD 裝置上以正及/或負電噴霧離子化模式 (ES+/-) 在以下液相層析條件下獲得：管柱：ACQUITY BEH C18 (1.7 μm , 2.1x50 mm)； $T_{\text{管柱}}$ ：50 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1 ml/min；溶劑：A：H₂O(0.1% 甲酸) B：CH₃CN(0.1% 甲酸)；梯度(2分鐘)：在 0.8 分鐘內 5% 至 50% B；1.2 分鐘：100% 之 B；1.85 分鐘 100% 之 B；1.95 分鐘 5% 之 B。

¹H NMR

光譜係在 Bruker 光譜儀上記錄，其中產物溶解於 DMSO-d₆ 中。化學位移 δ 以 ppm 表示。

IR

紅外光譜係在 Nicolet Nexus 光譜儀上在 4000 cm^{-1} 與 400 cm^{-1} 之間以 2 cm^{-1} 之解析度以 KBr 圓片記錄。

旋光度之量測

旋光度係在 Perkin-Elmer 341 旋光計上記錄。

元素分析

元素分析係在 Thermo EA1108 分析儀上實施。

粉末 X 射線繞射

分析係在呈 Bragg-Brentano 組態之 Bruker D8-Advance 繞射儀上實施。數據係在 21 $^{\circ}\text{C}$ (環境溫度) 下使用在 35 kV-40 mA 下生成之 CuK α 1 ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) X 射線源、經調節以照射寬度為 4 mm 之樣品表面的可變發散狹縫、Anton-Paar TTK450 恆溫室 (temperature chamber) 及 Vantec PSD 檢測器來記錄。將樣品置於 Anton Paar TTK450 恆溫室矽載片上

之槽中。藉由在矽載片上旋轉運動使樣品變平以得到恆定厚度之平坦表面。繞射圖係在 2° - 40° 之 2θ 角範圍內以連續模式使用 0.033° 之 2θ 角增量及每步0.5 s之採集時間來記錄。

研究化學穩定性及可溶性之HPLC方法

正在分析之產物係在XTerra MS C18 HPLC管柱(3.5 μm 4.6 \times 50 mm) (Waters)上恆溫保持在 40°C 以1.2 ml/min之流速及自含有0.035%三氟乙酸之乙腈(溶劑A)至含有0.05%三氟乙酸之水(溶劑B)的梯度進行洗脫來分離，洗脫程式如下：在25分鐘內梯度自10%至95%之溶劑A，然後等梯度階段保持5分鐘，然後在2分鐘內返回到初始條件，且管柱再平衡階段持續5分鐘。產物係使用Agilent二極體陣列UV/VIS檢測器(波長掃描範圍：190-950 nm)來檢測。

可溶性之量測

在超純水、pH 1之HCl緩衝介質、pH 4.7之乙酸鹽緩衝介質及pH 7.4之磷酸鹽緩衝介質中量測化合物之可溶性。

超純水係自Millipore生產系統獲得。

pH 1之HCl緩衝介質係藉由將由Merck出售之即用HCl 1 N溶液稀釋至1/10來製備。

pH 4.7之乙酸鹽緩衝介質係藉由將0.75 g三水合乙酸鈉添加至0.35 ml純乙酸中並用超純水補足至250 ml來製備。

pH 7.4之磷酸鹽緩衝介質係藉由將40.5 ml 0.1 M磷酸氫二鈉溶液添加至9.5 ml 0.1 M磷酸二氫鈉溶液中，然後用超純水補足至100 ml來製備。

無論在哪種介質中量測化合物之可溶性，皆採用如下方案：將大約 4 mg 呈粉末形式之化合物稱重至 Perkin Elmer 7 ml 玻璃管中。添加體積為 2 ml 之所討論介質。然後在環境溫度及避光下，使用 Rock'n'roller RM5 攪拌器將管攪拌 16 小時。攪拌 16 小時之後，將懸浮液轉移至 2 ml 安全鎖扣 Eppendorf 管中且在 Sigma 3-18k 離心機中以 18000 rpm 離心 15 分鐘。離心之後即刻取上清液之等分試樣，用於藉由 HPLC 使用上述實驗條件量測化合物之濃度。

固體形式之物理化學穩定性之研究

所討論化合物之固體形式的化學及物理穩定性係將化合物在以下四種應力條件下儲存 14 天之後藉由 HPLC 及粉末 X 射線繞射來研究：50°C / 環境濕度、50°C / 80% 相對濕度、80°C / 環境濕度及 80°C / 80% 相對濕度。

將大約 20 mg 用於研究之所討論化合物置於四個結晶器中。將兩個結晶器非氣密性封閉且置於兩個溫度分別控制在 50°C 及 80°C 之烘箱(商標名，型號)中。將兩個結晶器保持打開且置於兩個含有預飽和 KCl 溶液之乾燥器中，該 KCl 溶液在乾燥器中生成約 80% 之相對濕度。然後將該兩個乾燥器置於兩個溫度分別控制在 50°C 及 80°C 之 Heraeus UT6060 烘箱中。

在儲存 14 天之後，將結晶器氣密性封閉且使其溫度自然達至 21°C (環境溫度)。然後藉由粉末 X 射線繞射及 HPLC 分析所討論化合物之四個樣品以分別檢驗化合物之物理穩定性及化學穩定性。

生物方法

對奧諾拉 A 及 B 之活性之量測

抑制酶之激酶活性之能力係藉由在不同濃度(通常為 0.17 nM 至 10000 nM)之測試化合物存在下量測酶之殘留激酶活性來估計。產生劑量反應曲線，其可確定 IC₅₀(50%抑制濃度)。激酶活性係藉由放射性分析在 37°C 下培育 30 分鐘之後納入蛋白質 NuMA(核有絲分裂器蛋白質)片段中之放射性磷酸鹽(33P)之量來量測。首先將測試化合物以不同濃度溶解於二甲基亞砷(DMSO)中。反應發生在 FlashPlate 微量滴定板(鎳螯合物 FlashPlate-96, PerkinElmer)之孔中。每一孔(100 µl)含有存於 50 mM Tris-HCl, pH=7.5; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl、1 mM 二硫蘇糖醇之緩衝液中之 10 nM 奧諾拉 A、500 nM NuMA、1 µM ATP 及 0.2 µCi ATP-γ-33P。DMSO 之最終百分比為 3%。在藉由攪拌均質化之後，將板在 37°C 下培育 30 分鐘。然後移除孔之內容物且用 PBS 緩衝液洗滌孔。然後使用 TRILUX I450 Microbeta 計數器(Wallac)量測放射性。在每一板中，存在 8 個對照孔：四個陽性對照(最大激酶活性)，對於此陽性對照，量測係在存在酶及受質且不存在本發明化合物下實施；及四個陰性對照(背景雜訊)，對於此陰性對照，量測係在不存在酶、受質及測試化合物下實施。量測結果示於表 I 中。

奧諾拉 A

所用重組人類酶奧諾拉 A 係以在 N 末端位置具有多組胺酸標籤之完整形式表現且產生於大腸桿菌(E.coli)中。在 C

末端位置具有多組胺酸標籤之人類蛋白質NuMA之片段(胺基酸1701-2115)以重組形式在大腸桿菌中表現。

奧諾拉B/Incenp

完整人類酶奧諾拉B與人類蛋白質Incenp之片段(aa 821-918)在杆狀病毒系統中共表現且在昆蟲細胞中表現。奧諾拉B在N末端位置具有多組胺酸標籤，而Incenp片段在N末端位置具有麩胱甘肽-S-轉移酶(GST)標籤。兩種蛋白質形成複合物，將其稱為奧諾拉B/Incenp。在C末端位置具有多組胺酸標籤之人類蛋白質NuMA之片段(aa 1701-2115)以重組形式在大腸桿菌中表現。將此片段用作受質。

本發明進一步提供任何用於製備如上文所定義之化合物I、II及調配物之方法。

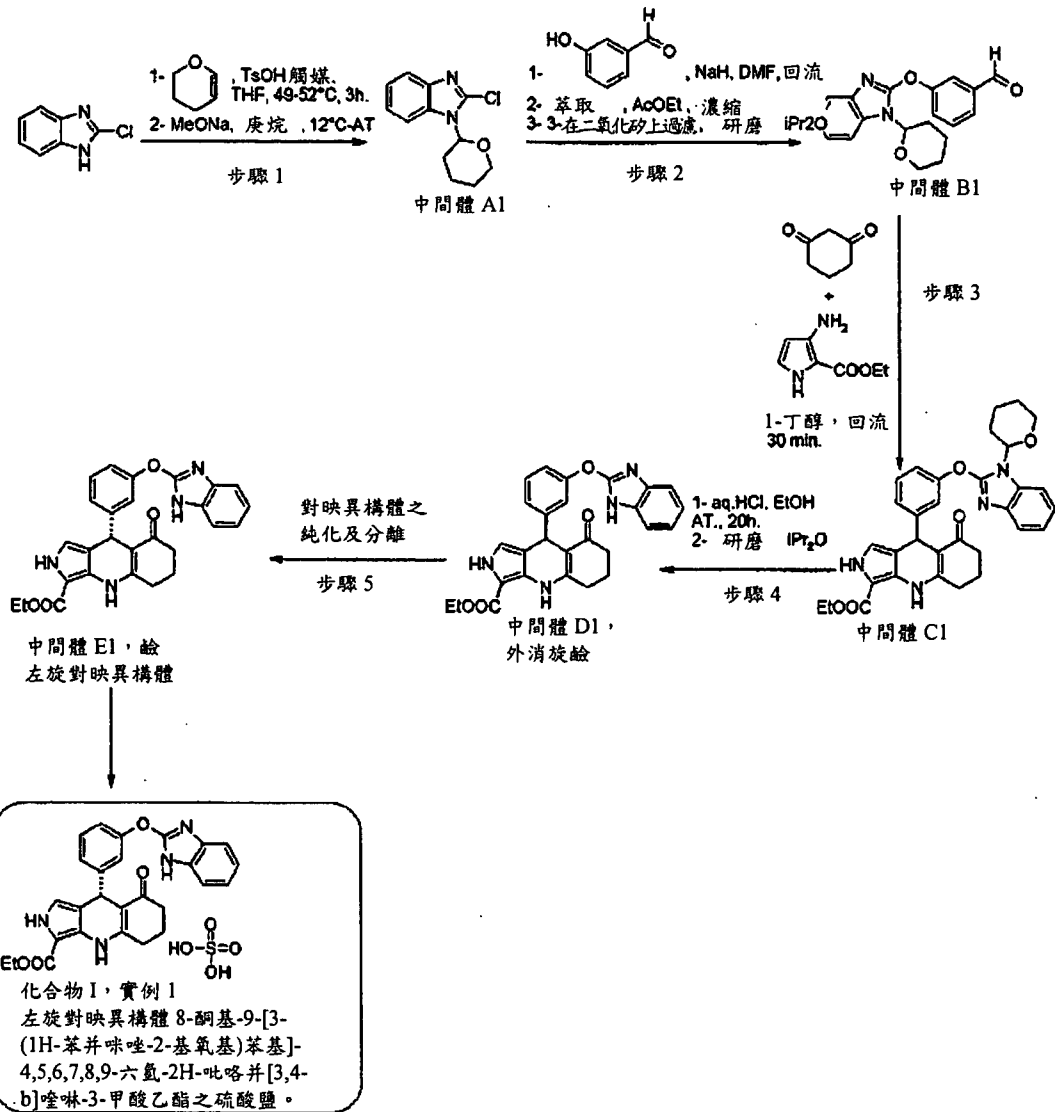
因此，本發明提供任何用於製備如上文所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽之方法，且特定而言如下文方案1中所定義之方法或者如實驗部分中所述之方法。

因此，本發明提供任何用於製備如上文所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體之方法，且特定而言如實驗部分中所述之方法。

因此，本發明提供任何用於製備如上文所定義之調配物之方法，且特定而言如實驗部分中所述之方法。

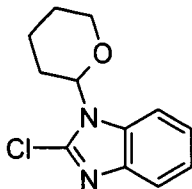
本發明之實驗部分

實例 1：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯左旋對映異構體之硫酸鹽之製備



方案 1

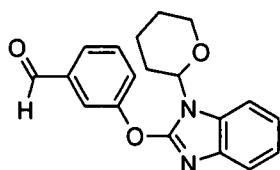
中間體 A1：2-氯-1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑



在氫氣中於攪拌下，向 10 l 反應器中裝入 2.5 l THF、180

g 2-氯苯并咪唑(1.18 mol)及325 ml 3,4-二氫-2H-吡喃(6.56 mol, 3當量)。加熱反應器直至發生溶解(介質之溫度: 40°C)。然後引入6.3 g對甲苯磺酸(0.033 mol, 0.028當量)。保持溫度在49°C與52°C之間達2.5小時。將系統冷卻至12°C且在保持攪拌下經15分鐘之總時間添加7.65 g甲醇鈉(0.142 mol, 0.12當量)。然後使溫度達至18°C, 添加5 l正庚烷, 且將整體在300 g Clarcel FLO-M上過濾, 用5 l正庚烷洗滌滯留物。在減壓下濃縮濾液至乾燥以得到292.6 g呈淡黃色油狀物形式之2-氯-1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑(定量產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.42至2.01 (m, 5H); 2.21至2.34 (m, 1H); 3.69至3.78 (m, 1H); 4.12 (d, J=11.4 Hz, 1H); 5.72 (dd, J=2.4及11.2 Hz, 1H); 7.22至7.34 (m, 2H); 7.62 (d, J=7.2 Hz, 1H); 7.78 (d, J=7.2 Hz, 1H)。

中間體B1: 3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]-苯甲醛



在氫氣中, 向兩個各配備有冷凝器、溫度計及攪拌軸之2 l三頸圓底燒瓶中裝入N,N-二甲基甲醯胺(每個燒瓶0.4 l)及3-羥基苯甲醛(68.5 g, 燒瓶1; 64.2 g, 燒瓶2; 1.08 mol)。然後分批添加氫化鈉(存於礦物油中之60%分散液)(燒瓶1: 26 g; 燒瓶2: 24 g; 1.25 mol, 1.2當量), 添加期間之最高溫度為32°C。然後引入估計純度為85%之2-氯-1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑(A1)(燒瓶1: 151 g, 存於

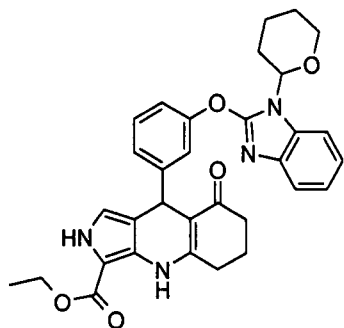
0.5 l N,N-二甲基甲醯胺中；燒瓶2：142 g，存於0.5 l N,N-二甲基甲醯胺中；1.05 mol, 0.97當量)。然後使混合物回流(溫度為140°C，升溫時間為40分鐘)且保持回流1小時。然後停止加熱且使混合物冷卻1.5小時。合併兩個燒瓶之內容物。將整體與5 l冰水緩慢混合。隨後用4×2.5 l乙酸乙酯(AcOEt)萃取所獲得水相。然後合併有機相，用3 l水洗滌且然後用2 l飽和NaCl溶液洗滌，且最後藉由添加MgSO₄乾燥過夜。隨後將所獲得有機相在玻璃料(孔隙度4)上過濾且在減壓下濃縮至乾燥，得到385 g棕色油狀物(LC/MS-A，tr(滯留時間)=1.86分鐘，MS正模式：m/z=323.16)。

將一部分158 g上文所獲得之粗物質熱溶解於1.5 l正庚烷/AcOEt混合物(以體積計為8/2)中，與500 g二氧化矽(70-30網目)合併，且將整體攪拌45分鐘。將所獲得懸浮液在矽藻土上過濾且用3 l正庚烷/AcOEt混合物(以體積計為8/2)洗滌。將所獲得有機相在減壓下濃縮至乾燥。藉由機械攪拌及用超音處理將殘留物再懸浮於200 ml異丙醚中，且然後在玻璃料(孔隙度3)上過濾。將所獲得固體用2×40 ml異丙醚洗滌且在減壓及40°C下乾燥16小時，得到68 g固體。對粗產物之剩餘部分實施相似處理產生87.8 g固體。將所獲得固體合併且均質化，得到155.8 g呈亮褐色晶體形式之3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯甲醛(LC/MS-A，tr=1.87分鐘，MS正模式 m/z=323.13)。MS(LC/MS-B): tr=1.00分鐘；[M+H]⁺: m/z 323；¹H NMR (400

MHz, DMSO-d₆): 1.54至1.62 (m, 1H); 1.63至1.84 (m, 2H); 1.92至2.03 (m, 2H); 2.30至2.42 (m, 1H); 3.70至3.79 (m, 1H); 4.10 (d, J=11.5 Hz, 1H); 5.74 (dd, J=2.1及11.1 Hz, 1H); 7.13至7.22 (m, 2H); 7.43 (d, J=7.3 Hz, 1H); 7.65 (d, J=7.3 Hz, 1H); 7.73 (t, J=7.8 Hz, 1H); 7.78至7.83 (m, 1H); 7.87 (d, J=7.8 Hz, 1H); 7.96 (s, 1H); 10.05 (s, 1H)。

用2 l正庚烷/AcOEt混合物(以體積計為1/1)洗滌上文所用之二氧化矽相，在減壓下濃縮至乾燥後產生67 g物質。將此物質溶解於2 l正庚烷/AcOEt混合物(以體積計為9/1)中，與285 g二氧化矽(70-30網目)合併，攪拌且用超音處理1小時。然後將懸浮液在矽藻土上過濾，且用2 l正庚烷/AcOEt混合物(以體積計為9/1)洗滌固相。將濾液在減壓下濃縮至乾燥且將殘留物在400 ml正庚烷/乙醇混合物(以體積計為95/5)中研磨，在玻璃料(孔隙度3)上過濾且在減壓下乾燥，得到35 g呈亮褐色晶體形式之3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯甲醛。(LC/MS-A, tr=1.93分鐘, MS正模式 m/z=323.16)。

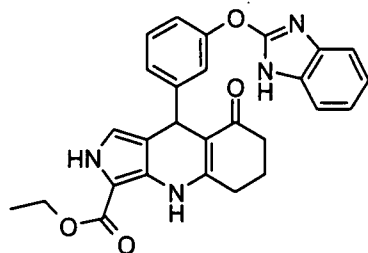
中間體 C1：8-酮基-9-{3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯基}-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯



在磁力攪拌下，向2 l錐形燒瓶中裝入50 g 3-胺基-2-乙氧羰基吡咯鹽酸鹽及0.204 l 2 N氫氧化鈉。將整體在環境溫度(AT)下攪拌15分鐘且然後用3×0.3 l二氯甲烷萃取。合併有機相，經MgSO₄乾燥並在減壓下濃縮至乾燥。將殘留物與正戊烷一起研磨，過濾且在減壓下乾燥至恒重，得到36.4 g呈棕色固體形式之3-胺基-2-乙氧羰基吡咯。

向配備有攪拌軸、溫度計及冷凝器之2 l三頸圓底燒瓶中裝入1.2 l 1-丁醇、145 g 3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯甲醛(0.405 mol, B1)、62.4 g 3-胺基-2-乙氧羰基吡咯(1當量, 0.405 mol)、46.8 g 97% 1,3-環己二酮(1當量, 0.405 mol)及70.5 ml N,N-二異丙基乙胺(1當量)，且使此初始裝料回流(升溫時間為55分鐘，保持回流30分鐘，溫度為114°C)。隨後將混合物冷卻至AT且在減壓下濃縮至乾燥，得到290 g含有8-酮基-9-{3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯基}-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之棕色油狀物。(LC/MS-A, tr=1.96分鐘, MS正模式m/z=553.33)。用35 g 3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯甲醛(0.098 mol, 實例B1)實施相似作業，得到72 g含有8-酮基-9-{3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯基}-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之棕色油狀物。(LC/MS-A, tr=1.96分鐘, MS正模式m/z=553.35)。

中間體 D1：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯



向 2 l 圓底燒瓶中裝入 224 g 含有 8-酮基-9-[3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯(實例 1.3)之棕色油狀物、0.7 l 乙醇及 0.243 l 2 N 鹽酸。將混合物在 AT 下攪拌 16 小時，然後在玻璃料(孔隙度 4)上過濾。將濾液在減壓下濃縮至乾燥且將殘留物與 0.5 l 異丙醚一起研磨。將所獲得固體在減壓下乾燥至恒重，得到 253 g 含有 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之棕色固體。(LC/MS-A, tr=1.46 分鐘, MS 正模式 m/z=469.29)。用 54 g 含有 8-酮基-9-[3-[1-(四氫吡喃-2-基)-1H-苯并咪唑-2-基氧基]苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯(C1)之棕色油狀物實施相似作業，產生 60 g 含有 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之棕色固體。(LC/MS-A, tr=1.48 分鐘, MS 正模式 m/z=469.29)。

0.8 g 所獲得物質之等分試樣部分可藉由在 50 g 二氧化矽(10-90 μm)之柱(Biotage SNAP, KP-Sil)上層析來純化，洗脫方式如下：達 20 分鐘之二氯甲烷之等梯度階段，然後經 1 小時梯度自 0 至 1%(以體積計)之存於二氯甲烷中之異丙醇，且最後達 20 分鐘之二氯甲烷/異丙醇(以體積計為 99/1)

之等梯度階段。合併含有期望產物之部分，得到0.21 g黃色固體。將以相同規模實施之兩次相似層析分離之產物自乙腈中重結晶，得到總計0.16 g呈褐色晶體形式之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯。(LC/MS-A, tr=1.61分鐘, MS正模式 m/z=469.28)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.29 (t, J=7.0 Hz, 3H); 1.80至1.97 (m, 2H); 2.19至2.27 (m, 2H); 2.55至2.69 (m, 1H); 2.81 (dt, J=4.8及17.2 Hz, 1H); 4.26 (q, J=7.0 Hz, 2H); 5.11 (s, 1H); 6.73 (d, J=3.3 Hz, 1H); 7.02至7.16 (m, 5H); 7.25 (t, J=7.9 Hz, 1H); 7.31至7.38 (m, 2H); 8.34 (s, 1H); 11.33 (寬s, 1H); 12.26 (寬s, 1H)。元素分析：C=68.72%; H=5.10%; N=11.82%; H₂O=0.38%。

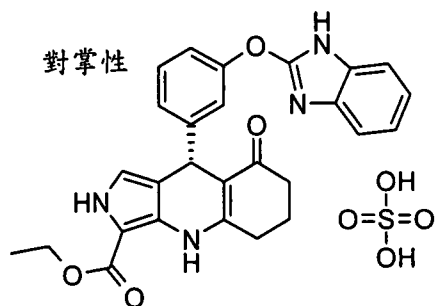
中間體 E1：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體



左旋對映異構體係在 Welk-01RR 對掌性管柱 (10 μM, 80×350 mm) (Regis, USA) 上用正庚烷/二氯甲烷/乙醇/三乙胺混合物 (以體積計為 50/47.5/2.5/0.1) 洗脫自實例 D1 之粗產物純化。產物之洗脫係藉由 UV 光譜法在 265 nm 下來檢測。在每一作業中，注入 10 g 量之實例 D1 中所述之粗產

物。在該等條件下，對應於左旋對映異構體之峰係以介於50分鐘與80分鐘之間之tr洗脫。將純化之左旋對映異構體之各部分(對應於純化310 g實例D1中所述之粗產物所需要之作業)合併、均質化並在減壓下濃縮至乾燥，產生50 g褐色固體。質譜(LC/MS-B): tr=0.77分鐘；[M+H]⁺: m/z 469；[M-H]⁻: m/z 467。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.29 (t, J=7.1 Hz, 3H); 1.79至1.97 (m, 2H); 2.19至2.27 (m, 2H); 2.55至2.66 (m, 1H); 2.81 (dt, J=4.9及17.1 Hz, 1H); 4.26 (q, J=7.1 Hz, 2H); 5.12 (s, 1H); 6.73 (d, J=3.4 Hz, 1H); 7.02至7.16 (m, 5H); 7.25 (t, J=8.3 Hz, 1H); 7.29至7.41 (m, 2H); 8.32 (s, 1H); 11.31 (寬s, 1H); 12.26 (寬s, 1H)。IR: 主帶: 1678; 1578; 1525; 1442; 1188; 1043及743 cm⁻¹。旋光度: 在C=0.698 mg/ml (在甲醇中)下，[α]_D = -38.6±0.7。元素分析: C=68.18%; H=5.92%; N=11.22%; H₂O=1.25%。

化合物 I: 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽



在圓底燒瓶中，將350 ml乙腈添加至3.9 g (8.33 mmol)

呈非晶型鹼形式之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體中，且將整體在60°C下攪拌30分鐘，並添加20 ml乙腈，同時在攪拌下保持混合物為60°C。獲得略渾濁之棕色溶液。然後在孔隙度3之玻璃料上過濾此溶液。然後添加85 ml 0.1 M存於水/乙腈混合物中之硫酸(1/4-v/v; 8.5 mmol, 1.02當量)，且短暫手動攪拌混合物並在不攪拌下使混合物返回到環境溫度(約25°C，經30分鐘)。過濾所形成之晶體且用3×10 ml乙腈洗滌且然後在減壓及70°C下乾燥至恒重，得到3.1 g黃色晶體，熔點：242-244°C，藉由微量分析確定為單硫酸鹽形式，其含有5.7% H₂O(1.8 mol/mol，藉由K. Fischer方法確定)及0.5 mol/mol乙腈(藉由NMR確定)。

然後將晶體與70 ml乙酸乙酯合併且使混合物回流30分鐘。在返回到環境溫度之後，藉由過濾收集晶體，用30 ml乙酸乙酯洗滌且在減壓及70°C下乾燥過夜。此得到3.04 g黃色晶體：熔點為242-244°C，乙腈：0.2 mol/mol (NMR)，H₂O 5.9% (1.9 mol/mol)。

然後再次將晶體與120 ml乙酸乙酯合併且使混合物回流1小時30分鐘。在返回到環境溫度之後，藉由過濾收集晶體，用30 ml乙酸乙酯洗滌且在減壓及70°C下乾燥過夜。此得到2.94 g黃色晶體：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之單硫酸鹽。

熔點為 242-244°C

¹H NMR 光譜 (400 MHz, δ 以 ppm 表示, DMSO-d₆):

1.29 (t, J=7.1 Hz, 3 H); 1.78 至 1.96 (m, 2 H); 2.20 至 2.28 (m, 2 H); 2.61 (m, 1 H); 2.81 (m, 1 H); 4.26 (q, J=7.1 Hz, 2 H); 5.12 (s, 1 H); 6.73 (d, J=3.4 Hz, 1H); 7.04 至 7.18 (m, 5 H); 7.27 (t, J=8.0 Hz, 1 H); 7.34 至 7.42 (m, 2 H); 8.33 (s, 1 H); 11.31 (寬 s, 1 H)。乙腈: 痕量

紅外光譜:

主帶集中於: 3424; 3209; 2939; 2621; 1684; 1635; 1578; 1471; 1372; 1188; 1042; 782; 762; 586 cm⁻¹

元素分析:

C=54.41-54.43%; H=5.06-4.94%; N=9.51-9.53%; S=5.24-5.25%; 水=5.47% (K. Fischer)

旋光度:

OR=-10.1 +/- 0.6; 在 589 nm 下 C=2.204 mg/0.5 ml CH₃OH; 溫度為 20°C

因此, 本發明提供如上文所定義之化合物 I, 或 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽, 其特徵在於其熔點係 242-244°C。

實例 2.a: 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與 L-蘋果酸之共晶體(化合物 II)之製備。

8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-

六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體(化合物II)係藉由以下方式獲得：在環境溫度下，在100微升乙醇存在下，藉助珠磨機，將0.53毫莫耳8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(來自實例1之中間體E1)與0.53毫莫耳L-蘋果酸一起研磨20分鐘。

實例 2.b：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體(化合物II)之製備。

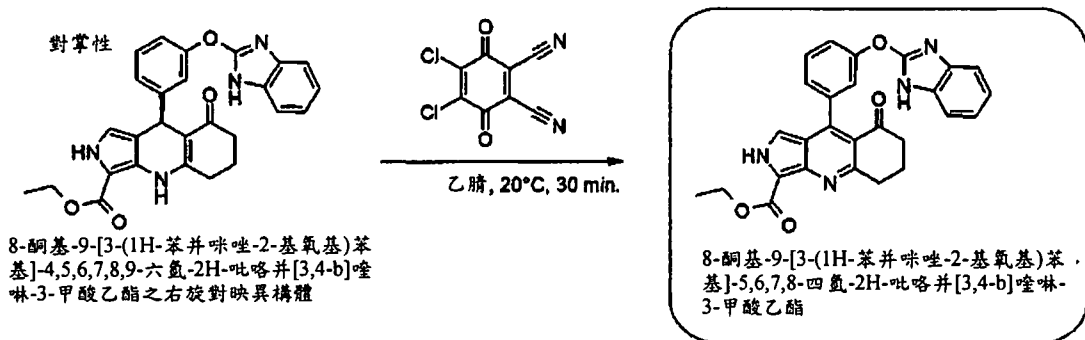
8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體(化合物II)係藉由以下方式獲得：在環境溫度下，在100微升乙醇存在下，藉助珠磨機，將0.53毫莫耳8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(來自實例1之中間體E1)與0.53毫莫耳L-蘋果酸一起研磨20分鐘。將所得固體在環境溫度下懸浮於2.5 ml 乙酸乙酯中達24小時。

實例 2.c：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體(化合物II)之製備。

8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體

與L-蘋果酸之共晶體(化合物II)係藉由以下方式獲得：混合8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(實例1之中間體E1)之乙醇溶液(0.3毫莫耳存於250微升中)與L-蘋果酸之乙醇溶液(0.3毫莫耳存於56微升中)。用2 mg 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體引發結晶，且然後添加250微升乙酸乙酯。使所獲得懸浮液在環境溫度下攪拌過夜。

實例3：8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-5,6,7,8-四氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之製備。



為確保在下述製備中之產率重現性，建議使用旨在防止在氧化反應期間在設備及反應物中存在痕量水分之作業條件。向配備有磁棒之三頸燒瓶中依序裝入2.03 g 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之右旋對映異構體(藉由實例1中所述之層析方法分離)、100 ml來自即時打開之新瓶之無水乙腈及1 g 2,3-二氯-5,6-二氰基1,4-二酮基苯基。將反應混合物在環境溫度下攪拌。溶液變黑且然後出現沉澱。在反應30

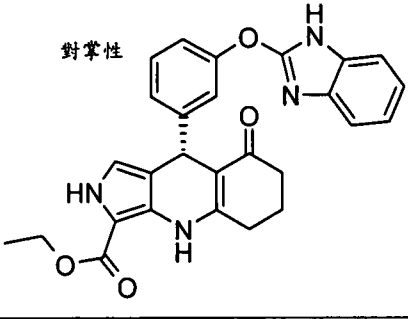
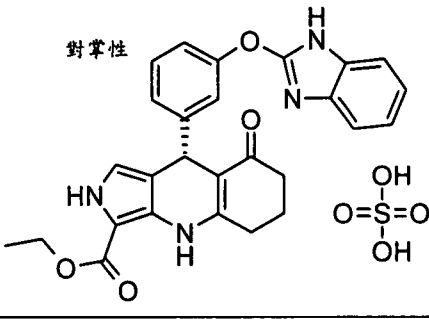
分鐘之後，將反應混合物在減壓下濃縮且將殘留物溶解於100 ml水中。用5×100 ml乙酸乙酯萃取所得溶液。合併有機相，經硫酸鎂乾燥並在減壓下濃縮。將殘留物溶解於最小體積之二氯甲烷/甲醇混合物(1/1, v/v)中，與6 g層析級二氧化矽(40-63 μm)合併且再次濃縮。將所得粉末置於層析柱中，隨後裝配於100 g二氧化矽(10-90 μm, Biorad)管柱之頂部，且將總成安裝於Biotage層析儀上。根據由Biotage層析軟體給定之標準條件，以自0至5%之存於二氯甲烷中之異丙醇(10管柱體積)的梯度來洗脫管柱。合併均質部分且在減壓下濃縮，得到1.77 g黃色固體。將固體溶解於150 ml飽和碳酸氫鈉水溶液中且用3×150 ml乙酸乙酯萃取。合併有機相，用150 ml飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌，經硫酸鎂乾燥並在減壓下濃縮。合併先前水相，用1×150 ml甲苯，且然後2×150 ml甲苯/乙酸乙酯混合物(1/1, v/v)萃取，且合併有機相，用150 ml飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌，經硫酸鎂乾燥並在減壓下濃縮。將有機相之濃縮殘留物再懸浮於50 ml乙酸乙酯中，且使懸浮液回流15分鐘且然後使其冷卻至環境溫度。過濾所形成固體且在減壓下乾燥，得到970 mg 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-5,6,7,8-四氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯。SAR216905 VAC.LDS2.207.1，

LC/MS：方法 LC/MS-A，tr=1.35 分鐘，MS 正模式 m/z=467.33，

¹H NMR光譜(400 MHz，d以ppm表示，DMSO-d₆): 1.34 (t, J=7.1 Hz, 3 H); 2,10 (m, 2 H); 2.61 (m, 2 H); 3.15 (m, 2

H); 4.32 (q, J=7.1 Hz, 2 H); 7.11 (m, 2 H); 7.19 (m, 1 H); 7.35 (m, 1 H); 7.38至 7.44 (m, 4 H); 7.50 (t, J=7.9 Hz, 1 H); 12.78 (擴展之 m, 2 H)。

生物結果：

結構		
化合物 11.	中間體E1(實例1)	化合物I(實例1)
物理形式	非晶型	結晶
IC50奧諾拉 A (nM)	2	2
IC50奧諾拉 B (nM)	1	1

實例 4：化合物 I 及 II 之結晶結構之證實

藉由粉末 X 射線繞射來研究化合物 I(硫酸鹽)、化合物 II(共晶體)及中間體 E1 之結晶或非晶型性質。

所記錄之中間體 E1 之繞射圖的特徵在於在整個所研究之角範圍 (2θ 為 2° - 40°) 內之擴散暈，其係非晶型產物之特徵。

所記錄之化合物 I(根據實例 1 中所述之實驗條件獲得)之粉末 X 射線繞射圖係結晶產物之特徵。所記錄之繞射圖顯示於圖 1 中且主要繞射峰之細節展示於表 4-1 中。

因此，本發明提供如上文所定義之化合物 I 或 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯

并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其具有如圖1中所定義之X射線繞射圖。

所記錄之化合物II(共晶體)(根據實例2中所述之實驗條件獲得)之粉末X射線繞射圖係結晶產物之特徵。所記錄之繞射圖顯示於圖2中且主要繞射峰之細節展示於表4-2中。

因此，本發明提供如上文所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯與L-蘋果酸之共晶體，其具有如圖2中所定義之X射線繞射圖。

2 θ (°)	d (Å)	強度
7.215	12.24212	66.3
10.804	8.18214	8.5
11.059	7.99377	19.7
11.75	7.52565	27.3
14.483	6.1109	41.3
15.497	5.71331	11.8
17.247	5.13736	9.4
18.135	4.8877	40
18.734	4.73293	15.5
19.354	4.58267	26.6
19.961	4.44456	11.3
20.403	4.34919	11.6
21.727	4.08704	11.6
22.249	3.99249	100
23.686	3.75334	21.4
24.201	3.67469	14
24.937	3.56777	57.7
25.42	3.50113	26.4
26.681	3.3384	13.1
28.34	3.14666	14.4
31.321	2.85359	14.2

表 4-1：所記錄之如根據詳細闡述於實例 1 中之實驗條件所獲得之化合物 I 的主要繞射峰之 2θ 角位置、平面間距及相對強度。

2θ (°)	d (Å)	強度
4.797	18.40588	14.9
11.476	7.7043	33.2
11.848	7.46367	15.1
12.7	6.96481	13.2
14.232	6.21834	7.4
14.837	5.96602	12.8
15.825	5.59552	11.6
17.086	5.18542	33.2
18.589	4.76942	20
18.966	4.67532	35.9
19.444	4.56146	18.1
20.209	4.39061	100
21.094	4.20842	48.3
21.539	4.12238	29.7
22.119	4.01562	87.3
23.121	3.84384	19.9
25.001	3.5588	35.6
26.139	3.40638	43.6
29.326	3.0431	35.1

表 4-2：所記錄之如根據詳細闡述於實例 2 中之實驗條件所獲得之化合物 II(共晶體)的主要繞射峰之 2θ 角位置、平面間距及相對強度。

實例 5：化合物 I 及 II 之可溶性之測定

在超純水中、pH 1 HCl 緩衝介質中、pH 4.7 乙酸鹽緩衝介質中及 pH 7.4 磷酸鹽緩衝介質中量測化合物 I 及化合物 II 之可溶性。

下表整理在攪拌16 h之後所量測之化合物I及化合物II的可溶性值。

可溶性介質	化合物I(硫酸鹽)	化合物II(共晶體)
超純水	0.025 mg/ml (pH=3.4)	0.019 mg/ml (pH=3.5)
0.1 N HCl	> 2 mg/ml* (pH=1.1)	> 2 mg/ml* (pH=1.0)
乙酸鹽緩衝液pH 4.7	0.009 mg/ml (pH=4.6)	0.010 mg/ml (pH=4.6)
磷酸鹽緩衝液pH 7.4	0.008 mg/ml (pH=7.4)	0.009 mg/ml (pH=7.5)

*：未達到飽和

表 5-1：在超純水中、pH 1 HCl緩衝液中、pH 4.7 乙酸鹽緩衝液中及 pH 7.4 磷酸鹽緩衝液中攪拌16小時之後所量測之化合物I及II之可溶性值(目標為2 mg/ml)。

實例 6：化合物I及II在不同條件下之穩定性之測定

化合物I及化合物II之物理及化學穩定性係在以下四種應力條件下儲存14天之後分別藉由粉末X射線繞射及HPLC來研究：50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度、80°C/環境濕度及80°C/80%相對濕度。

圖3比較所記錄之取自四個結晶器之化合物I之四份等分試樣的粉末X射線繞射圖，該四個結晶器在四種不同濕度及溫度條件下儲存14天。所記錄之在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度及80°C/環境濕度下保持14天之等分試樣的繞射圖與所記錄之化合物I原樣的繞射圖相當。所記錄之在80°C/80%相對濕度下保持14天之等分試樣的繞射圖

與所記錄之化合物I原樣的繞射圖不同。該等結果展示化合物I在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度及80°C/環境濕度之條件下經14天之物理穩定性，及化合物I在80°C/80%相對濕度之條件下經14天之物理不穩定性。

表6-1報告藉由HPLC測定之在四種應力條件下儲存之化合物I之四份等分試樣之降格百分比。該等結果展示化合物I在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度及80°C/環境濕度之條件下經14天之化學穩定性，及化合物I在80°C/80%相對濕度之條件下經14天之化學不穩定性。

	化合物I			
條件	50°C/環境濕度	50°C/80% 相對濕度	80°C/環境濕度	80°C/80% 相對濕度
降格百分比	約1%	約0.3%	約1.2%	約16.1%

表6-1：化合物I在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度、80°C/環境濕度及80°C/80%相對濕度之應力條件下儲存14天之降格百分比

圖4比較所記錄之取自四個結晶器之化合物II之四份等分試樣的粉末X射線繞射圖，該四個結晶器在四種不同濕度及溫度條件下儲存14天。所記錄之在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度、80°C/環境濕度及80°C/80%相對濕度下保持14天之等分試樣的繞射圖與所記錄之化合物II原樣的繞射圖相當。該等結果展示化合物II在50°C/環境濕度、50°C/80%相對濕度、80°C/環境濕度及80°C/80%相對濕度之條件下經14天之物理穩定性。

表 6-2 報告藉由 HPLC 測定之在四種應力條件下儲存之化合物 II 之四份等分試樣之降格百分比。該等結果展示化合物 II 在 50°C / 環境濕度、50°C / 80% 相對濕度及 80°C / 環境濕度之條件下經 14 天之化學穩定性，及化合物 II 在 80°C / 80% 相對濕度之條件下經 14 天之化學不穩定性。

條件	化合物 II			
	50°C / 環境濕度	50°C / 80% 相對濕度	80°C / 環境濕度	80°C / 80% 相對濕度
降格百分比	約 0.0%	約 0.3%	約 0.6%	約 8.7%

表 6-2：化合物 II 在 50°C / 環境濕度、50°C / 80% 相對濕度、80°C / 環境濕度及 80°C / 80% 相對濕度之應力條件下儲存 14 天之降格百分比

實例 7：用於靜脈內投與之具有 5 mg/ml (活性成份) 的呈膠束溶液形式之調配物

向圓底燒瓶中裝入 25 mg 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(實例 1，中間體 E1)、375 mg 聚山梨醇酯 80 (吐溫 80 (Tween 80)) 及 125 μ l 乙醇。將懸浮液攪拌約 15 分鐘直至發生溶解，且然後添加 4.5 ml 含有 17.5 mg 抗壞血酸(對於溶液抗壞血酸為 3.5 mg/ml) 或 2.5 mg 抗壞血酸(對於溶液抗壞血酸為 0.5 mg/ml) 之 5% 葡萄糖水溶液 (G5)。使用 H₂SO₄ 將混合物酸化至 pH 為 2 且然後攪拌直至完全均質。溶解之後，藉由添加 1 N NaOH 使 pH 上升至 3。最後，藉由添加 G5 將體積補足至 5 ml。

將調配物保存在抗生素瓶(antibiotic flask)中於氮氣中以及在4°C及不存在光下儲存。

藉由HPLC監測氧化產物8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-5,6,7,8-四氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯(實例3)之出現。在5°C下儲存35天之後，氧化產物(實例3)之分析結果展示於下表中，其與以5 mg/ml存於水/乙腈混合物(50/50)中之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(實例1，化合物I)參考溶液進行比較。

8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(鹼或硫酸鹽)之調配物	在5°C下儲存35天之後，藉由HPLC檢測之氧化產物{8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-5,6,7,8-四氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯}之量(面積%)
以5 mg/ml存於水/乙腈混合物(50/50)中之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(實例1，化合物I)	0.65
8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(實例1，中間體E1)、7.5%聚山梨醇酯80、2.5%乙醇、G5、0.5 mg/ml抗壞血酸	0.5
8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體(實例1，中間體E1)、7.5%聚山梨醇酯80、2.5%乙醇、G5、0.5 mg/ml抗壞血酸	0.25

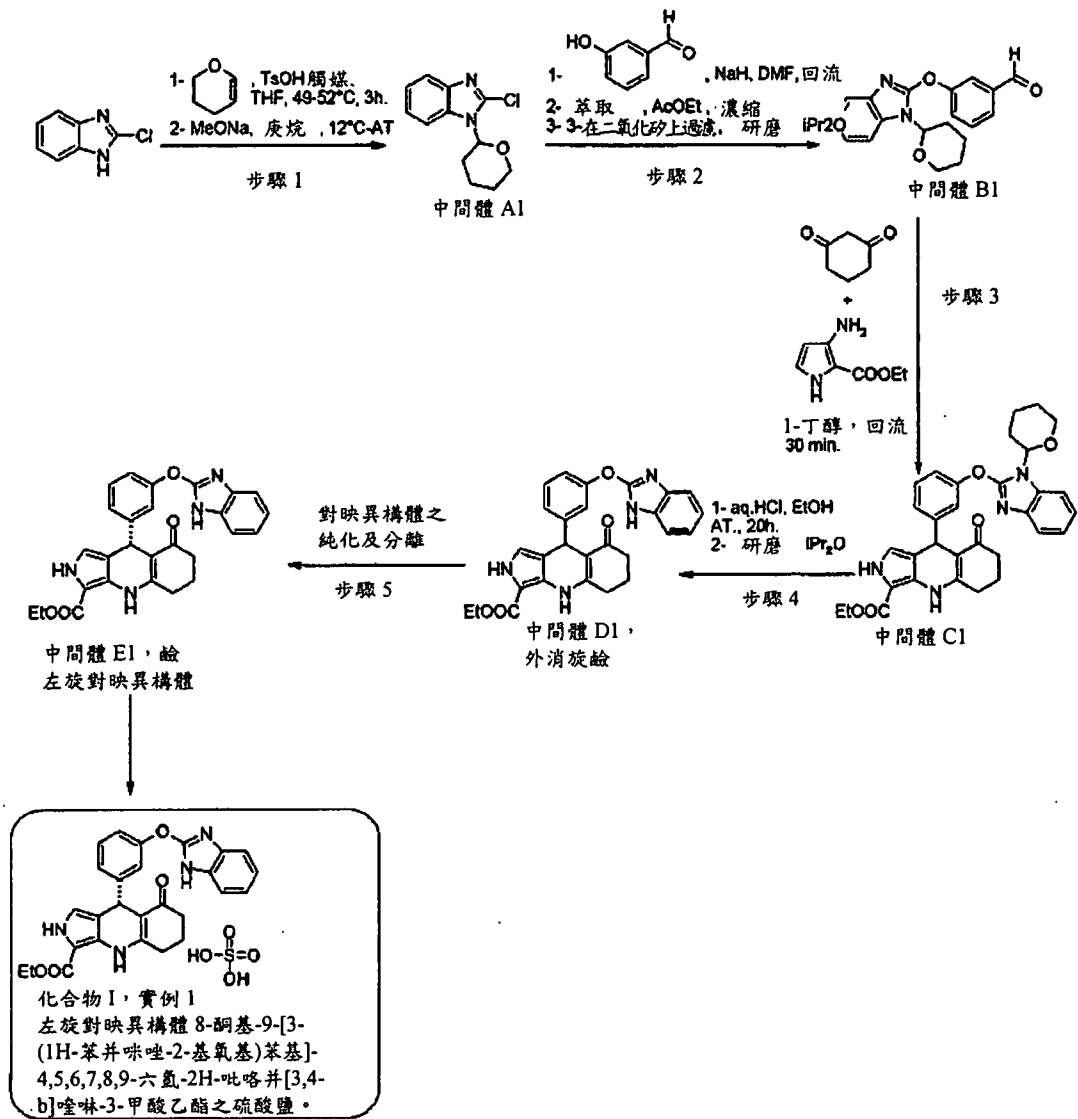
實例 8：用於靜脈內投與之具有 5 mg/ml 自 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(實例 1，化合物 I)形成之(活性產物)的呈膠束溶液形式之調配物

向圓底燒瓶中相繼裝入 300 mg 抗壞血酸及 8 ml 5% 葡萄糖(G5)。攪拌懸浮液直至獲得溶液，且然後添加 250 μ l 乙醇及 750 mg 聚山梨醇酯 80 或 Solutol HS15 (BASF)。攪拌混合物直至完全均質，且然後添加 60 mg 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(實例 1，化合物 I)。將混合物攪拌 30 分鐘直至發生溶解。然後添加 250 μ l 1N NaOH 以調節 pH 至 3。最後，藉由添加 G5 將體積補足至 10 ml。

必須在非光化玻璃中包裝以供儲存。對於 Solutol 調配物，實施在 5°C 下避光三個月之穩定性程式；藉由 HPLC 分析未發現氧化產物 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-5,6,7,8-四氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯(實例 3)顯著增加。

本發明亦提供用於製備如上文所定義之結晶硫酸鹽及共晶體及調配物之方法。

因此，本發明提供用於製備如技術方案 1 至 6 中所定義之化合物 I 或 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽之方法，如以下方案 1 中所定義：



- 因此，本發明提供用於製備如上文所定義之化合物 II 之方法，其特徵在於：
- 或者在乙醇存在下將 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與 L-蘋果酸一起研磨，
 - 或在乙醇存在下將 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與 L-蘋果酸一起研磨，且將所得固體懸浮於乙酸乙酯中，
 - 或將 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-

4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之乙醇溶液與L-蘋果酸之乙醇溶液混合，然後用8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體引發結晶，且然後添加乙酸乙酯。

因此，本發明提供用於製備如上文所定義之調配物之方法，其特徵在於：

- 引入8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體、聚山梨醇酯80(吐溫80)及乙醇且攪拌，且然後添加含有抗壞血酸之葡萄糖水溶液且然後將混合物之pH調節至3，

- 或相繼引入抗壞血酸及5%葡萄糖且攪拌，然後添加乙醇及聚山梨醇酯80或Solutol，攪拌混合物且添加8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(化合物I)，且攪拌混合物並添加1 N NaOH以調節pH至3。

本發明中闡述為本發明標的物之硫酸鹽、其結晶型及調配物之製備實例。

在下文中，當未闡述原料及反應物之製備時，該等原料及反應物可自市場購得或已闡述於文獻中，或者可根據闡述於文獻中或為熟習此項技術者所習知之方法來製備。

出人意料地，實際上，已顯示式(F)之化合物之硫酸鹽及與L-蘋果酸之共晶體具有相對於呈鹼形式之同一化合物

進一步提高之穩定性及可溶性性質。

最後，如藉由實例5中所述之分析所示，硫酸鹽及與L-蘋果酸之共晶體比呈游離鹼形式之式(F)之化合物更易溶。

亦已顯示，式(F)之化合物之硫酸鹽形式及與L-蘋果酸之共晶體具有相對於此同一化合物之其他鹽形式(鹽酸鹽、磷酸鹽、對甲苯磺酸鹽、萘-1,5-二磺酸鹽，所有皆以非晶型形式獲得)提高之溫度穩定性性質。

自該等分析顯而易見的是，式(F)之化合物之硫酸鹽及與L-蘋果酸之共晶體展現優於呈鹼或鹽酸鹽、磷酸鹽、對甲苯磺酸鹽或萘-1,5-二磺酸鹽形式之式(F)之化合物之可溶性性質及穩定性性質二者，且此使其特別極其適於製造藥物。

呈硫酸鹽或L-蘋果酸共晶體形式之式(F)之化合物之物理化學性質亦允許其在通常條件下保存，而無需過度繁重的與光、溫度及濕度之存在相關之預防工作。

已顯示，呈膠束溶液形式之調配物適於靜脈內投與式(F)之化合物，允許式(F)之化合物穩定數周至數月，且當此溶液係自式(F)之化合物之硫酸鹽形式製造時甚至更穩定。

本發明之硫酸鹽化合物I係抗癌劑。本發明之共晶體化合物II係抗癌劑。此同樣適用於本發明之調配物。

在此方面，本發明之化合物I、II及調配物可用於製備藥物、尤其欲用於治療癌症(尤其下文所提及之彼等癌症)之

藥物。

因此，在本發明之另一態樣中，其提供包括上文所定義之硫酸鹽、共晶體或調配物之藥物。該等藥物在治療上使用，特別用於治療癌症，尤其下文所提及之彼等癌症。

因此，本發明之另一目標係硫酸鹽用以製備欲用於治療下文所提及癌症之藥物之用途。

根據本發明之另一態樣，其係關於包括硫酸鹽作為活性要素之醫藥組合物。該等醫藥組合物包含有效劑量之硫酸鹽以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。根據期望醫藥形式及期望投與途徑，該等賦形劑選自熟習此項技術者所習知之常用賦形劑。

因此，本發明擴展至包括至少一種如上文所定義之藥物作為活性要素之醫藥組合物。

本發明之此等醫藥組合物可進一步包括(若適宜)其他抗有絲分裂藥物(更特定而言，例如彼等基於紫杉醇、順鉑、DNA嵌入劑及其他之藥物)之活性要素。

該等醫藥組合物可經口投與，非經腸投與或藉由局部施用至皮膚及黏膜來局部投與，或藉由靜脈內或肌內注射投與。

該等組合物可係固體或液體且可採用任何常用於人類醫學之醫藥形式，例如，素錠或膜包被錠劑、丸劑、菱形錠劑、凝膠膠囊、滴劑、粒劑、可注射製劑、軟膏、乳霜或凝膠；其皆係根據通常方法來製備。在該等製劑中，活性要素可納入該等醫藥組合物通常所採用之賦形劑中，例如

滑石、阿拉伯樹膠、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、可可豆油、水性或非水性媒劑、動物或植物源脂肪、石蠟衍生物、二元醇、各種潤濕劑、分散劑或乳化劑及防腐劑。

通常劑量可根據所用產物、所治療之個體及所討論之病況而變化，其可係(例如)成人每天0.05 g至5 g，或較佳每天0.1 g至2 g。

因此，本發明提供藥物，其特徵在於其包括呈8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽形式之如上文所定義之化合物I。

因此，本發明提供藥物，其特徵在於其包括呈8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體形式之如上文所定義之化合物II。

因此，本發明提供藥物，其特徵在於其包括如上文所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物。

本發明進一步提供醫藥組合物，其特徵在於其包括如上文所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽作為活性要素以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。

本發明進一步提供醫藥組合物，其特徵在於其包括如上

文所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體作為活性要素以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。

本發明進一步提供醫藥組合物，其特徵在於其包括如上文所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物作為活性要素以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。

本發明另外提供如上文所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽用以製備欲用於治療癌症之藥物之用途。

本發明另外提供如上文所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體用以製備欲用於治療癌症之藥物之用途。

本發明另外提供如上文所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物用以製備欲用於治療癌症之藥物之用途。

特定而言，此類藥物可欲用於治療或預防哺乳動物之疾病。

特定而言，本發明提供如上文所定義之化合物I或II或調配物用以製備欲用於預防或治療與不受控增生相關之疾病

之藥物的用途。

更特定而言，本發明提供如上文所定義之化合物I或II或調配物用以製備欲用於治療或預防選自以下群之疾病之藥物的用途：血管增生病症、纖維變性病症、腎小球膜細胞增生病症、代謝病症、過敏症、氣喘、血栓症、神經系統疾病、視網膜病變、牛皮癬、類風濕性關節炎、糖尿病、肌變性、細菌感染(尤其由單核細胞增生性利斯特菌(*Listeria monocytogenes*)造成之細菌感染)及癌症。

因此，極特定而言，本發明提供如上文所定義之化合物I或II或調配物用以製備欲用於治療或預防腫瘤疾病且特別欲用於治療癌症之藥物的用途。

在該等癌症中，焦點係治療實體或液體腫瘤及治療抗細胞毒性劑之癌症。

本發明所述之產物特定而言可用於治療原發性腫瘤及/或轉移瘤，更特定而言用於治療胃癌、肝癌、腎癌、卵巢癌、結腸癌、前列腺癌及肺癌(NSCLC及SCLC)、神經膠母細胞瘤、甲狀腺癌、膀胱癌及乳癌、黑色素瘤、淋巴或骨髓造血腫瘤、肉瘤、腦癌、喉癌及淋巴系統癌、及骨癌及胰腺癌。

本發明亦提供如上文所定義之化合物I或II或調配物用以製備欲用於癌症之化學療法之藥物的用途。

此類欲用於癌症之化學療法之藥物可單獨或組合使用。

本申請案之產物特定而言可單獨投與或與化學療法或放射療法組合或者與(例如)其他治療劑組合投與。

此等治療劑可係常用抗腫瘤劑。

激酶抑制劑包含丁內酯、夫拉平度(flavopiridol)及稱為奧羅莫星(olomoucine)之2(2-羥基乙胺基)-6-苄基胺基-9-甲基嘌呤。

本發明進一步提供如上文實例之製備中所定義之式A1、B1、C1、D1及E1之合成中間體作為新工業產品。

在經口、舌下、皮下、肌內、靜脈內、外敷、局部、氣管內、鼻內、經皮或直腸投與之本發明醫藥組合物中，硫酸鹽可以單元投與形式作為與習用醫藥賦形劑之混合物投與動物及人類用於預防或治療以上病症或疾病。

適宜單元投與形式包含經口投與形式(例如錠劑、軟質或硬質凝膠膠囊、粉末、粒劑及口服溶液或懸浮液)及舌下、含服、氣管內、眼內及鼻內投與形式、經吸入投與之形式、外敷、經皮、皮下、肌內或靜脈內投與形式、直腸投與形式及植入物。對於外敷施用而言，本發明化合物可以乳霜、凝膠、軟膏或洗劑形式使用。

端視調配物，該等單元形式經給藥以允許每日投與0.01 mg至20 mg活性要素/kg體重。

可存在更高或更低劑量亦適宜之特殊情形；此等劑量未超出本發明之範圍。根據通常實踐，適於每一患者之劑量係由內科醫師根據投與途徑及該患者之體重及反應來確定。

在另一態樣中，本發明亦係關於用於治療上文所指明病狀之方法，其包括投與患者有效劑量之硫酸鹽。

【圖式簡單說明】

圖1顯示所記錄之化合物I之繞射圖。

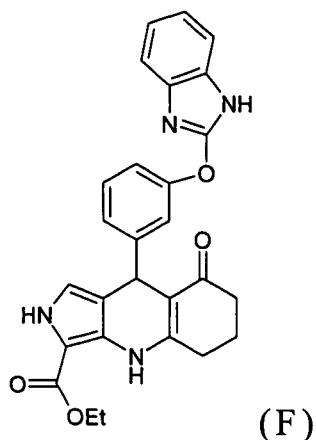
圖2顯示所記錄之化合物II之繞射圖。

圖3顯示所記錄之在50°C/環境濕度(HN)、50°C/80%相對濕度(HR)、80°C/環境濕度(HN)及80°C/80%相對濕度(HR)之條件下儲存14天之化合物I之等分試樣的粉末X射線繞射圖，與所記錄之化合物I原樣之繞射圖進行比較。

圖4顯示所記錄之在50°C/環境濕度(HN)、50°C/80%相對濕度(HR)、80°C/環境濕度(HN)及80°C/80%相對濕度(HR)之條件下儲存14天之化合物II之等分試樣的粉末X射線繞射圖，與所記錄之化合物II原樣之繞射圖進行比較。

七、申請專利範圍：

1. 一種化合物 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯或下式(F)之化合物F，



此化合物F呈以下形式：

該化合物F之硫酸鹽化合物I，

或該式(F)之產物之共晶體化合物II

或調配物，其包括如上文所定義之該式(F)之化合物或該式(F)之產物之該硫酸鹽化合物I或該式(F)之產物之該共晶體化合物II。

2. 如請求項1之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽。
3. 如請求項1或2之化合物I，或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其中其係呈結晶型。
4. 如請求項1至3之化合物I，或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-

3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其具有如下表4-1中所定義之X射線繞射圖：

表4-1：化合物I之X射線繞射圖

2θ (°)	d (Å)	強度
7.215	12.24212	66.3
10.804	8.18214	8.5
11.059	7.99377	19.7
11.75	7.52565	27.3
14.483	6.1109	41.3
15.497	5.71331	11.8
17.247	5.13736	9.4
18.135	4.8877	40
18.734	4.73293	15.5
19.354	4.58267	26.6
19.961	4.44456	11.3
20.403	4.34919	11.6
21.727	4.08704	11.6
22.249	3.99249	100
23.686	3.75334	21.4
24.201	3.67469	14
24.937	3.56777	57.7
25.42	3.50113	26.4
26.681	3.3384	13.1
28.34	3.14666	14.4
31.321	2.85359	14.2

- 如請求項1至3之化合物I，或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽，其中其熔點係242-244°C。
- 如請求項1之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲

酸乙酯之共晶體。

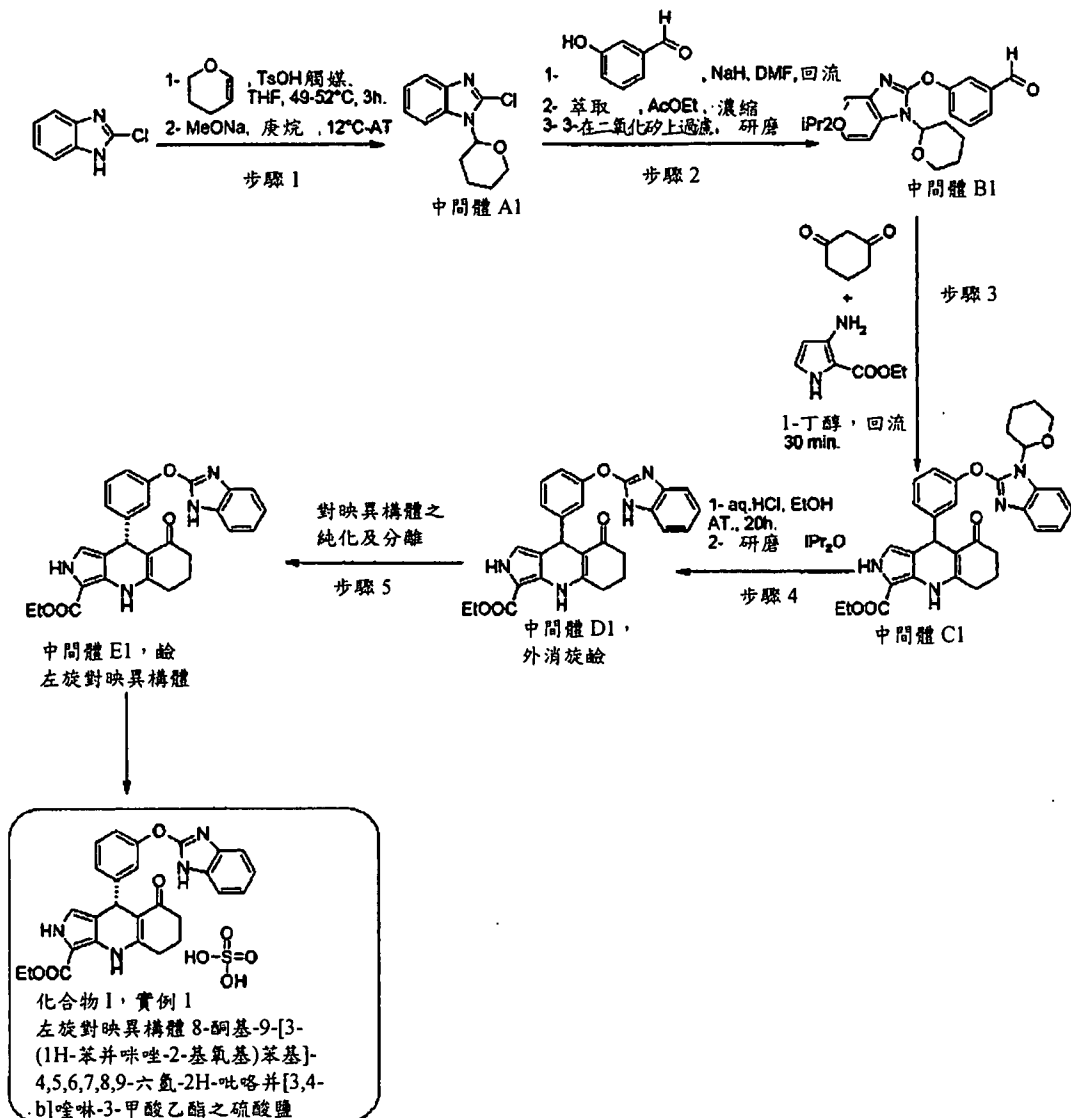
7. 如請求項 1 或 6 之化合物 II 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體，其中其係與 L-蘋果酸之共晶體。
8. 如請求項 1 或 6 至 7 之化合物 II 或 8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯與 L-蘋果酸之共晶體，其具有如下表 4-2 中所定義之 X 射線繞射圖：

表 4-2：所記錄之化合物 II(共晶體)之 X 射線繞射圖

2θ (°)	d (Å)	強度
4.797	18.40588	14.9
11.476	7.7043	33.2
11.848	7.46367	15.1
12.7	6.96481	13.2
14.232	6.21834	7.4
14.837	5.96602	12.8
15.825	5.59552	11.6
17.086	5.18542	33.2
18.589	4.76942	20
18.966	4.67532	35.9
19.444	4.56146	18.1
20.209	4.39061	100
21.094	4.20842	48.3
21.539	4.12238	29.7
22.119	4.01562	87.3
23.121	3.84384	19.9
25.001	3.5588	35.6
26.139	3.40638	43.6
29.326	3.0431	35.1

9. 如請求項1之調配物，其中其包括如以上該等請求項中所定義之該式(F)之化合物或該式(F)之產物之該硫酸鹽化合物I或該式(F)之產物之該共晶體化合物II。
10. 一種用於製備如請求項1至5中所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽之方法，其如以下方案1中所定義：

方案1



11. 一種用於製備如請求項1及6至8中所定義之化合物II之

方法，其特徵在於：

或者在乙醇存在下將8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸一起研磨，

或在乙醇存在下將該8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸一起研磨，且將所得固體懸浮於乙酸乙酯中，

或將該8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之乙醇溶液與L-蘋果酸之乙醇溶液混合，然後用該8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體與L-蘋果酸之共晶體引發結晶，且然後添加乙酸乙酯。

12. 一種用於製備如請求項1及9中所定義之調配物之方法，其特徵在於：

引入8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體、聚山梨醇酯80(吐溫80 (Tween 80))及乙醇且攪拌，且然後添加含有抗壞血酸之葡萄糖水溶液且然後將混合物之pH調節至3，

或相繼引入抗壞血酸及5%葡萄糖且攪拌，然後添加乙醇及聚山梨醇酯80或Solutol，攪拌混合物且添加該8-

酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之左旋對映異構體之硫酸鹽(化合物I)，且攪拌該混合物並添加1 N NaOH以調節pH至3。

13. 一種藥物，其特徵在於其包括如請求項1至5中所定義之呈8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽形式之化合物I。
14. 一種藥物，其特徵在於其包括如請求項1及6至8中所定義之呈8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體形式之化合物II。
15. 一種藥物，其特徵在於其包括如請求項1及9中所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物。
16. 一種醫藥組合物，其特徵在於其包括如請求項1至5中所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之硫酸鹽作為活性要素以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。
17. 一種醫藥組合物，其特徵在於其包括如請求項1及6至8中所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體作為活性要素以及至少一種醫藥上可接

受之賦形劑。

18. 一種醫藥組合物，其特徵在於其包括如請求項1至9中所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物作為活性要素以及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。
19. 一種如請求項1至5中所定義之化合物I或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之鹽之用途，其用以製備欲用於治療癌症之藥物。
20. 一種如請求項1及6至8中所定義之化合物II或8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之共晶體之用途，其用以製備欲用於治療癌症之藥物。
21. 一種如請求項1及9中所定義之8-酮基-9-[3-(1H-苯并咪唑-2-基氧基)苯基]-4,5,6,7,8,9-六氫-2H-吡咯并[3,4-b]喹啉-3-甲酸乙酯之調配物之用途，其用以製備欲用於治療癌症之藥物。

八、圖式：

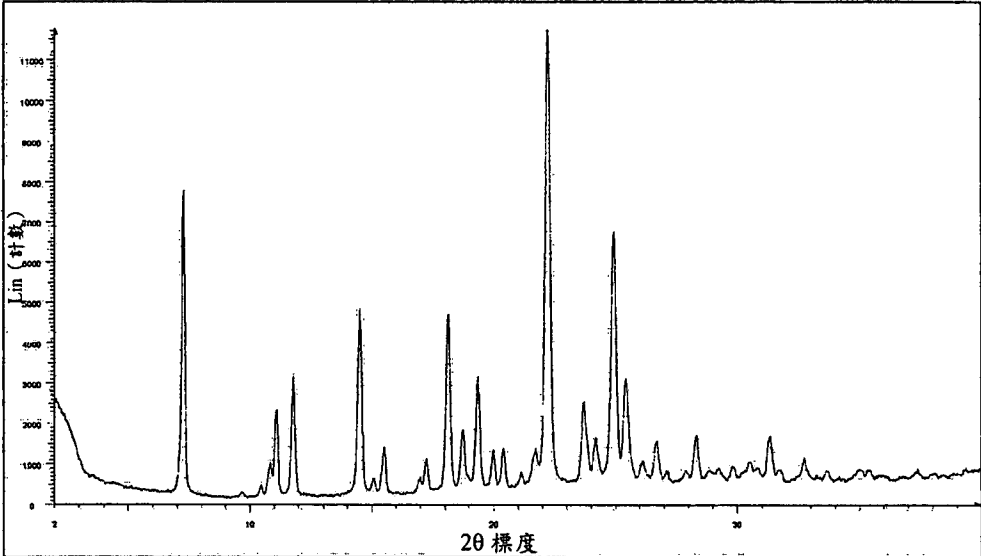


圖 1

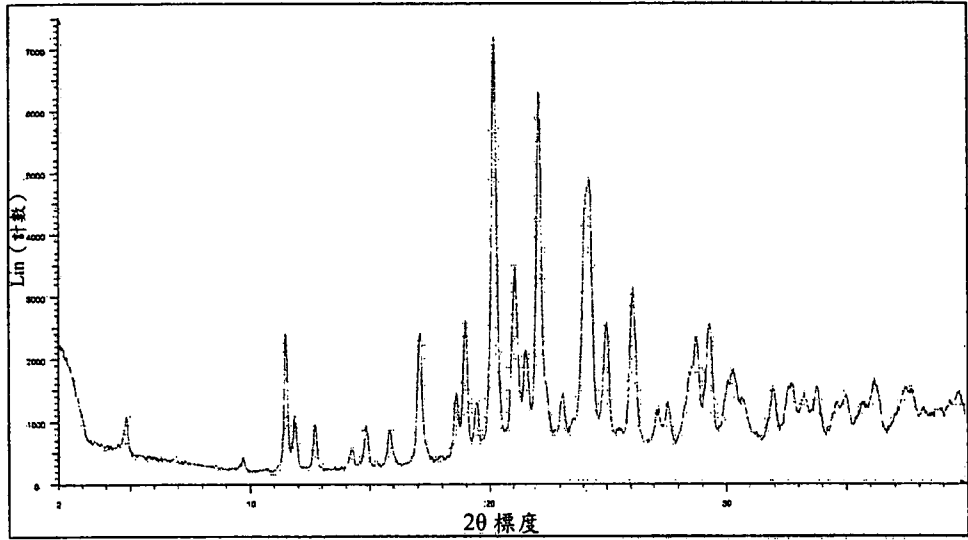


圖 2

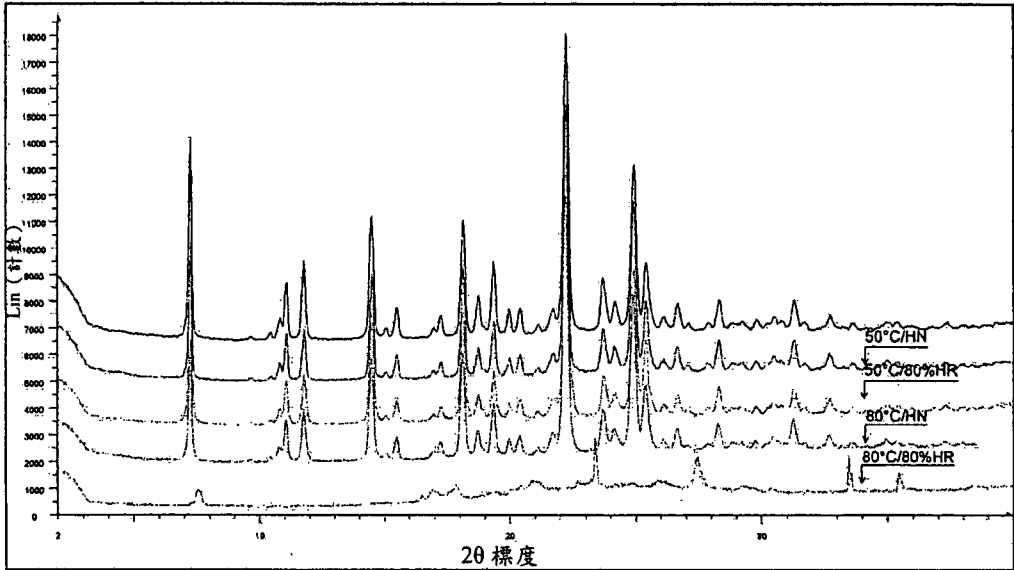


圖 3

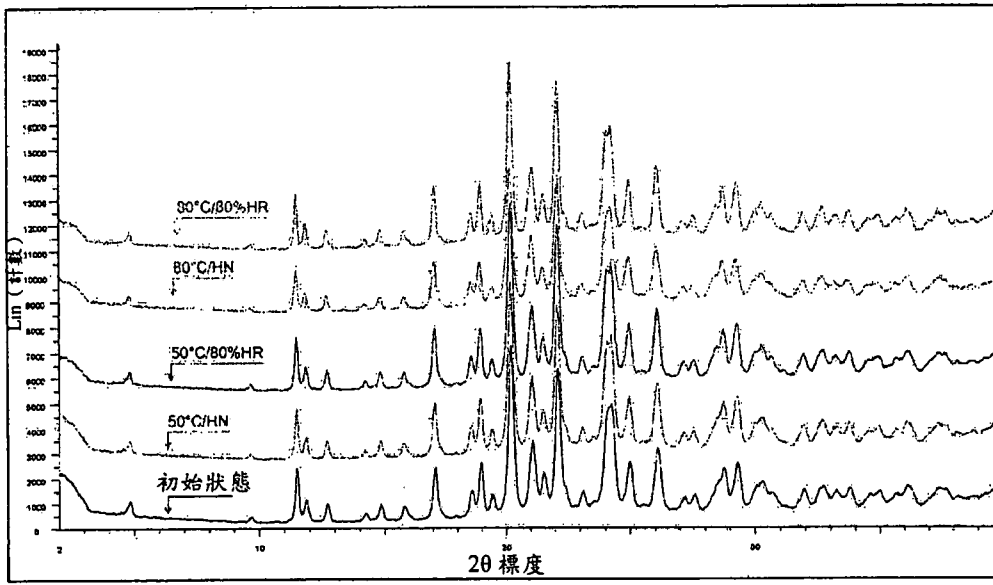


圖 4