



- (21)申請案號：098130412 (22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 09 日
- (51)Int. Cl. : C07D417/14 (2006.01) A61K31/506 (2006.01)  
 A61K31/427 (2006.01) A61K31/4427(2006.01)  
 A61P35/00 (2006.01)
- (30)優先權：2008/09/10 歐洲專利局 08164104.5  
 2008/09/12 美國 61/096,674
- (71)申請人：諾華公司(瑞士)NOVARTIS AG (CH)  
 瑞士
- (72)發明人：費爾赫斯特 羅賓 艾萊克 FAIRHURST, ROBIN ALEC (GB)；甘那諾 維多  
 GUAGNANO, VITO (IT)；艾巴哈 派翠西亞 IMBACH, PATRICIA (CH)；卡羅維  
 堤 喬治歐 CARAVATTI, GIORGIO (CH)；弗瑞 帕斯卡 FURET, PASCAL (FR)
- (74)代理人：陳長文
- (56)參考文獻：  
 CN 1838953A WO 2004/096797A1
- 審查人員：林美君
- 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：0 共 0 頁

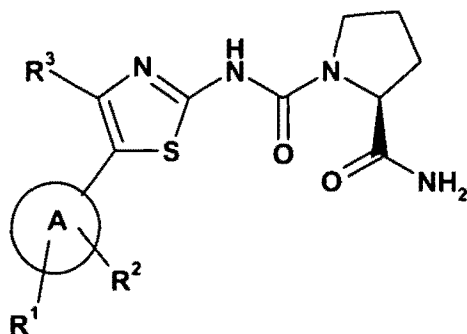
## (54)名稱

2-甲醯胺環胺基脲衍生物、其醫藥組合物及用途

2-CARBOXAMIDE CYCLOAMINO UREA, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND USE THEREOF

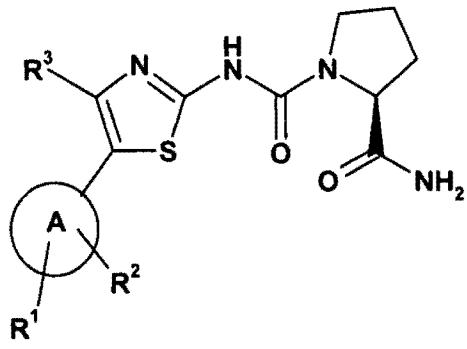
## (57)摘要

本發明係關於一種式(I)化合物：



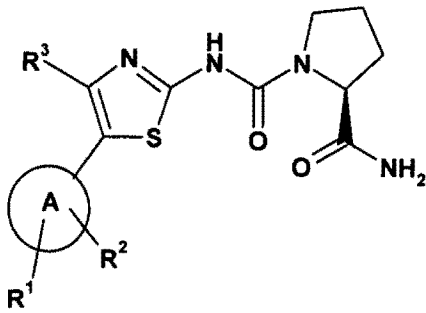
或其鹽，其中取代基如本說明書中所定義，該等化合物之組合物，及該等化合物於治療藉由抑制磷脂醯肌醇 3-激酶而改善之疾病的用途。

The present invention relates to a compound of formula (I)



(I)

or a salt thereof, wherein the substituents are as defined in the description, to compositions and use of the compounds in the treatment of diseases ameliorated by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase.



(I)

## 發明專利說明書

中文說明書替換頁(103年6月)

(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：098130412

C07D 417/14 (2006.01)

※ 申請日：98年9月9日

A61K 31/506 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 31/427 (2006.01)

A61K 31/447 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

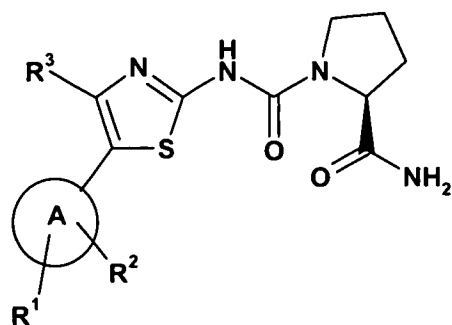
A61P 35/00 (2006.01)

2-甲醯胺環胺基脲衍生物、其醫藥組合物及用途

2-CARBOXAMIDE CYCLOAMINO UREA, PHARMACEUTICAL  
COMPOSITIONS AND USE THEREOF

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於一種式(I)化合物：

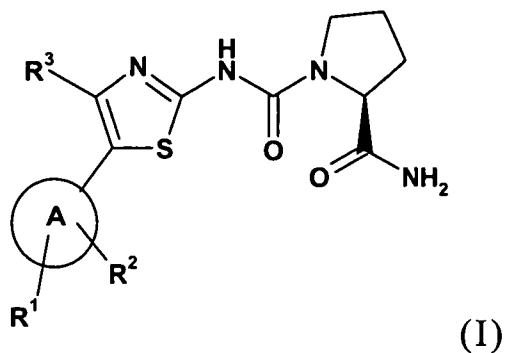


(I)

或其鹽，其中取代基如本說明書中所定義，該等化合物之組合物，及該等化合物於治療藉由抑制磷脂醯肌醇3-激酶而改善之疾病的用途。

## 三、英文發明摘要：

The present invention relates to a compound of formula (I)



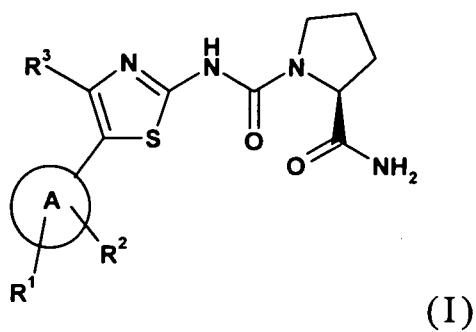
or a salt thereof, wherein the substituents are as defined in the description, to compositions and use of the compounds in the treatment of diseases ameliorated by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase.

## 四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

## 五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於作為新穎 $\alpha$ 選擇性磷脂醯肌醇(PI)3-激酶抑制劑化合物之特定2-甲醯胺環胺基脲衍生物、其醫藥學上可接受之鹽、其前藥及其製備方法。本發明亦係關於此等化合物單獨或與至少一種其他治療劑組合及視情況與醫藥學上可接受之載劑組合的組合物。本發明進一步係關於單獨或與至少一種其他治療劑組合使用此等化合物治療許多疾病之方法，詳言之，該等疾病為由一或多種生長因子、受體酪胺酸激酶、蛋白質絲胺酸/海洛因激酶、G蛋白偶合受體及磷脂激酶及磷酸酶異常活性介導之疾病。

### 【先前技術】

磷脂醯肌醇3-激酶(PI3K)包含催化磷酸轉移至肌醇脂質之D-3'位以產生磷酸肌醇-3-磷酸(PIP)、磷酸肌醇-3,4-二磷酸(PIP<sub>2</sub>)及磷酸肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP<sub>3</sub>)之脂質激酶家族，PIP、PIP<sub>2</sub>及PIP<sub>3</sub>繼而藉由使含有普列克同源域(pleckstrin-homology domain)、FYVE域、Phox域及其他磷脂結合域之蛋白質對接至多種通常處於質膜上之信號傳導複合物中而在信號傳導級聯中充當第二信使(Vanhaesebroeck等人，*Annu. Rev. Biochem* 70:535 (2001)；Katso等人，*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615 (2001))。在兩種1類PI3K中，1A類PI3K為由與調節次單元p85 $\alpha$ 、p55 $\alpha$ 、p50 $\alpha$ 、p85 $\beta$ 或p55 $\gamma$ 組成性締合之催化p110次單元( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 同功異型物)構成的異源二聚體。1B類子類具有一個家族成員，亦即，由與兩個



調節次單元p101或p84之一締合之催化p110 $\gamma$ 次單元構成的異源二聚體 (Fruman等人, *Annu. Rev. Biochem.* 67:481 (1998); Suire等人, *Curr. Biol.* 15:566 (2005))。p85/55/50次單元之模組域包括結合活化受體及細胞質酪胺酸激酶上之特定序列範圍中之磷酸酪胺酸殘基, 進而活化及定位1A類PI3K的Src同源(SH2)域。1B類PI3K係由結合不同肽配位體及非肽配位體庫的G蛋白偶合受體直接活化(Stephens等人, *Cell* 89:105 (1997); Katso等人, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615-675 (2001))。因此, 1類PI3K之所得磷脂產物將上游受體與下游細胞活性聯繫在一起, 該等細胞活性包括增殖、存活、趨化性、細胞轉運(cellular trafficking)、活動性、代謝、發炎及過敏反應、轉錄及轉譯(Cantley等人, *Cell* 64:281 (1991); Escobedo及Williams, *Nature* 335:85 (1988); Fantl等人, *Cell* 69:413 (1992))。

在許多狀況下, PIP2及PIP3將病毒致癌基因v-Akt之人類同源產物Akt募集至質膜, 在該質膜中其充當許多對生長及存活而言重要的細胞內信號傳導路徑之節點(Fantl等人, *Cell* 69:413-423(1992); Bader等人, *Nature Rev. Cancer* 5:921 (2005); Vivanco及Sawyer, *Nature Rev. Cancer* 2:489 (2002))。通常經由Akt活化而增加存活之PI3K異常調節為人類癌症中最普遍之事件之一, 且已顯示該異常調節以多級發生。在多種腫瘤中, 使磷酸肌醇之肌醇環之3'位去磷酸化且從而拮抗PI3K活性的腫瘤抑制基因PTEN功能上缺失。在其他腫瘤中, p110 $\alpha$ 同功異型物

*PIK3CA*之基因及 *Akt*之基因得以擴增且已在若干人類癌症中證實其基因產物之蛋白質表現增加。此外，已在人類癌症中描述用以上調p85-p110複合物之p85 $\alpha$ 突變及移位。最後，已在眾多不同人類癌症中相當頻繁地描述活化下游信號傳導路徑的 *PIK3CA*中之體細胞誤義突變(Kang等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:802 (2005)；Samuels等人，*Science* 304:554 (2004)；Samuels等人，*Cancer Cell* 7:561-573 (2005))。此等觀測結果顯示磷酸肌醇-3激酶及此信號傳導路徑之上游及下游組件的調節異常為與人類癌症及增生性疾病相關之最常見調節異常之一(Parsons等人，*Nature* 436:792 (2005)；Hennessey等人，*Nature Rev. Drug Disc.* 4:988-1004 (2005))。

鑒於上述，PI3K $\alpha$ 抑制劑應尤其有益於治療增生性疾病及其他病症。

WO 2004/096797揭示作為PI3K $\gamma$ 抑制劑之某些噻唑衍生物及其醫藥用途，尤其治療發炎性及過敏性病狀之醫藥用途。

WO 2005/021519亦揭示作為PI3K $\gamma$ 抑制劑之某些噻唑衍生物及其醫藥用途，尤其治療發炎性及過敏性病狀之醫藥用途。

WO 2006/051270亦揭示作為PI3K $\alpha$ 抑制劑之某些噻唑衍生物及其醫藥用途，尤其歸因於抗腫瘤活性之醫藥用途。

WO 2007/129044亦揭示作為PI3K $\alpha$ 抑制劑之某些噻唑衍生物及其醫藥用途，尤其歸因於抗腫瘤活性之醫藥用途。





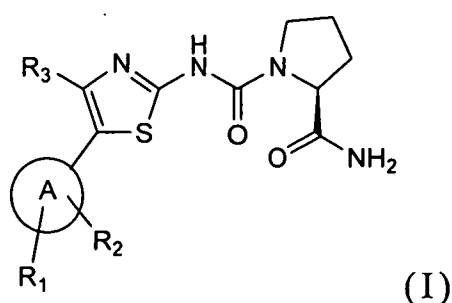
鑒於先前技術，需要提供適於治療增生性疾病之其他化合物，尤其提供具有改良之選擇性及/或較高/改良之活性的化合物。

### 【發明內容】

現已發現以下所給式(I)之2-甲醯胺環胺基脲衍生物具有有利藥理學特性且抑制例如PI3K(磷脂醯肌醇3-激酶)。詳言之，此等化合物較佳顯示對PI3K $\alpha$ 之選擇性相對於 $\beta$ 及/或 $\delta$ 及/或 $\gamma$ 亞型有所改良。因此，式I化合物適用於例如治療依賴於PI3激酶之疾病(詳言之PI3K $\alpha$ ，諸如顯示PI3K $\alpha$ 過度表現或擴增、PIK3CA體細胞突變或PTEN生殖系突變或體細胞突變或用以上調p85-p110複合物之p85 $\alpha$ 突變及移位的疾病)、尤其諸如腫瘤疾病及白血病之增生性疾病。

另外，此等化合物較佳顯示代謝穩定性改良且由此清除率降低，從而使得藥物動力學概括改良。

在第一態樣中，本發明提供式(I)化合物：



或其鹽，其中：

A表示雜芳基；

R<sup>1</sup> 表示(1)視情況經取代之烷基；(2)視情況經取代之環烷基；(3)視情況經取代之芳基；(4)視情況經取代之胺；(5)視情況經取代之磺醯基；(6)鹵基；

$R^2$  表示氫、氬或對於 $R^1$ 所定義之取代基；

$R^3$  表示氫、鹵基、視情況經取代之烷基；

(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(第三丁基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)除外。

參考包括以下術語彙編及總結性實例之以下描述可更充分理解本發明。為簡潔起見，本說明書中所引用之公開案的揭示內容以引用的方式併入本文中。如本文所用之術語「包括」、「含有」及「包含」在本文中以其開放式非限制性含義使用。

本文中所給之任一式意欲表示具有該結構式所示之結構的化合物以及某些變化或形式。詳言之，本文中所給之任一式的化合物可具有不對稱中心且因此以不同對映異構形式存在。若式(I)化合物中存在至少一個不對稱碳原子，則此類化合物可以光學活性形式存在或以光學異構體之混合物形式，例如以外消旋混合物形式存在。所有光學異構體及其混合物(包括外消旋混合物)為本發明之一部分。因此，本文中所給之任一給出式意欲表示外消旋體、一或多種對映異構形式、一或多種非對映異構形式、一或多種滯轉異構形式及其混合物。此外，某些結構可以幾何異構體(亦即順式及反式異構體)形式、互變異構體形式或滯轉異構體形式存在。

本文中所給之任一式意欲表示該等化合物之水合物、溶劑合物及多晶型物及其混合物。

本文中所給之任一式亦意欲表示該等化合物之未標記形



式以及經同位素標記形式。除一或多個原子經具有所選原子質量或質量數之原子置換以外，經同位素標記化合物具有本文中所給之式所示的結構。可併入本發明化合物中之同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟及碘之同位素，分別諸如 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{125}\text{I}$ 。本發明包括如本文所定義之各種經同位素標記化合物，例如存在諸如 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 及 $^{14}\text{C}$ 之放射性同位素的化合物。該等經同位素標記化合物適用於代謝研究(較佳使用 $^{14}\text{C}$ )；反應動力學研究(使用例如 $^2\text{H}$ 或 $^3\text{H}$ )；偵測或成像技術，諸如包括藥物或受質組織分布檢定之正電子發射斷層攝影術(PET)或單光子發射電腦斷層攝影術(SPECT)；或患者之放射性治療。詳言之， $^{18}\text{F}$ 或經標記化合物對PET或SPECT研究尤其較佳。一般可藉由以易於得到之經同位素標記試劑替代未經同位素標記試劑進行下文所述之流程或實例及製備中所揭示之程序來製備本發明之經同位素標記化合物及其前藥。

另外，以較重同位素、尤其氘(亦即 $^2\text{H}$ 或D)取代可因較高代謝穩定性而提供某些治療優勢，例如活體內半衰期增加或劑量需求減少或治療指數改良。應瞭解，氘在此情形中視為式(I)化合物之取代基。可由同位素濃化因素(enrichment factor)定義此類較重同位素、尤其氘之濃度。如本文所用之術語「同位素濃化因素」意謂指定同位素之同位素豐度與天然豐度之間的比率。若本發明化合物之取代基由氘表示，則該化合物對各指定氘原子之同位素濃化

因素為至少 3500(在各指定氘原子處併有 52.5% 氘)、至少 4000(併有 60% 氘)、至少 4500(併有 67.5% 氘)、至少 5000(併有 75% 氘)、至少 5500(併有 82.5% 氘)、至少 6000(併有 90% 氘)、至少 6333.3(併有 95% 氘)、至少 6466.7(併有 97% 氘)、至少 6600(併有 99% 氘)或至少 6633.3(併有 99.5% 氘)。在本發明之化合物中，未特別指定為特定同位素之任一原子意欲表示彼原子之任一穩定同位素。除非另有說明，否則當某一位置特別指定為「H」或「氫」時，該位置應理解為具有天然豐度同位素組成之氫。因此，在本發明之化合物中，例如在以上所給之範圍內，特別指定為氘(D)之任一原子意欲表示氘。

當提及本文中所給之任一式時，自指定代號之可能物質之列表選擇特定部分並不意欲定義他處出現的該代號之部分。換言之，若代號出現一次以上，則自指定列表選擇物質與在該式中他處選擇相同代號之物質無關(其中在上文或下文實施例中表徵為較佳之一或多個、至多所有更通用表達可以更具體定義替代，由此分別產生本發明之更佳實施例)。

在使用複數形式(例如化合物、鹽)時，此包括單數(例如單一化合物、單一鹽)。「一種化合物」並不排除(例如在醫藥調配物中)一種以上式(I)化合物(或其鹽)存在。

除非另有規定，否則以下通用定義應適用於本說明書：

鹵素(或鹵基)表示氟、溴、氯或碘，尤其氟、氯。經鹵素取代之基團及部分，諸如經鹵素取代之烷基(鹵烷基)可



經單鹵化、多鹵化或全鹵化。

雜原子為除碳及氫以外之原子，較佳為氮(N)、氧(O)或硫(S)，尤其氮。

含碳基團、部分或分子含有1至7個、較佳1至6個、更佳1至4個、最佳1或2個碳原子。具有1個以上碳原子之任何非環狀含碳基團或部分為直鏈或分支鏈。

詞首「低碳」或「C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>」表示具有至多7個且包括最多7個、尤其至多4個且包括最多4個碳原子之基團，所述基團為直鏈或具有單一或多個分支之分支鏈。

「烷基」係指直鏈或分支鏈烷基，較佳表示直鏈或分支鏈C<sub>1-12</sub>烷基，尤其較佳表示直鏈或分支鏈C<sub>1-7</sub>烷基；例如甲基、乙基、正丙基或異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基或第三丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一基、正十二基，尤其較佳為甲基、乙基、正丙基、異丙基及正丁基及異丁基。烷基可未經取代或經取代。例示性取代基包括(但不限於)氘、羥基、烷氧基、鹵基及胺基。經取代烷基之一實例為三氟甲基。環烷基亦可為烷基之取代基。此類狀況之一實例為(烷基)-環丙基或烷二基-環丙基部分，例如-CH<sub>2</sub>-環丙基。C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基較佳為具有1個且包括1個至7個且包括7個、較佳1個且包括1個至4個且包括4個碳原子之烷基，且其為直鏈或分支鏈；低碳烷基較佳為丁基，諸如正丁基、第二丁基、異丁基、第三丁基；丙基，諸如正丙基或異丙基；乙基；或較佳為甲基。

如「烷氧基」、「烷氧基烷基」、「烷氧基羰基」、「烷氧

基-羰基烷基」、「烷基磺醯基」、「烷基亞磺醯基 (alkylsulfoxyl)」、「烷基胺基」、「鹵烷基」之其他基團的各烷基部分應具有與上述「烷基」之定義所述相同的含義。

「烷二基」係指經由兩個不同碳原子與部分結合之直鏈或分支鏈烷二基，其較佳表示直鏈或分支鏈 $C_{1-12}$ 烷二基，尤其較佳表示直鏈或分支鏈 $C_{1-6}$ 烷二基；例如甲二基(-CH<sub>2</sub>-)、1,2-乙二基(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)、1,1-乙二基(-CH(CH<sub>3</sub>)-)，1,1-丙二基、1,2-丙二基、1,3-丙二基及1,1-丁二基、1,2-丁二基、1,3-丁二基、1,4-丁二基，尤其較佳為甲二基、1,1-乙二基、1,2-乙二基、1,3-丙二基、1,4-丁二基。

「烯二基」係指經由兩個不同碳原子與分子結合之直鏈或分支鏈烯二基，其較佳表示直鏈或分支鏈 $C_{2-6}$ 烯二基；例如 -CH=CH-、-CH=C(CH<sub>3</sub>)-、-CH=CH-CH<sub>2</sub>-、-C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH<sub>2</sub>-、-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-C(CH<sub>3</sub>)H-、-CH=CH-CH=CH-、-C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH=CH-、-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH=CH-，尤其較佳為 -CH=CH-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-CH=CH-。烯二基可經取代或未經取代。

「環烷基」係指每個碳環具有3至12個環原子之飽和或部分飽和、單環、稠合多環或螺式多環碳環。環烷基之說明性實例包括以下部分：環丙基、環丁基、環戊基及環己基。環烷基可未經取代或經取代；例示性取代基在烷基之定義中提供，且亦包括烷基本身(例如甲基)。如-(CH<sub>3</sub>)環丙基之部分被視為經取代之環烷基。



「芳基」係指具有6個或6個以上碳原子之芳族同素環系統(亦即，僅碳作為成環原子)；芳基較佳為具有6至14個環碳原子、更佳具有6至10個環碳原子之芳族部分，諸如苯基或萘基，較佳為苯基。芳基可未經取代或經一或多個、較佳至多三個、更佳至多兩個獨立地選自由以下組成之群的取代基取代：如下文所述之未經取代或經取代之雜環基，尤其吡咯啉基，諸如N-吡咯啉基、側氧基吡咯啉基(諸如側氧基(N-吡咯啉基))、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基-吡咯啉基、2,5-二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)吡咯啉基(諸如2,5-二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-(N-吡咯啉基))，四氫呋喃基、噻吩基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基吡啶基、吡啶基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基哌啶基、N-哌啶基、經胺基或N-單[低碳烷基、苯基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基及/或苯基-低碳烷基]-胺基或N,N-二[低碳烷基、苯基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基及/或苯基-低碳烷基]-胺基取代之N-哌啶基、未經取代或經N-低碳烷基取代之經由環碳原子結合之哌啶基、N-哌嗪基、低碳烷基(N-哌嗪基)、N-嗎啉基、硫代(N-嗎啉基)、S-側氧基-硫代(N-嗎啉基)或S,S-二側氧基硫代(N-嗎啉基)；C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、N-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷磺醯基-胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、胺甲醯基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、[N-單(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺甲醯基或N,N-二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺甲醯基]-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷亞磺醯基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷磺醯基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、苯基、萘基、單[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、鹵基及/或氰基]-苯基至三[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、鹵基及/或氰基]-苯基或單[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、鹵基及/或氰基]-萘基至三[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、鹵基及/或氰基]-萘

基；C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基、單[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基及/或羥基]-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基至三[C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基及/或羥基]-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基；鹵基、羥基、低碳烷氧基、低碳烷氧基-低碳烷氧基、(低碳烷氧基)-低碳烷氧基-低碳烷氧基、鹵基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷氧基、苯氧基、萘氧基、苯基-低碳烷氧基或萘基-低碳烷氧基；例如，胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷氧基、低碳烷醯氧基、苄醯氧基、萘甲醯氧基、甲醯基(CHO)、胺基、N-單(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺基或N,N-二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基胺基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷磺醯胺基、羧基、低碳烷氧基羧基；苯基-低碳烷氧基羧基或萘基-低碳烷氧基羧基，諸如苄氧基羧基；C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基，諸如乙醯基；苄醯基；萘甲醯基；胺甲醯基；N-單取代胺甲醯基或N,N-二取代胺甲醯基，諸如取代基係選自低碳烷基、(低碳烷氧基)-低碳烷基及羥基-低碳烷基之N-單取代胺甲醯基或N,N-二取代胺甲醯基；甲脞基、胍基、脲基、巰基、低碳烷硫基、苯硫基或萘硫基、苯基-低碳烷硫基或萘基-低碳烷硫基、低碳烷基-苯硫基、低碳烷基-萘硫基、鹵基-低碳烷基巰基、磺酸基(-SO<sub>3</sub>H)、低碳烷磺醯基、苯基-磺醯基或萘基-磺醯基、苯基-低碳烷基磺醯基或萘基-低碳烷基磺醯基、烷基苯基磺醯基、鹵基-低碳烷基磺醯基(諸如三氟甲烷磺醯基)；磺醯胺基、苯磺醯胺基、疊氮基、疊氮基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基(尤其疊氮基甲基)、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷磺醯基、胺磺醯基、N-單(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺磺醯基或N,N-二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基)-胺磺醯基、(N-嗎啉基)磺醯基、硫代(N-嗎啉基)磺醯基、氰基及硝基；其中作為經取代烷基(亦或本文所述之經取代芳





基、雜環基等)之取代基或取代基之一部分的上述各苯基或萘基(以及苯氧基或萘氧基中之苯基或萘基)本身未經取代或經一或多個,例如至多3個、較佳1或2個獨立地選自以下之取代基取代:鹵基、鹵基-低碳烷基(諸如三氟甲基)、羥基、低碳烷氧基、疊氮基、胺基、N-單(低碳烷基及/或C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基)-胺基或N,N-二(低碳烷基及/或C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷醯基)-胺基、硝基、羧基、低碳烷氧基羰基、胺甲醯基、氰基及/或胺磺醯基。

「雜環基」係指不飽和(=在環中帶有最高可能數目之共軛雙鍵)、飽和或部分飽和雜環基且較佳為單環雜環基,或在本發明之較寬泛態樣中為雙環、三環或螺環雜環基;且具有3至24個、更佳4至16個、最佳5至10個且最佳5或6個環原子;其中一或多個、較佳一至四個、尤其一或兩個環原子為雜原子(其餘環原子因而為碳)。鍵結環(亦即,與分子連接之環)較佳具有4至12個、尤其5至7個環原子。術語雜環基亦包括雜芳基。雜環基可未經取代或經一或多個、尤其1至3個獨立地選自由上文對於經取代烷基所定義之取代基組成之群及/或選自一或多個以下取代基的取代基取代:側氧基(=O)、硫羰基(=S)、亞胺基(=NH)、亞胺基-低碳烷基。另外,雜環基尤其為選自由以下組成之群的雜環基:氧呔基、氮雜環丙烯基、氮丙啶基、1,2-氧硫雜環戊烷基、噻吩基、呋喃基、四氫呋喃基、哌喃基、硫代哌喃基、噻噁基、異苯并呋喃基、苯并呋喃基、吡啶基、2H-吡咯基、吡咯基、吡咯啉基、吡咯啶基、咪唑



「治療」包括預防性及治療性處理以及延緩疾病或病症之進程。

「PI3激酶介導之疾病」(尤其PI3K $\alpha$ 介導之疾病或由PI3K $\alpha$ 過度表現或擴增、PIK3CA體細胞突變或PTEN生殖系突變或體細胞突變或用以上調p85-p110複合物之p85 $\alpha$ 突變及移位介導之疾病)尤其為對抑制PI3激酶、尤其抑制PI3K $\alpha$ 或其突變形式以有利方式(例如一或多種症狀改善、疾病發作延緩，直至暫時或完全治癒疾病)作出反應之病症(在待治療之疾病中，可尤其提及諸如腫瘤疾病及白血病之增生性疾病)。

「鹽」(其係由「或其鹽」表示)可單獨存在或以與游離式(I)化合物之混合物形式存在且較佳為醫藥學上可接受之鹽。該等鹽較佳由具有鹼性氮原子之式(I)化合物與有機酸或無機酸以例如酸加成鹽之形式形成，尤其為醫藥學上可接受之鹽。適宜之無機酸為例如氫鹵酸(諸如鹽酸)、硫酸或磷酸。適宜之有機酸為例如羧酸或磺酸，諸如反丁烯二酸或甲烷磺酸。出於分離或純化之目的，亦可能使用醫藥學上不可接受之鹽，例如苦味酸鹽或過氯酸鹽。對於治療用途，僅採用醫藥學上可接受之鹽或游離化合物(適用時，呈醫藥製劑之形式)，且因此此等物質較佳。鑒於呈游離形式之新穎化合物與呈鹽形式之新穎化合物(包括例如在純化或鑑別新穎化合物中可用作中間物之鹽)之間的緊密關係，適當且便利時，上文及下文中對游離化合物之任意提及應理解為亦提及相應鹽。式(I)化合物之鹽較佳為

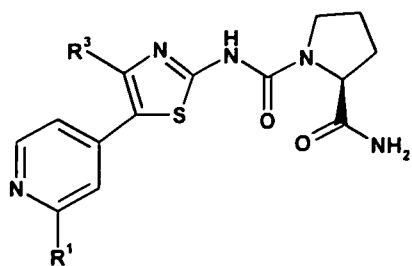
醫藥學上可接受之鹽；形成醫藥學上可接受之鹽的適宜平衡離子在此領域中已知。

「組合」係指呈一個單位劑型之固定組合，或用於組合投藥的各部分之套組，其中式(I)化合物與組合搭配物(例如下文所說明之另一藥物，亦稱為「治療劑」或「輔劑(co-agent)」)可同時獨立地投與，或在時間間隔內分別投與，尤其在此等時間間隔允許組合搭配物顯示合作效應(例如協同效應)的情況下。本文所用之術語「共同投與」或「組合投與」或其類似術語意欲涵蓋將所選組合搭配物投與有需要之單一個體(例如患者)，且意欲包括不必以相同投藥途徑或同時投與藥劑之治療方案。本文所用之術語「醫藥組合」意謂由一種以上活性成份混合或組合而得之產物且包括活性成份之固定組合與非固定組合。術語「固定組合」意謂活性成份例如式(I)化合物與組合搭配物係以單一實體或劑量之形式同時投與患者。術語「非固定組合」意謂活性成份例如式(I)化合物與組合搭配物係以各別實體形式同時、並行或依序投與患者，而無特定時間限制，其中該投藥在患者體內提供治療有效量之兩種化合物。「非固定組合」亦適用於雞尾酒療法(cocktail therapy)，例如投與三種或三種以上活性成份。

在較佳實施例中，較佳以獨立、總體或以任何組合或子組合形式，本發明係關於一種呈游離鹼形式或酸加成鹽形式之式(I)化合物，其中取代基如本文所定義。

在一個有利實施例中，本發明係關於一種式IA化合物：

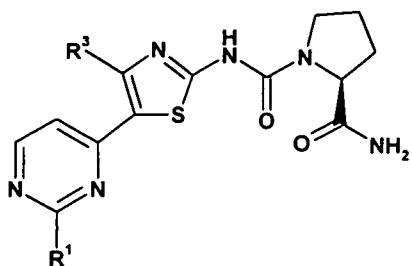




IA

其中取代基如式(I)化合物所定義。

在另一有利實施例中，本發明係關於一種式IB化合物：



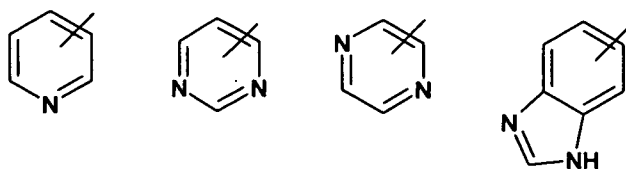
IB

其中取代基如式(I)化合物所定義。

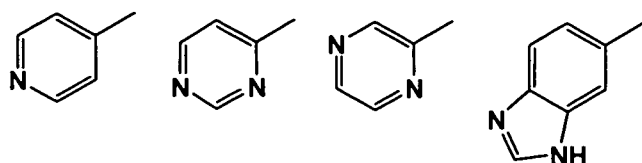
因此，式(I)化合物亦包括式(IA)及(IB)化合物。在本發明中，以下定義亦適用。

A 較佳表示具有一或兩個氮原子及5至10個成環原子之雜芳基。

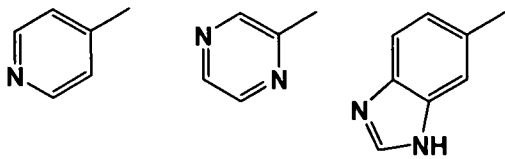
A 尤其較佳表示選自由以下組成之群的雜芳基：



A 極尤其較佳表示選自由以下組成之群的雜芳基：



A 最佳表示選自由以下組成之群的雜芳基：



R<sup>1</sup> 較佳表示以下取代基之一：

- (1) 未經取代或經取代、較佳經取代之 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳 1 至 9 個以下部分：氬、鹵基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 環烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺基羰基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、苯基(其未經取代或經一或多個、較佳 1 個 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基取代)、苯氧基(其未經取代或經一或多個、較佳 1 個 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基取代)；
- (2) 未經取代或經取代之 C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> 環烷基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳 1 至 4 個以下部分：氬、鹵基、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基、胺基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺基羰基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、苯基(其未經取代或經一或多個、較佳 1 個 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基取代)、苯氧基(其未經取代或經一或多個、較佳 1 個 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基)胺基-C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷氧基取代)；
- (3) 未經取代或經取代之苯基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳 1 至 2 個以下部分：氬、鹵基、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷基胺基、二(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 烷



基)胺基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基羰基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基羰基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基；

(4)未經取代、經單取代或經二取代之胺；其中該等取代基係獨立地選自以下部分：氫、 $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氫、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)、 $C_1$ - $C_7$ 烷基羰基、苯基(其未經取代或經一或多個、較佳1個 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基- $C_1$ - $C_7$ 烷氧基取代)、苯基磺醯基(其未經取代或經一或多個、較佳1個 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基- $C_1$ - $C_7$ 烷氧基取代)；

(5)經取代之磺醯基；其中該取代基係選自以下部分： $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氫、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基(其中烷基部分未經取代或經一或多個選自氫、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)、二 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基(其中烷基部分未經取代或經一或多個選自氫、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)；

(6)氟基、氯基。

$R^1$  尤其較佳表示以下取代基之一：

(1)未經取代或經取代、較佳經取代之 $C_1$ - $C_7$ 烷基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳1至9個以下部分：氫、氟基或1至2個以下部分： $C_3$ - $C_5$ 環烷基；

(2)視情況經取代之 $C_3$ - $C_5$ 環烷基，其中該等取代基係

獨立地選自一或多個、較佳1至4個以下部分：氘、 $C_1$ - $C_4$ 烷基(較佳為甲基)、氟基、氯基、胺基羰基；

(3)視情況經取代之苯基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳1至2個以下部分：氘、鹵基、氟基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基羰基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基羰基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基；

(4)視情況經單取代或經二取代之胺；其中該等取代基係獨立地選自以下部分：氘、 $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氘、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)、苯基磺醯基(其未經取代或經一或多個、較佳1個 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基- $C_1$ - $C_7$ 烷氧基取代)；

(5)經取代之磺醯基；其中該取代基係選自以下部分： $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氘、氯基之群的取代基取代)、N-吡咯啉基(其未經取代或經一或多個選自氘、羥基、側氧基之群的取代基取代，尤其經1個側氧基取代)；

(6)氟基、氯基。

$R^1$ 極尤其較佳表示：

(1)環丙基甲基或視情況經取代之分支鏈 $C_3$ - $C_7$ 烷基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳1至9個以下部分：氘、氟基；

(2)視情況經取代之環丙基或環丁基，其中該等取代





基係獨立地選自一或多個、較佳1至4個以下部分：甲基、氫、氟基、氯基、胺基羰基；

(3)視情況經取代之苯基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳1至2個以下部分：氫、鹵基、氟基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基、 $C_1$ - $C_7$ 烷基胺基羰基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基羰基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基；

(4)視情況經單取代或經二取代之胺；其中該等取代基係獨立地選自以下部分：氫、 $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氫、氟基、氯基、羥基之群的取代基取代)、苯基磺醯基(其未經取代或經一或多個、較佳1個 $C_1$ - $C_7$ 烷基、 $C_1$ - $C_7$ 烷氧基、二( $C_1$ - $C_7$ 烷基)胺基- $C_1$ - $C_7$ 烷氧基取代)；

(5)經取代之磺醯基；其中該取代基係選自以下部分： $C_1$ - $C_7$ 烷基(其未經取代或經一或多個選自氫、氟基之群的取代基取代)、N-吡咯啉基(其未經取代或經一或多個選自氫、羥基、側氧基之群的取代基取代，尤其經1個側氧基取代)；

(6)氟基、氯基。

$R^1$ 極尤其較佳表示以下取代基之一： $-C(CH_3)_2CF_3$ 、 $C(CD_3)_3$ 、1-甲基環丙基；較佳處於(I-A)及(I-B)之情形中。

$R^2$ 較佳表示對於 $R^1$ 所定義之取代基。

$R^2$ 更佳表示氫或氫。

$R^2$  尤其較佳表示氫。

$R^2$  在一替代性實施例中表示甲基。

$R^3$  較佳表示 (1) 氫；(2) 鹵基；(3) 視情況經取代之  $C_1$ - $C_7$  烷基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳 1 至 3 個以下部分：氫、鹵基、 $C_1$ - $C_7$  烷基胺基、二( $C_1$ - $C_7$  烷基)胺基。

$R^3$  尤其較佳表示 (1) 氫；(2) 氟基、氯基；(3) 視情況經取代之甲基，其中該等取代基係獨立地選自一或多個、較佳 1 至 3 個以下部分：氫、氟基、氯基、二甲基胺基。

$R^3$  極尤其較佳表示氫、甲基、 $CD_3$ 、 $CH_2Cl$ 、 $CH_2F$ 、 $CH_2N(CH_3)_3$ ；較佳為甲基。

本發明進一步係關於一種如本文所定義之式 (I) 化合物， $R^1$  及 / 或  $R^2$  表示第三丁基之化合物除外。

本發明進一步係關於式 (I) 化合物之醫藥學上可接受之前藥。

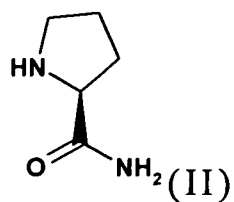
本發明進一步係關於式 (I) 化合物之醫藥學上可接受之代謝物。

本發明尤其係關於實例中所給出之式 (I) 化合物以及其中所述之製備方法。

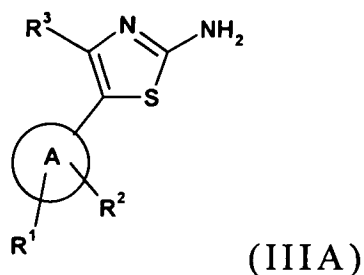
本發明亦係關於製備式 (I) 化合物之方法。原則上，將兩種不同胺轉化成相應脲衍生物之所有已知方法皆適宜且可藉由使用各別起始物質而應用。

因此，本發明尤其係關於一種製備式 (I) 化合物之方法，其包含使式 (II) 化合物：

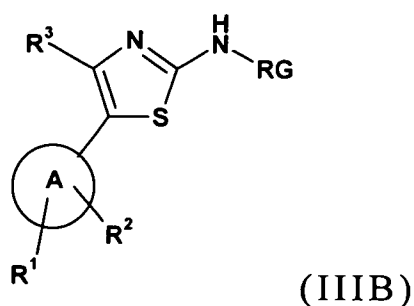




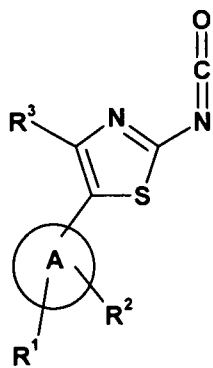
在活化劑存在下與式(IIIA)化合物反應：



其中取代基如本文所定義且  $R^3$  可另外表示氯基(「方法 A」)，或與式(IIIB)化合物反應：



其中  $R^1$  及  $R^2$  如本文所定義， $R^3$  如本文所定義且可另外表示氯基，且 RG 表示反應性基團，諸如咪唑基羰基，其可直接反應或經由形成式(IIIE)之異氰酸酯中間物而反應(「方法 B」)，



(IIIE)

其中取代基如 (IIIB) 中所定義；

在各種狀況下，視情況存在稀釋劑且視情況存在反應助劑；且

回收呈游離形式或鹽形式之所得式 (I) 化合物，且視情況將可根據方法 A 或方法 B 獲得之式 (I) 化合物轉化成不同式 (I) 化合物，及/或將可獲得之式 (I) 化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式 (I) 化合物轉化成其鹽，及/或使可獲得之式 (I) 化合物之異構體與一或多種可獲得之不同式 I 異構體分離。

### 反應條件

該過程可根據此項技術中已知或如以下實例中所揭示之方法來進行。舉例而言，可在例如二甲基甲醯胺之溶劑中，於例如有機胺(例如三乙胺)之鹼存在下使式 II 化合物與式 III 化合物反應。

若上文或下文給出溫度，則由於可容許與所給數值有微小偏差，例如  $\pm 10\%$  之變化，故須添加「約」。

所有反應皆可在一或多種稀釋劑及/或溶劑存在下進行。可使用等莫耳量之起始物質；或者，可使用過量化合物，例如以充當溶劑或使平衡移動或一般加快反應速率。

如此領域中所知，可應反應要求且根據一般已知程序添加適量反應助劑，諸如酸、鹼或催化劑。

### 保護基

若由於在如本文所述之起始物質或任何其他前軀體中一或多種其他官能基(例如羧基、羥基、胺基、硫氫基或其類似基團)不應參與反應或干擾反應而應加以保護或需要保護，則在合成肽化合物以及頭孢菌素(cephalosporin)及青黴素(penicillin)以及核酸衍生物及糖中通常使用此等保護基。保護基為一旦移除即不再存在於最終化合物中之基團，而作為取代基保留之基團並非此處所用之意義上的保護基，該等保護基為在起始物質或中間物階段添加並移除以獲得最終化合物之基團。又，在式(I)化合物轉化成不同式(I)化合物之狀況下，適用或需要時可引入並移除保護基。

保護基可已存在於前軀體中且應保護所關注之官能基以防止不合需要之次級反應，諸如醯化、醚化、酯化、氧化、溶劑分解及類似反應。保護基之特徵在於其通常藉由乙酸水解、質子分解、溶劑分解、還原、光分解，亦或例如在與生理條件類似之條件下藉助於酶活性而本身易於移除，亦即無不合需要之次級反應，且不存在於最終產物中。專家知曉或可易於確定何種保護基適於上文及下文所述之反應。

該等官能基受該等保護基之保護、保護基本身及其移除反應係描述於例如標準參考著作中，該等參考著作為諸如

J. F. W. McOmie, 「Protective Groups in Organic Chemistry」; Plenum Press, London and New York 1973 ;  
T. W. Greene, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, 第3版, Wiley, New York 1999 ; 「The Peptides」, 第3卷 (編者: E. Gross及J. Meienhofer), Academic Press, London及New York 1981 ; 「Methoden der organischen Chemie」 (*Methods of organic chemistry*), Houben Weyl, 第4版, 第15/I卷, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974 ; H.-D. Jakubke及H. Jescheit, 「Aminosäuren, Peptide, Proteine」 (*Amino acids, peptides, proteins*), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach 及 Basel 1982 ; 及 Jochen Lehmann, 「Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate」 (*Chemistry of carbohydrates: monosaccharides and derivatives*), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。

#### 視情況選用之反應及轉化

式(I)化合物可轉化成不同式I化合物。

在 $R^3$ 表示氟基之式(I)化合物中, 該化合物可藉由將相應氟衍生物轉化成氟基化合物而獲得。該等反應已知且稱為取代反應。此轉化可在式(IIIA或B)之起始物質步驟中或藉由轉化相應式I化合物來進行。

在取代基帶有胺基或胺基- $C_1$ - $C_7$ 烷基取代基之式(I)化合物中, 胺基可藉由在諸如三乙胺或吡啶之三級氮鹼存在下, 在諸如二氯甲烷之適當溶劑不存在或存在下, 例如在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $50^{\circ}\text{C}$ 範圍內之溫度下, 例如在約室溫下與相應

$C_1$ - $C_7$ 烷醯基鹵化物或 $C_1$ - $C_7$ 烷磺醯基鹵化物，例如相應氯化物反應而轉化成醯胺基，例如 $C_1$ - $C_7$ 烷醯胺基或 $C_1$ - $C_7$ 烷磺醯胺基。

在取代基帶有氰基取代基之式(I)化合物中，氰基可例如藉由在諸如阮尼鎳(Raney Nickel)或阮尼鈷(Raney Cobalt)之適當金屬催化劑存在下，在例如低碳烷醇(諸如甲醇及/或乙醇)之適當溶劑中，例如在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至 $50^{\circ}\text{C}$ 範圍內之溫度下，例如在約室溫下氫化而轉化成胺基甲基。

可以本身已知之方式製備具有成鹽基團之式(I)化合物之鹽。因此，可藉由以酸或適宜之陰離子交換試劑處理來獲得式(I)化合物之酸加成鹽。具有兩個酸分子之鹽(例如式I化合物之二鹵化物)亦可轉化成每個化合物具有一個酸分子之鹽(例如單鹵化物)；此可藉由加熱至熔融或例如藉由在高真空下於例如 $130^{\circ}\text{C}$ 至 $170^{\circ}\text{C}$ 之高溫下以固體形式加熱，使每個式I化合物分子釋出一個酸分子來進行。鹽通常可例如藉由以適宜之鹼性化合物，例如以鹼金屬碳酸鹽、鹼金屬碳酸氫鹽或鹼金屬氫氧化物，通常為碳酸鉀或氫氧化鈉處理而轉化成游離化合物。

可以本身已知之方式藉助於適宜之分離方法將立體異構混合物(例如非對映異構體之混合物)分離成其相應異構體。可藉助於分級結晶、層析、溶劑分配及類似程序將例如非對映異構混合物分離成其個別非對映異構體。此分離可在起始化合物之層面上或對式(I)化合物本身進行。可經由形成非對映異構性鹽，例如藉由與對映異構性純的對掌

性酸形成鹽，或藉助於層析，例如藉由使用具有對掌性配位體之層析受質進行HPLC來分離對映異構體。

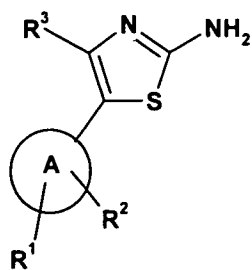
應強調，亦可在適當中間物之層面上進行與此章中所述之轉化類似的反應(且因此適用於製備相應起始物質)。

**起始物質：**

式II及式III之起始物質以及本文所述之其他起始物質(例如下述)可根據或類似於此項技術中已知之方法來製備，該等起始物質在此項技術中已知且/或可購得。在未特定描述起始物質之製備的情況下，該等化合物已知或可類似於此項技術中已知之方法，例如WO 05/021519或WO 04/096797中之方法或如下文所揭示來製備。新穎起始物質及其製備方法同樣為本發明之實施例。在較佳實施例中，使用該等起始物質且選擇所選反應以便能夠獲得較佳化合物。

在適當且便利時亦可以鹽的形式使用及/或獲得之起始材料(包括中間物)中，取代基較佳如對於式(I)化合物所定義。

本發明亦係關於式(IIIA)化合物或其鹽：



(IIIA)

其中取代基如對於式(I)化合物所定義。

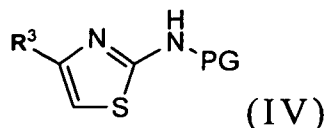
本發明進一步係關於製備式(IIIA)化合物之方法。原則上，使兩種芳基/雜芳基組份(諸如赫克型反應(Heck-type



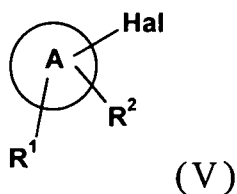


reactions))偶合成相應脲衍生物之所有已知方法皆適宜且可藉由使用各別起始物質來應用。因此，本發明亦係關於一種製備式(IIIA)化合物之方法，其包含：

(步驟1)在赫克條件(Heck condition)下，視情況在稀釋劑存在下且視情況在反應助劑存在下，使式(IV)化合物：



其中R<sup>3</sup>如本文所定義且可另外表示鹵基，PG表示諸如醯基之保護基，與式(V)化合物反應：



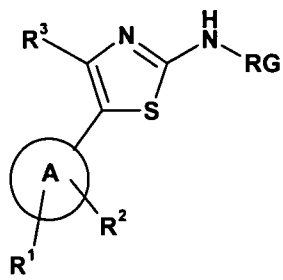
其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、A如本文所定義且Hal表示諸如溴基之鹵基；

(步驟2)接著例如在酸性條件下，視情況在稀釋劑存在下且視情況在反應助劑存在下移除保護基；且

回收呈游離形式或鹽形式之所得式(IIIA)化合物；且

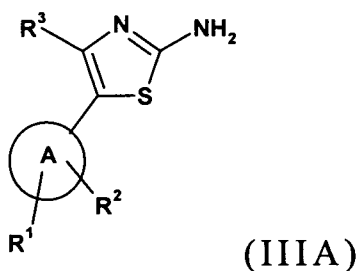
視情況將所獲得之式(IIIA)化合物轉化成不同式(IIIA)化合物，及/或將所獲得之式(IIIA)化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式(IIIA)化合物轉化成其鹽，及/或使可獲得之式(IIIA)化合物之異構體與一或多種所獲得之不同式(IIIA)異構體分離。

本發明進一步係關於式(IIIB)化合物或其鹽：



其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、A 如對於式 (I) 化合物所定義，RG 表示反應性基團，尤其咪唑基羰基，其可直接反應或經由形成式 (IIIE) 之異氰酸酯中間物而反應，且  $R^3$  如本文所定義且可另外表示鹵基。

本發明進一步係關於製備式 (IIIB) 化合物之方法。原則上，將胺或其鹽轉化成相應活化衍生物之所有已知方法皆適宜且可藉由使用各別起始物質來應用。因此，本發明亦係關於一種製備式 (IIIB) 化合物之方法，其包含使式 (IIIA) 化合物：



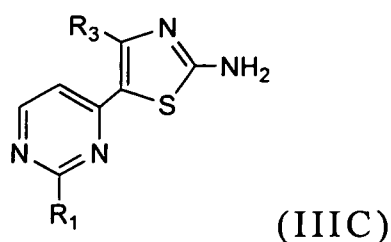
其中取代基如本文所定義，視情況在稀釋劑存在下且視情況在反應助劑存在下與諸如 1,1'-羰基二咪唑之活化試劑反應；且

回收呈游離形式或鹽形式之所得式 (IIIB) 化合物；且視情況將所獲得之式 (IIIB) 化合物轉化成不同式 (IIIB) 化合物，及/或將所獲得之式 (IIIB) 化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式 (IIIB) 化合物轉化成其鹽，及/



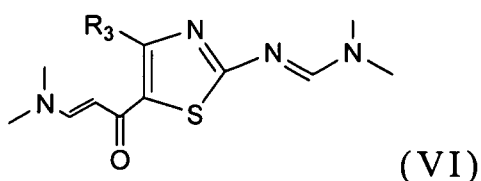
或使可獲得之式 (IIB) 化合物之異構體與一或多種所獲得之不同式 (IIB) 異構體分離。

本發明亦係關於式 (IIC) 化合物或其鹽：

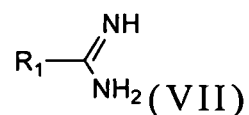


其中取代基如對於式 (I) 化合物所定義。

本發明進一步係關於製備式 (IIC) 化合物之方法。原則上，所有閉環反應皆適宜且可藉由使用各別起始物質來應用。因此，本發明亦係關於一種製備式 (IIC) 化合物之方法，其包含使式 (VI) 化合物：



其中  $R^3$  如本文所定義且可另外表示鹵基，視情況在稀釋劑存在下且視情況在反應助劑存在下與式 (VII) 化合物反應：

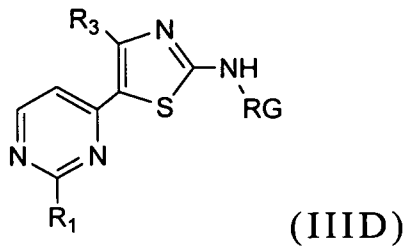


其中  $R^1$  如本文所定義；且

回收呈游離形式或鹽形式之所得式 (IIC) 化合物；且視情況將所獲得之式 (IIC) 化合物轉化成不同式 (IIC) 化合物，及/或將所獲得之式 (IIC) 化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式 (IIC) 化合物轉化成其鹽，及/或使可獲得之式 (IIC) 化合物之異構體與一或多種所獲得

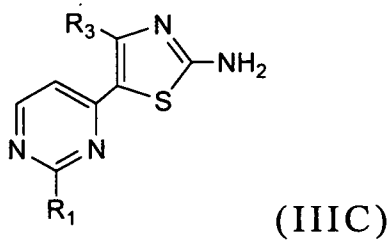
之不同式 (IIC) 異構體分離。

本發明進一步係關於式 (IID) 化合物或其鹽：



其中  $R^1$  如本文所定義，RG 表示反應性基團、尤其咪唑基羰基， $R^3$  如本文所定義且可另外表示鹵基。

本發明進一步係關於製備式 (IID) 化合物之方法。原則上，將胺或其鹽轉化成相應活化衍生物之所有已知方法皆適宜且可藉由使用各別起始物質來應用。因此，本發明亦係關於一種製備式 (IID) 化合物之方法，其包含使式 (IIC) 化合物：



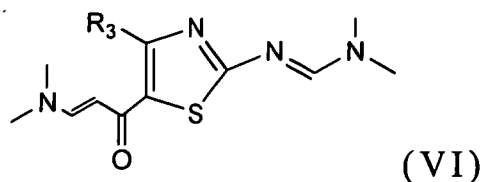
其中取代基如上文所定義，視情況在稀釋劑存在下且視情況在反應助劑存在下與諸如 1,1'-羰基二咪唑之活化試劑反應；且

回收呈游離形式或鹽形式之所得式 (IID) 化合物；且視情況將所獲得之式 (IID) 化合物轉化成不同式 (IID) 化合物，及/或將所獲得之式 (IID) 化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式 (IID) 化合物轉化成其鹽，及/或使可獲得之式 (IID) 化合物之異構體與一或多種所獲得



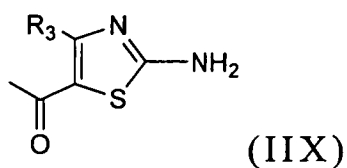
之不同式(IID)異構體分離。

本發明進一步係關於式(VI)化合物或其鹽：



其中R<sup>3</sup>如本文所定義且可另外表示鹵基。

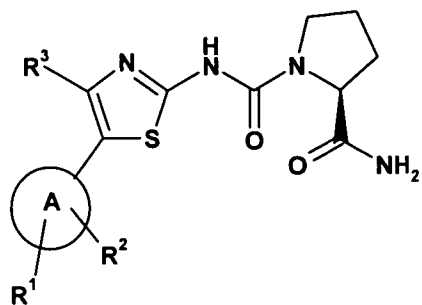
本發明進一步係關於製備式(VI)化合物之方法。原則上，可藉由使用各別起始物質來應用適於此類轉化之所有已知方法。因此，本發明亦係關於一種製備式(IID)化合物之方法，其包含使式(IIX)化合物：



其中R<sup>3</sup>如式(I)中所定義且可另外表示鹵基，與二甲基甲醯胺之縮醛(諸如DMF-二甲基縮醛)反應以獲得式(VI)化合物；

回收呈游離形式或鹽形式之所得式(IID)化合物；且視情況將所獲得之式(IIX)化合物轉化成不同式(IIX)化合物，及/或將所獲得之式(IIX)化合物之鹽轉化成其不同鹽，及/或將可獲得之游離式(IIX)化合物轉化成其鹽，及/或使可獲得之式(IIX)化合物之異構體與一或多種所獲得之不同式(IIX)異構體分離。

式(I)化合物：



(I),

亦包括子式(IA)、(IB)及其醫藥學上可接受之鹽，其中：

A表示雜芳基；

R<sup>1</sup> 表示(1)視情況經取代之烷基；(2)視情況經取代之環烷基；(3)視情況經取代之芳基；(4)視情況經取代之胺；(5)視情況經取代之磺醯基；(6)鹵基；

R<sup>2</sup> 表示氫、氘或如對於R<sup>1</sup>所定義之取代基；

R<sup>3</sup> 表示氫、鹵基、視情況經取代之烷基；

皆適用作藥品。因此，在一實施例中，本發明係關於用於人類或獸醫學用途之組合物，其中指示PI3K受抑制。此實施例亦包括化合物(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(第三丁基)-噻啉-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺，而或者排除該化合物。

在一實施例中，本發明係關於治療由PI3K介導之細胞增殖疾病，諸如腫瘤及/或癌細胞生長。疾病可包括顯示PI3K $\alpha$ 過度表現或擴增、PIK3CA體細胞突變或PTEN生殖系突變或體細胞突變或用以上調p85-p110複合物之p85 $\alpha$ 突變及移位之疾病。詳言之，化合物適用於治療人類或動物(例如鼠類)癌症，包括例如肉瘤、肺癌、支氣管癌、前列腺癌、乳癌(包括偶發性乳癌及考登病(Cowden disease)患者)、胰腺癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸癌瘤、結

腸直腸腺瘤、甲狀腺癌、肝癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、腎上腺癌、胃癌(stomach cancer/gastric cancer)、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、子宮內膜癌、黑色素瘤、腎癌、腎盂癌、膀胱癌、子宮體癌、子宮頸癌、陰道癌、卵巢癌、多發性骨髓瘤、食道癌、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴球性白血病、骨髓白血病、腦癌、大腦癌瘤、口腔與咽癌、喉癌、小腸癌、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、黑色素瘤、絨毛狀結腸腺瘤、贅瘤形成、具上皮特徵之贅瘤形成、淋巴瘤、乳腺癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌、光化性角化症；腫瘤疾病，包括實體腫瘤；頸部或頭部腫瘤；真性紅血球增多症；原發性血小板增多症；伴有骨髓化生之骨髓纖維化；及瓦爾登斯特倫病(Walden stroem disease)。

在其他實施例中，病狀或病症(例如PI3K介導之病狀或病症)係選自由以下組成之群：真性紅血球增多症、原發性血小板增多症、伴有骨髓化生之骨髓纖維化、哮喘、COPD、ARDS、呂弗勒氏症候群(Loffler's syndrome)、嗜伊紅血球性肺炎、寄生蟲(尤其後生動物)感染(包括熱帶嗜伊紅血球增多症)、支氣管肺麴菌病、結節性多動脈炎(包括徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome))、嗜酸性球性肉芽腫、藥物反應引起之影響氣管的嗜伊紅血球相關病症、牛皮癬、接觸性皮炎、異位性皮炎、斑禿、多形性紅斑、疱疹樣皮炎、硬皮病、白斑病、過敏性血管炎、蕁麻疹、大皰性類天疱瘡、紅斑性狼瘡、天疱瘡、後天性大

皰性表皮鬆懈、自體免疫性血液病症(例如溶血性貧血、再生不全性貧血、單純紅血球貧血及特發性血小板減少症)、全身性紅斑性狼瘡、多軟骨炎、硬皮病、韋格納肉芽腫病(Wegener granulomatosis)、皮膚炎、慢性活動性肝炎、重症肌無力、史蒂芬-約翰遜症候群(Steven-Johnson syndrome)、特發性脂肪瀉(idiopathic sprue)、自體免疫性發炎性腸病(例如潰瘍性結腸炎及克羅恩氏病(Crohn's disease))、內分泌性眼病變、格雷氏病(Grave's disease)、類肉瘤病、肺泡炎、慢性過敏性肺炎、多發性硬化症、原發性膽汁性肝硬化症、葡萄膜炎(前葡萄膜炎及後葡萄膜炎)、間質性肺纖維化、牛皮癬性關節炎、絲球體腎炎、心血管疾病、動脈粥樣硬化、高血壓、深度靜脈栓塞、中風、心肌梗塞、不穩定型心絞痛、血栓栓塞、肺栓塞、血栓性疾病、急性動脈缺血、周邊血栓性阻塞及冠狀動脈疾病、再灌注損傷；視網膜病，諸如糖尿病性視網膜病或高壓氧誘發性視網膜病；及特徵在於高眼內壓或分泌眼房液之病狀，諸如青光眼。

對於上述用途，所需劑量當然將視投藥模式、待治療之特定病症及所要效果而變。一般而言，指示令人滿意之結果係以約0.03至約100.0毫克/公斤體重，例如約0.03至約10.0毫克/公斤體重之全身日劑量獲得。例如人類之較大型哺乳動物的指定日劑量在約0.5 mg至約3 g，例如約5 mg至約1.5 g之範圍內，其宜以例如每日至多四次之分次劑量或以遞減形式(retard form)投與。適於經口投與之單位劑型





包含約0.1至約500 mg，例如約1.0至約500 mg活性成份。

式(I)化合物可經由任一習知途徑投與，尤其經腸，例如經口，例如以錠劑或膠囊之形式；或非經腸，例如以可注射溶液或懸浮液之形式；局部，例如以洗劑、凝膠、軟膏或乳膏之形式；藉由經鼻吸入或以栓劑形式。

式(I)化合物可以例如如上文所指示之游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式投與。該等鹽可以習知方式製備且展現與游離化合物相同等級之活性。

因此，本發明亦提供：

- 一種預防或治療有治療需要之個體的由PI3K酶(例如PI3激酶 $\alpha$ )活化而介導之病狀、病症或疾病(例如上文所指示)之方法，該方法包含向該個體投與有效量之式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽；
- 一種呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物，其係例如在如本文所指示之任一方法中作為藥品；
- 一種呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物，其係例如在如本文所指示之任一方法中用作藥品，尤其用於一或多種磷脂醯肌醇3-激酶介導性疾病；
- 呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物在如本文所指示之任一方法中之用途，尤其用於治療一或多種磷脂醯肌醇3-激酶介導性疾病；
- 呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物在如本文所指示之任一方法中之用途，尤其用於製造供治療一或多種磷脂醯肌醇3-激酶介導性疾病用之藥劑。

PI3K充當整合平行信號傳導路徑之第二信使節點，有證據表明PI3K抑制劑與其他路徑之抑制劑的組合將適用於治療人類癌症及增生性疾病。

約20-30%之人類乳癌過度表現Her-2/neu-ErbB2，其為藥物曲妥珠單抗(trastuzumab)之標靶。儘管曲妥珠單抗已在一些表現Her2/neu-ErbB2之患者中顯示持久反應，但僅此等患者之支組作出反應。新近工作已指出此有限反應率實質上可由曲妥珠單抗與PI3K或PI3K/AKT路徑之抑制劑的組合來改良(Chan等人，*Breast Can. Res. Treat.* 91:187 (2005)；Woods Ignatoski等人，*Brit. J. Cancer* 82:666 (2000)；Nagata等人，*Cancer Cell* 6:117 (2004))。

多種人類惡性疾病表現Her1/EGFR之活化突變或其表現量增加，且已開發出許多針對此受體酪胺酸激酶之抗體及小分子抑制劑，包括得舒緩(tarceva)、吉非替尼(gefitinib)及爾必得舒(erbitux)。然而，儘管EGFR抑制劑在某些人類腫瘤(例如NSCLC)中顯示抗腫瘤活性，但其無法增加表現EGFR之所有腫瘤患者的總體患者存活率。此可由以下事實合理說明：Her1/EGFR之許多下游標靶在多種惡性疾病中以高頻率突變或調節異常，包括PI3K/Akt路徑。舉例而言，吉非替尼在活體外檢定中抑制腺癌細胞株生長。然而，可選出具有吉非替尼抗性且顯示PI3/Akt路徑之活化增加的此等細胞株之子純系。此路徑之下調或抑制致使抗性子純系對吉非替尼敏感(Kokubo等人，*Brit. J. Cancer* 92:1711 (2005))。此外，在具有具PTEN突變且過度表現



EGFR之細胞株的活體外乳癌模型中，抑制PI3K/Akt路徑與EGFR產生協同效應(She等人，Cancer Cell 8:287-297 (2005))。此等結果指示吉非替尼與PI3K/Akt路徑抑制劑之組合將為具吸引力之癌症治療策略。

AEE778(Her-2/neu/ErbB2、VEGFR及EGFR之抑制劑)與RAD001(Akt之下游標靶mTOR之抑制劑)之組合在神經膠母細胞瘤異種移植模型中產生大於單獨任一藥劑之組合功效(Goudar等人，Mol. Cancer Ther. 4:101-112 (2005))。

諸如他莫昔芬(tamoxifen)之抗雌激素經由誘導細胞週期停滯來抑制乳癌生長，其需要細胞週期抑制劑p27Kip之作用。近來，已顯示Ras-Raf-MAP激酶路徑之活化改變p27Kip之磷酸化狀態，使得其使細胞週期停滯之抑制活性削弱，進而促成抗雌激素抗性(Donovan等人，J. Biol. Chem. 276:40888 (2001))。如Donovan等人所報導，經由以MEK抑制劑處理來抑制MAPK信號傳導使激素難治性乳癌細胞株中p27之異常磷酸化狀態逆轉，且從而恢復激素敏感性。類似地，p27Kip經Akt磷酸化亦廢除了其使細胞週期停滯之作用(Viglietto等人，Nat. Med. 8:1145 (2002))。

因此，在另一態樣中，使用式I化合物治療激素依賴性癌症，諸如乳癌及前列腺癌。此用途旨在逆轉以習知抗癌劑在此等癌症中通常所見之激素抗性。

在諸如慢性骨髓性白血病(CML)之血液癌症中，染色體移位造成BCR-Abl酪氨酸激酶組成性活化。罹病患者對小

分子酪胺酸激酶抑制劑伊馬替尼(imatinib)作出反應，此為Abl激酶活性受抑制之結果。然而，許多晚期疾病患者最初對伊馬替尼作出反應，但隨後因Abl激酶域中賦予抗性之突變而稍後會復發。活體外研究已證實BCR-Abl採用Ras-Raf激酶路徑來引發其作用。另外，抑制同一路徑中之一種以上激酶提供針對賦予抗性之突變的額外保護。

因此，在另一態樣中，在治療諸如慢性骨髓性白血病(CML)之血液癌症中，式I化合物與至少一種選自激酶抑制劑(諸如Gleevec®)之群的其他藥劑組合使用。此用法旨在逆轉或防止對該至少一種其他藥劑之抗性。

由於PI3K/Akt路徑之活化驅使細胞存活，因此該路徑之抑制與驅使癌細胞凋亡之療法(包括放射線療法及化學療法)組合將引起反應改良(Ghobrial等人，CA Cancer J. Clin 55:178-194 (2005))。舉例而言，PI3激酶抑制劑與卡鉑(carboplatin)之組合在活體外增殖與細胞凋亡檢定中顯示協同效應且在卵巢癌之異種移植模型中顯示活體內腫瘤功效(Westfall及Skinner，Mol. Cancer Ther. 4:1764-1771 (2005))。

除癌症及增生性疾病以外，已有累積證據表明1A類及1B類PI3激酶之抑制劑將在治療上適用於其他疾病領域。已顯示PIK3CB基因之PI3K同功異型產物p110 $\beta$ 之抑制與剪切力誘導之血小板活化有關(Jackson等人，Nature Medicine 11:507-514 (2005))。因此，抑制p110 $\beta$ 之PI3K抑制劑將以單劑形式或組合形式適用於抗血栓形成療法。



PIK3CD 基因之同功異型產物 p110 $\delta$  對 B 細胞功能及分化 (Clayton 等人, *J. Exp. Med.* 196:753-763 (2002))、T 細胞依賴性及非依賴性抗原反應 (Jou 等人, *Mol. Cell. Biol.* 22:8580-8590 (2002)) 及肥大細胞分化 (Ali 等人, *Nature* 431:1007-1011 (2004)) 較重要。因此, 預期 p110 $\delta$  抑制劑將適用於治療 B 細胞驅導之自體免疫疾病及哮喘。最後, PI3KCG 基因之同功異型產物 p110 $\gamma$  之抑制引起 T 細胞而非 B 細胞反應下降 (Reif 等人, *J. Immunol.* 173:2236-2240 (2004)), 且其抑制在自體免疫疾病之動物模型中顯示功效 (Camps 等人, *Nature Medicine* 11:936-943 (2005), Barber 等人, *Nature Medicine* 11:933-935 (2005))。

本發明進一步提供單獨或連同其他抗癌劑一起之醫藥組合物, 其包含至少一種式 (I) 化合物以及適於投與人類或動物個體之醫藥學上可接受之賦形劑。

本發明進一步提供治療罹患諸如癌症之細胞增生性疾病之人類或動物個體之方法。因此, 本發明提供治療有治療需要之人類或動物個體之方法, 其包含向該個體單獨或與一或多種其他抗癌劑組合投與治療有效量之式 (I) 化合物。詳言之, 組合物將以組合治療劑形式調配在一起或獨立地投與。適於與式 (I) 化合物一起使用之抗癌劑包括 (但不限於) 一或多種選自由以下組成之群的化合物: 激酶抑制劑、抗雌激素、抗雄激素、其他抑制劑、癌症化學治療藥物、烷基化劑、螯合劑、生物反應調節劑、癌症疫苗、供反義療法用之藥劑, 如以下所闡述:

A. 激酶抑制劑：與式(I)化合物聯合用作抗癌劑之激酶抑制劑包括表皮生長因子受體(EGFR)激酶抑制劑，諸如小分子喹唑啉，例如吉非替尼(US 5457105、US 5616582及US 5770599)、ZD-6474(WO 01/32651)、埃羅替尼(erlotinib)(Tarceva<sup>®</sup>，US 5,747,498及WO 96/30347)及拉帕替尼(lapatinib)(US 6,727,256及WO 02/02552)；血管內皮生長因子受體(VEGFR)激酶抑制劑，包括SU-11248(WO 01/60814)、SU 5416(US 5,883,113及WO 99/61422)、SU 6668(US 5,883,113及WO 99/61422)、CHIR-258(US 6,605,617及US 6,774,237)、凡塔藍尼(vatalanib)或PTK-787(US 6,258,812)、VEGF-Trap(WO 02/57423)、B43-金雀異黃素(Genistein)(WO-09606116)、芬維A胺(fenretinide)(視黃酸對羥基苯基胺)(US 4,323,581)、IM-862(WO 02/62826)、貝伐單抗(bevacizumab)或Avastin<sup>®</sup>(WO 94/10202)、KRN-951、3-[5-(甲基磺醯基哌啶甲基)-吡啶基]-喹啉酮、AG-13736及AG-13925、吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪、ZK-304709、Veglin<sup>®</sup>、VMDA-3601、EG-004、CEP-701(US 5,621,100)、Cand5(WO 04/09769)；Erb2酪氨酸激酶抑制劑，諸如帕妥珠單抗(pertuzumab)(WO 01/00245)、曲妥珠單抗及利妥昔單抗(rituximab)；Akt蛋白質激酶抑制劑，諸如RX-0201；蛋白激酶C(PKC)抑制劑，諸如LY-317615(WO 95/17182)及哌立福新(perifosine)(US 2003171303)；Raf/Map/MEK/Ras激酶抑制劑，包括索拉非尼(sorafenib)(BAY 43-9006)、ARQ-350RP、LErafAON、



BMS-354825、AMG-548及WO 03/82272中所揭示之其他激酶抑制劑；纖維母細胞生長因子受體(FGFR)激酶抑制劑；細胞依賴性激酶(CDK)抑制劑，包括CYC-202或羅斯維汀(roscovitine)(WO 97/20842及WO 99/02162)；血小板源性生長因子受體(PDGFR)激酶抑制劑，諸如CHIR-258、3G3 mAb、AG-13736、SU-11248及SU6668；及Bcr-Abl激酶抑制劑及融合蛋白，諸如STI-571或Gleevec<sup>®</sup>(伊馬替尼)。

**B. 抗雌激素：**與式(I)化合物聯合用於抗癌療法之雌激素靶向劑包括選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene)、雷諾昔酚(raloxifene)；芳香酶抑制劑，包括Arimidex<sup>®</sup>或阿那曲唑(anastrozole)；雌激素受體下調劑(ERD)，包括Faslodex<sup>®</sup>或氟維司群(fulvestrant)。

**C. 抗雄激素：**與式(I)化合物聯合用於抗癌療法之雄激素靶向劑包括氟他胺(flutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、非那雄安(finasteride)、胺魯米特(aminoglutethamide)、酮康唑(ketoconazole)及皮質類固醇。

**D. 其他抑制劑：**與式(I)化合物聯合用作抗癌劑之其他抑制劑包括蛋白質法呢基轉移酶抑制劑，包括替吡法尼(tipifarnib)或R-115777(US 2003134846及WO 97/21701)、BMS-214662、AZD-3409及FTI-277；拓撲異構酶抑制劑，包括麥爾巴隆(merbarone)及氟替康(diflomotecan, BN-80915)；有絲分裂驅動紡錘體蛋白(KSP)抑制劑，包括SB-743921及MKI-833；蛋白酶體調節劑，諸如硼替佐米

(bortezomib)或 Velcade<sup>®</sup>(US 5,780,454)、XL-784；及環加氧酶2(COX-2)抑制劑，包括非類固醇消炎藥I(NSAID)。

**E.癌症化學治療藥物：**與式(I)化合物聯合用作抗癌劑之特定癌症化學治療劑包括阿那曲唑(Arimidex<sup>®</sup>)、比卡魯胺(Casodex<sup>®</sup>)、硫酸博來黴素(bleomycin sulfate, Blenoxane<sup>®</sup>)、白消安(busulfan, Myleran<sup>®</sup>)、白消安注射液(Busulfex<sup>®</sup>)、卡西他賓(capecitabine, Xeloda<sup>®</sup>)、N4-戊氧羰基-5-去氧-5-氟胞嘧啶核苷、卡鉑(Paraplatin<sup>®</sup>)、卡莫司汀(carmustine, BiCNU<sup>®</sup>)、苯丁酸氮芥(chlorambucil, Leukeran<sup>®</sup>)、順鉑(cisplatin, Platinol<sup>®</sup>)、克拉屈濱(cladribine, Leustatin<sup>®</sup>)、環磷醯胺(Cytosan<sup>®</sup>或 Neosar<sup>®</sup>)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖(cytosine arabinoside, Cytosar-U<sup>®</sup>)、阿糖胞苷脂質體注射液(DepoCyt<sup>®</sup>)、達卡巴嗪(dacarbazine, DTIC-Dome<sup>®</sup>)、放線菌素D(dactinomycin/Actinomycin D, Cosmegen)、鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride, Cerubidine<sup>®</sup>)、檸檬酸道諾黴素脂質體注射液(DaunoXome<sup>®</sup>)、地塞米松(dexamethasone)、多西他賽(docetaxel, Taxotere<sup>®</sup>)、鹽酸阿黴素(doxorubicin hydrochloride, Adriamycin<sup>®</sup>、Rubex<sup>®</sup>)、依託泊苷(etoposide, Vepesid<sup>®</sup>)、磷酸氟達拉賓(fludarabine phosphate, Fludara<sup>®</sup>)、5-氟尿嘧啶(Adrucil<sup>®</sup>、Efudex<sup>®</sup>)、氟他胺(Eulexin<sup>®</sup>)、替紮他濱(tezacitibine)、吉西他濱(Gemcitabine)(二氟去氧胞嘧啶核苷)、羥基脲(Hydra<sup>®</sup>)、黃膽素(Idarubicin, Idamycin<sup>®</sup>)、





異環磷醯胺 (ifosfamide, IFEX<sup>®</sup>)、伊立替康 (irinotecan, Camptosar<sup>®</sup>)、左旋天冬醯胺酶 (ELSPAR<sup>®</sup>)、甲醯四氫葉酸鈣 (leucovorin calcium)、美法倫 (melphalan, Alkeran<sup>®</sup>)、6-巯基嘌呤 (Purinethol<sup>®</sup>)、甲胺喋呤 (methotrexate, Folex<sup>®</sup>)、米托蒽醌 (mitoxantrone, Novantrone<sup>®</sup>)、麥羅塔 (mylotarg)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel, Taxol<sup>®</sup>)、菲尼克斯 (phoenix)(鈾 90/MX-DTPA)、噴司他丁 (pentostatin)、聚苯丙生 20 與卡莫司汀植入物 (polifeprosan 20 with carmustine implant, Gliadel<sup>®</sup>)、檸檬酸他莫西芬 (tamoxifen citrate, Nolvadex<sup>®</sup>)、替尼泊甙 (teniposide, Vumon<sup>®</sup>)、6-硫鳥嘌呤、塞替派 (thiotepa)、替拉紫明 (tirapazamine, Tirazone<sup>®</sup>)、注射用鹽酸拓朴替康 (topotecan hydrochloride for injection, Hycamptin<sup>®</sup>)、長春花鹼 (vinblastine, Velban<sup>®</sup>)、長春新鹼 (vincristine, Oncovin<sup>®</sup>) 及長春瑞賓 (vinorelbine, Navelbine<sup>®</sup>)。

**F. 烷基化劑：**與式 (I) 化合物聯合使用之烷基化劑包括 VNP-40101M 或克羅他嗪 (cloretazine)、奧賽力鉑 (oxaliplatin) (US 4,169,846、WO 03/24978 及 WO 03/04505)、葡磷醯胺 (glufosfamide)、馬磷醯胺 (mafosfamide)、凡畢複 (etopophos) (US 5,041,424)、潑尼莫司汀 (prednimustine)、曲奧舒凡 (treosulfan)、白消安、伊洛福芬 (irofluven) (醯基富烯 (acylfulvene))、五氯甲定 (penclomedine)、吡唑啉吡啶 (pyrazoloacridine) (PD-115934)、O6-苜基鳥嘌呤、地西他濱 (decitabine) (5-氮雜-2-去氧胞嘧啶核苷)、布斯他新

(brostallicin)、絲裂黴素 C(mitomycin C, MitoExtra)、TLK-286(Telcyta<sup>®</sup>)、替莫唑胺(temozolomide)、曲貝替定(trabectedin)(US 5,478,932)、AP-5280(順鉑之鉑酸鹽調配物)、泊非黴素(porfiromycin)及克萊瑞德(clearazide)(氮芥(mechlorethamine))。

**G.螯合劑：**與式(I)化合物聯合使用之螯合劑包括四硫代鉬酸鹽(tetrathiomolybdate)(WO 01/60814)、RP-697、嵌合T84.66(cT84.66)、釷磷維塞(gadofosveset)(Vasovist<sup>®</sup>)、去鐵胺(deferoxamine)及視情況與電穿孔法(EPT)組合之博來黴素。

**H.生物反應調節劑：**與式(I)化合物聯合使用之生物反應調節劑(諸如免疫調節劑)包括星孢菌素(staurosporine)及其巨環類似物，包括UCN-01、CEP-701及米哌妥林(midostaurin)(參見WO 02/30941、WO 97/07081、WO 89/07105、US 5,621,100、WO 93/07153、WO 01/04125、WO 02/30941、WO 93/08809、WO 94/06799、WO 00/27422、WO 96/13506及WO 88/07045)；角鯊胺(squalamine)(WO 01/79255)；DA-9601(WO 98/04541及US 6,025,387)；阿倫單抗(alemtuzumab)；干擾素(例如IFN-a、IFN-b等)；介白素，尤其IL-2或阿地白介素(aldesleukin)以及IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12，及其具有大於70%之原生人類序列之胺基酸序列的活性生物變異體；六甲蜜胺(altretamine, Hexalen<sup>®</sup>)；SU 101或來氟米特(leflunomide)

(WO 04/06834及US 6,331,555)；咪唑并喹啉，諸如雷西莫特 (resiquimod) 及咪喹莫特 (imiquimod)(US 4,689,338、5,389,640、5,268,376、4,929,624、5,266,575、5,352,784、5,494,916、5,482,936、5,346,905、5,395,937、5,238,944及5,525,612)；及SMIP，包括苯并唑 (benzazole)、蔥醌、硫半卡巴脒 (thiosemicarbazone) 及色胺酮 (tryptanthrin)(WO 04/87153、WO 04/64759及WO 04/60308)。

**I. 癌症疫苗：**與式(I)化合物聯合使用之抗癌疫苗包括 Avicine<sup>®</sup>(Tetrahedron Lett. 26:2269-70 (1974))；奧戈伏單抗 (oregovomab)(OvaRex<sup>®</sup>)；Theratope<sup>®</sup>(STn-KLH)；黑色素瘤疫苗；GI-4000系列(GI-4014、GI-4015及GI-4016)，其係針對Ras蛋白中之5種突變；GlioVax-1；MelaVax；Advexin<sup>®</sup>或INGN-201(WO 95/12660)；Sig/E7/LAMP-1，其編碼HPV-16 E7；MAGE-3疫苗或M3TK(WO 94/05304)；HER-2VAX；ACTIVE，其刺激腫瘤特異性T細胞；GM-CSF癌症疫苗；及基於單核細胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 之疫苗。

**J. 反義療法：**與式(I)化合物聯合使用之抗癌劑亦包括反義組合物，諸如 AEG-35156(GEM-640)、AP-12009及AP-11014(TGF- $\beta$ 2 特異性反義寡核苷酸)、AVI-4126、AVI-4557、AVI-4472、奧利默森 (oblimersen, Genasense<sup>®</sup>)、JFS2、阿普諾卡森 (aprinocarsen)(WO 97/29780)、GTI-2040(R2核糖核苷酸還原酶 mRNA 反義寡核苷酸)(WO

98/05769)、GTI-2501(WO 98/05769)、脂質體囊封之c-Raf反義寡聚去氧核苷酸(LerafAON)(WO 98/43095),及Sirna-027(靶向VEGFR-1 mRNA的基於RNAi之治療劑)。

式(I)化合物亦可與支氣管擴張或抗組織胺藥物組合成醫藥組合物。該等支氣管擴張藥物包括抗膽鹼劑或抗蕁毒鹼劑,尤其溴化異丙托銨(ipratropium bromide)、溴化氧托銨(oxitropium bromide)及溴化噻托銨(tiotropium bromide);及 $\beta$ -2腎上腺素受體促效劑,諸如沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特羅(salmeterol)、卡莫特羅(carmoterol)、米沃特羅(milveterol)及尤其福莫特羅(formoterol)或節達特羅(indacaterol)。輔助治療性抗組織胺藥物包括鹽酸西替利嗪(cetirizine hydrochloride)、富馬酸氯馬斯汀(clemastine fumarate)、異丙嗪(promethazine)、氯雷他定(loratadine)、地氯雷他定(desloratadine)、苯海拉明(diphenhydramine)及鹽酸非索非那定(fexofenadine hydrochloride)。

在另一態樣中,本發明提供一種包含式(I)化合物及一或多種適用於治療血栓性疾病、心臟病、中風等之化合物的組合。該等化合物包括阿司匹靈(aspirin)、鏈激酶、組織血纖維蛋白溶酶原活化劑、尿激酶、抗凝血劑、抗血小板藥物(例如PLAVIX, 硫酸氫氣吡格雷(clopidogrel bisulfate))、他汀類(statin)(例如LIPITOR或阿托伐他汀鈣(Atorvastatin calcium)、ZOCOR(辛伐他汀(Simvastatin))、CRESTOR(羅素他汀(Rosuvastatin)等)、 $\beta$ 阻斷劑(例如阿替



洛爾 (Atenolol)、NORVASC(苯磺酸胺氯地平 (amlodipine besylate))及ACE抑制劑(例如賴諾普利 (lisinopril))。

在另一態樣中，本發明提供一種包含式(I)化合物及一或多種適用於治療高血壓之化合物的組合。該等化合物包括ACE抑制劑；降脂質劑，諸如他汀類LIPITOR(阿托伐他汀鈣)；鈣通道阻斷劑，諸如NORVASC(苯磺酸胺氯地平)。

在另一態樣中，本發明提供一種包含式(I)化合物及一或多種選自由纖維酸酯、 $\beta$ 阻斷劑、NEPI抑制劑、血管收縮素-2受體拮抗劑及血小板凝集抑制劑組成之群之化合物的組合。

在另一態樣中，本發明提供一種包含式(I)化合物及適於治療包括類風濕性關節炎之發炎疾病之化合物的組合。該化合物可選自由以下組成之群：TNF- $\alpha$ 抑制劑，諸如抗TNF- $\alpha$ 單株抗體(諸如REMICADE、CDP-870)及D2E7(HUMIRA)及TNF受體免疫球蛋白融合分子(諸如ENBREL)；IL-1抑制劑、受體拮抗劑或可溶性IL-1R $\alpha$ (例如KINERET或ICE抑制劑)；非類固醇消炎劑(NSAID)，吡羅昔康 (piroxicam)、雙氯芬酸 (diclofenac)；萘普生 (naproxen)、氟比洛芬 (flurbiprofen)、非諾洛芬 (fenopropfen)、酮基布洛芬 (ketoprofen)、布洛芬 (ibuprofen)；芬那酸類 (fenamate)，甲芬那酸 (mefenamic acid)、吲哚美辛 (indomethacin)、舒林酸 (sulindac)、阿紫丙宗 (apazone)；二氫吡唑酮類 (pyrazolone)，苯基丁氫酮 (phenylbutazone)；阿司匹靈；COX-2抑制劑(諸如

CELEBREX(塞內昔布(celecoxib))、PREXIGE(盧米羅可(lumiracoxib)); 金屬蛋白酶抑制劑(較佳為MMP-13選擇性抑制劑); p2x7抑制劑;  $\alpha 2\alpha$ 抑制劑, NEUROTIN、普瑞巴林(pregabalin)、低劑量甲胺喋呤、來氟米特(leflunomide)、羥氯喹啉(hydroxychloroquine)、d-青黴胺(d-penicillamine)、金諾芬(auranofin)或非經腸或口服金。

在另一態樣中, 本發明提供一種包含式(I)化合物及適於治療骨關節炎之化合物的組合。該化合物可選自由以下組成之群: 標準非類固醇消炎劑(下文稱為NSAID), 諸如吡羅昔康、雙氯芬酸; 丙酸類, 諸如萘普生、氟比洛芬、非諾洛芬、酮基布洛芬及布洛芬; 芬那酸類, 諸如甲芬那酸、吲哚美辛、舒林酸、阿紮丙宗; 二氫吡唑酮類, 諸如苯基丁氮酮; 水楊酸類, 諸如阿司匹靈; COX-2抑制劑, 諸如塞內昔布、伐地昔布(valdecoxib)、盧米羅可及依託昔布(etoricoxib); 止痛劑及關節內治療劑, 諸如皮質類固醇及玻璃醛酸(諸如膝爾康(hyalgan)及欣維可(synvisc))。

在另一態樣中, 本發明提供一種包含式(I)化合物及抗病毒劑及/或防腐化合物之組合。該抗病毒劑可選自由維拉賽特(Viracept)、AZT、阿昔洛韋(acyclovir)及泛昔洛韋(famciclovir)組成之群。該防腐化合物可選自由瓦倫特(Valant)組成之群。

在另一態樣中, 本發明提供一種包含式(I)化合物及一或多種選自由以下組成之群之藥劑的組合: CNS藥劑, 諸如抗抑鬱劑(舍曲林(sertraline))、抗帕金森氏病藥物(anti-



Parkinsonian drug)(諸如鹽酸司來吉蘭(deprenyl)、左旋多巴胺(L-dopa)、力必平(Requip)、樂伯克(Mirapex)、MAOB抑制劑(諸如司來吉蘭(selegine)及雷沙吉蘭(rasagiline))、comP抑制劑(諸如托卡朋(Tasmar))、A-2抑制劑、多巴胺再吸收抑制劑、NMDA拮抗劑、菸鹼促效劑、多巴胺促效劑及神經元氧化氮合成酶抑制劑。

在另一態樣中，本發明提供一種包含式(I)化合物及一或多種抗阿茲海默氏病藥物(anti-Alzheimer's Drug)之組合。該抗阿茲海默氏病藥物可選自由以下組成之群：冬尼培唑(donepezil)、塔克林(tacrine)、 $\alpha 2\delta$ 抑制劑、NEUROTIN、普瑞巴林(pregabalin)、COX-2抑制劑、丙戊茶鹼(propentofylline)或美曲磷酯(metryfonate)。

在另一態樣中，本發明提供一種包含式(I)化合物及骨質疏鬆症藥劑及/或免疫抑制劑之組合。該等骨質疏鬆症藥劑可選自由EVISTA(鹽酸雷諾昔酚(raloxifene hydrochloride))、屈洛昔芬(droloxifene)、拉索昔芬(lasofloxifene)或福善美(fosomax)組成之群。該等免疫抑制劑可選自由FK-506及雷帕黴素(rapamycin)組成之群。

在較佳實施例之另一態樣中，提供包括一或多種式(I)化合物及如本文所揭示之組合搭配物的套組。代表性套組包括PI3K抑制劑化合物(例如式(I)化合物)及藥品說明書或其他標記，包括關於投與PI3K抑制劑之化合物治療細胞增殖疾病之用法說明。

一般而言，式(I)化合物將經由針對起類似效用之藥劑的

任一公認投藥模式以治療有效量投與。式(I)化合物(亦即活性成份)之實際量將視眾多因素而定，該等因素為諸如待治療疾病之嚴重度、個體之年齡及相對健康狀況、所用化合物之效能、投藥途徑及形式以及其他因素。藥物可每日投與一次以上，較佳每日一次或兩次。所有此等因素皆在主治臨床醫師之技能範圍內。式I化合物之治療有效量可在約0.05至約50毫克/公斤接受者體重/日、較佳約0.1-25毫克/公斤/日、更佳約0.5至10毫克/公斤/日之範圍內。因此，對於向70 kg個人投藥，劑量範圍最佳為約35-70毫克/日。

一般而言，式(I)化合物將以醫藥組合物形式經由以下任一途徑投與：經口、全身性(例如經皮、鼻內或栓劑)或非經腸(例如肌肉內、靜脈內或皮下)投藥。較佳投藥方式為經口，使用方便每日給藥方案，可根據病痛程度調整。組合物可採用以下形式：錠劑、丸劑、膠囊、半固體、粉劑、持續釋放調配物、溶液、懸浮液、醃劑、氣霧劑或任何其他適當組合物。投與式(I)化合物之另一較佳方式為吸入。此為將治療劑直接傳遞至呼吸道之有效方法。

調配物之選擇視多種因素而定，該等因素為諸如投藥方式及藥物之生物可用性。對於經由吸入傳遞而言，可將化合物調配成液體溶液、懸浮液、氣霧劑推進劑或乾粉，且裝填於適宜之分配器中以供投藥。有幾類型之醫藥吸入裝置：噴霧器吸入器、定劑量吸入器(MDI)及乾粉吸入器(DPI)。噴霧器裝置產生高速氣流，使治療劑(以液體形式





調配)呈霧狀噴射，被帶入患者呼吸道中。MDI通常為調配物與壓縮氣體封裝。在致動時，該裝置即由壓縮氣體排出測定量之治療劑，由此提供一種投與設定量藥劑的可靠方法。DPI分配呈自由流動粉末形式之治療劑，其可在呼吸期間由該裝置分散於患者吸入氣流中。為獲得自由流動粉末，將治療劑與諸如乳糖之賦形劑一起調配。將測定量之治療劑以膠囊形式儲存且以每次致動分配。

本發明亦關於式(I)化合物之粒度介於10-1000 nm、較佳10-400 nm之間的調配物。基於增加表面積(亦即減小粒度)可增加生物可用性之原理，已開發出尤其用於生物可用性較差之藥物的醫藥調配物。舉例而言，U.S. 4,107,288描述顆粒之尺寸範圍為10至1,000 nm的醫藥調配物，其中活性物質係載於大分子交聯基質上。U.S. 5,145,684描述醫藥調配物之製備，其中在表面改質劑存在下將藥物粉碎成奈米顆粒(平均粒度為400 nm)，且隨後使之分散於液體介質中以得到展現顯著高的生物可用性之醫藥調配物。兩個文獻均以引用的方式包括於本文中。

在另一態樣中，本發明提供包含(治療有效量之)式(I)化合物及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。可接受之賦形劑為無毒的，幫助投藥，且對式I化合物之治療效益無不利影響。該賦形劑可為熟習此項技術者一般可用之任何固體、液體、半固體，或氣態賦形劑(在氣霧劑組合物之狀況下)。

固體醫藥賦形劑包括澱粉、纖維素、滑石、葡萄糖、乳

糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鎂、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、氯化鈉、脫脂乳粉及其類似物。

液體及半固體賦形劑可選自甘油、丙二醇、水、乙醇及多種油，包括石油，動物、植物或合成來源之油，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。較佳液體載劑、尤其用於可注射溶液之液體載劑包括水、生理食鹽水、右旋糖溶液及乙二醇。

可使用壓縮氣體使式(I)化合物以氣霧劑形式分散。適於達成此目的之惰性氣體為氮氣、二氧化碳等。其他適宜之醫藥賦形劑及其調配物描述於E. W. Martin所編之Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, 第18版, 1990)中。

調配物中化合物之量可在熟習此項技術者所採用之全範圍內變化。通常，以重量百分數(重量%)計，調配物將含有總調配物之約0.01-99.99重量%的式(I)化合物，其餘為一或多種適宜之醫藥賦形劑。化合物較佳以約1-80重量%之含量存在。

本發明進一步係關於包含(亦即，含有或由...組成)至少一種式(I)化合物及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

包含呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物與至少一種醫藥學上可接受之賦形劑(諸如載劑及/或稀釋劑)的醫藥組合物可以習知方式藉由將該等組份混合來



製備。

包含呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物且進一步包含組合搭配物(在一個單位劑型中或以分裝部分之套組形式)與至少一種醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑的經組合醫藥組合物可以習知方式藉由將醫藥學上可接受之載劑及/或稀釋劑與該等活性成份混合來製備。

因此，在其他態樣中，本發明提供：

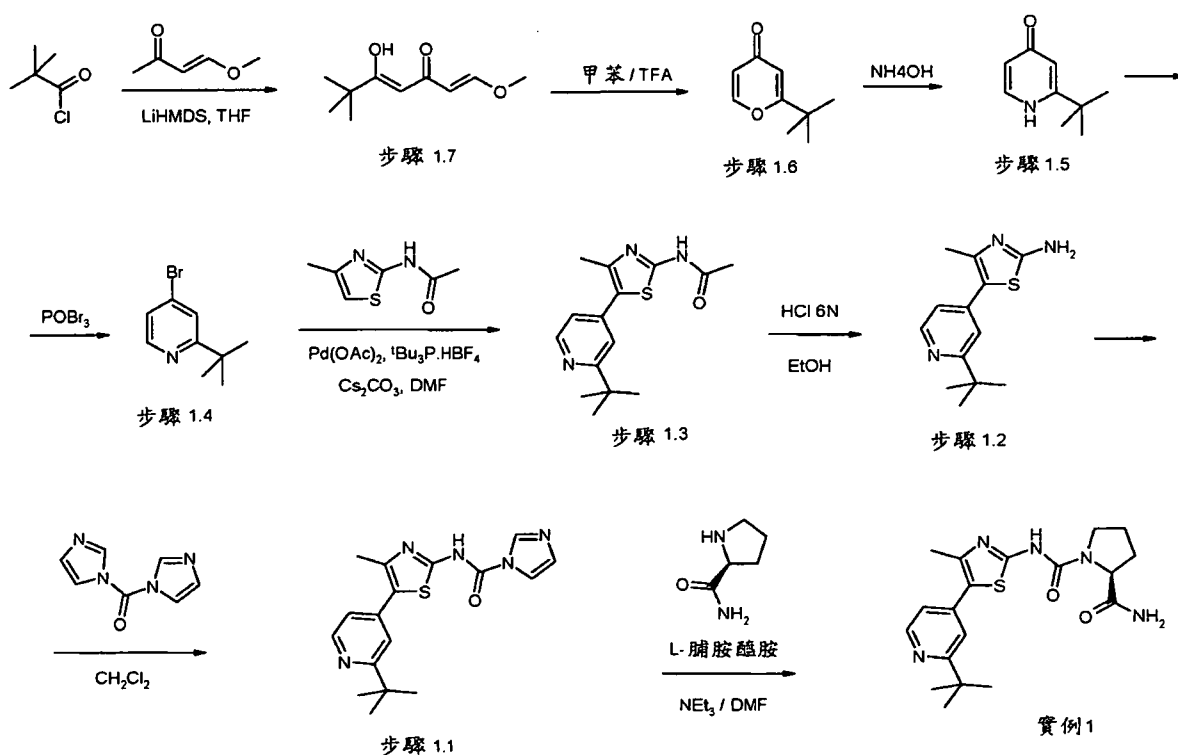
- 一種經組合醫藥組合物，例如用於本文所述之任一方法中，其包含呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物與醫藥學上可接受之稀釋劑及/或載劑。
- 一種經組合醫藥組合物，其包含呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物作為活性成份；一或多種醫藥學上可接受之載劑物質及/或稀釋劑及視情況存在之一或多種其他藥物。該經組合醫藥組合物可呈一個單位劑型或分裝部分之套組的形式。
- 一種經組合醫藥組合物，其包含治療有效量之呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的式(I)化合物及第二藥物，以供同時或依序投與。
- 一種如上文所定義之方法，其包含共同投與(例如同時或依序)治療有效且無毒之量的式(I)化合物或其醫藥學上可接受之鹽以及例如如上文所指示之至少一種第二藥物。
- 一種醫藥組合，例如套組，其包含a)第一藥劑，其為如本文所揭示之呈游離形式或醫藥學上可接受之鹽形式的

式(I)化合物；及b)至少一種輔劑，例如如上文所指示；藉此該套組可包含關於其投藥之用法說明。

### 【實施方式】

式(I)化合物之以下實例說明本發明，而不限制其範疇。製備該等化合物之方法描述於下文。

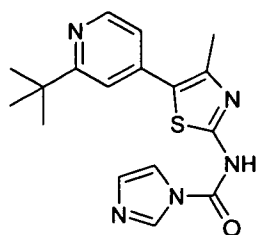
實例1：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



在氫氣氛圍下，將 $\text{Et}_3\text{N}$  (1.54 mL, 11.1 mmol, 3當量) 添加至咪唑-1-甲酸 [5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺 (步驟 1.1) (1.26 g, 3.7 mmol) 及 L-脯胺醯胺 (0.548 g, 4.8 mmol, 1.3當量) 於 DMF (25 mL) 中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物 14 小時，添加飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液中止反應且以 EtOAc 萃取。以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗滌有機相，乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析

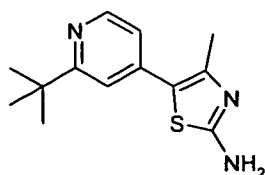
(DCM/MeOH, 1:0→94:6), 接著在Et<sub>2</sub>O中濕磨來純化殘餘物以得到1.22 g呈灰白色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 388.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.35 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.36 (DCM/MeOH, 9:1)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 1.32 (s, 9 H) 1.75-1.95 (m, 3 H) 1.97-2.13 (m, 1 H) 2.39 (s, 3 H) 3.38-3.50 (m, 1 H) 3.52-3.65 (m, 1 H) 4.10-4.40 (m, 1 H) 6.94 (br. s., 1 H) 7.22 (d, 1 H) 7.30-7.48 (m, 2 H) 8.49 (d, 1 H) 10.87 (br. s., 1 H)。

步驟 1.1: 咪唑-1-甲酸[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺



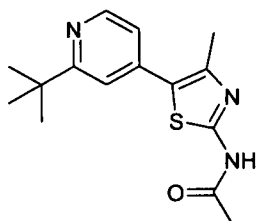
將5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺(步驟1.2)(1 g, 4.05 mmol)及1,1'-羰基二咪唑(0.984 g, 6.07 mmol, 1.5當量)於DCM(50 mL)中之混合物在回流下攪拌4小時且使其冷卻。藉由過濾收集所得沈澱物以得到1.26 g呈白色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 340.2 [M-H]<sup>-</sup>; t<sub>R</sub>=2.85 min(系統1)。

步驟 1.2: 5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺



將N-[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺(步驟1.3)(2 g, 7 mmol)、6 N HCl水溶液(10 mL)及EtOH(50 mL)之混合物在85°C下攪拌2小時，使其冷卻，添加飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液中止反應且以DCM/MeOH(9:1, v/v)萃取。以飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→96:4)純化殘餘物以得到1.21 g呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 248.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.36(DCM/MeOH, 9:1)。

步驟1.3：N-[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺

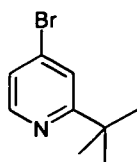


將2-乙醯胺基-4-甲基噻唑(1.2 g, 7.7 mmol, 1.1當量)、碳酸鈉(4.55 g, 14 mmol, 2當量)、四氟硼酸三-第三丁基鎂(0.406 g, 1.4 mmol, 0.2當量)、乙酸鈣(II)(0.15 g, 0.7 mmol, 0.1當量)及4-溴-2-第三丁基-吡啶(步驟1.4)(1.5 g, 7 mmol)於DMF(50 mL)中之混合物在90°C於氫氣氛圍下攪拌1.5小時，使其冷卻，添加飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液中止反應且經矽藻土襯墊過濾。以EtOAc萃取濾液。以飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→97:3)純化殘餘物以得到2.02 g呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 290.1 [M+H]<sup>+</sup>；



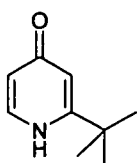
TLC:  $R_f=0.35$ (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 1.4：4-溴-2-第三丁基-吡啶



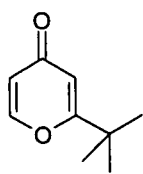
將 2-第三丁基-1H-吡啶-4-酮(步驟 1.5)(4.25 g, 28 mmol) 及  $\text{POBr}_3$ (8.88 g, 31 mmol, 1.1 當量) 之混合物加熱至  $120^\circ\text{C}$ ，攪拌 15 分鐘，使其冷卻，添加飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液中止反應且以 DCM/MeOH(9:1, v/v) 萃取。以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗滌有機相，乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 95:5)純化殘餘物以得到 5.18 g 呈黃色油狀之標題化合物：ESI-MS: 214.0/216.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ； $t_R=2.49$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.35$ (己烷/EtOAc, 1:1)。

步驟 1.5：2-第三丁基-1H-吡啶-4-酮



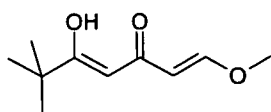
將 2-第三丁基-吡喃-4-酮(步驟 1.6)(5.74 g, 37.7 mmol) 及 30% 氫氧化銨水溶液(100 mL) 之混合物在回流下攪拌 1 小時，使其冷卻且濃縮。以 MeOH(200 mL) 濕磨殘餘物且過濾。濃縮濾液且藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH/氫水, 94:5:1→92:7:1)純化殘餘物以得到 4.46 g 呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 152.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ； $t_R=1.45$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.11$ (DCM/MeOH, 9:1)。

## 步驟 1.6：2-第三丁基-呷喃-4-酮



將 5-羥基-1-甲氧基-6,6-二甲基-庚-1,4-二烯-3-酮(步驟 1.7)(6.8 g, 36.9 mmol)及 TFA(5.65 mL, 74 mmol, 2當量)於苯(250 mL)中之混合物在室溫下攪拌 14 小時且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:0→75:25)純化殘餘物, 得到 5.74 g 呈黃色油狀之標題化合物: ESI-MS: 153.1  $[M+H]^+$ ;  $t_R=3.21$  min(系統 1); TLC:  $R_f=0.22$ (己烷/EtOAc, 1:1)。

## 步驟 1.7：5-羥基-1-甲氧基-6,6-二甲基-庚-1,4-二烯-3-酮



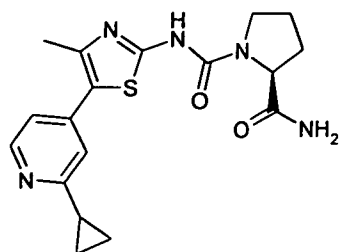
將 LiHMDS(於 THF 中之 1 M, 100 mL, 2當量)逐滴添加至 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮(10 mL, 100 mmol, 2當量)於 THF(400 mL)中之冷(-78°C)溶液中。在 -78°C 下攪拌 30 分鐘後, 添加三甲基乙醯氯(6.12 mL, 50 mmol)於 THF(100 mL)中之溶液。經 2 小時使所得混合物升溫至室溫, 且添加飽和  $NH_4Cl$  溶液中止反應。在真空下移除 THF。以  $Et_2O$  萃取經濃縮之混合物。以鹽水洗滌有機相, 乾燥( $Na_2SO_4$ ), 過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:0→85:15)純化殘餘物以得到 6.83 g 呈黃色油狀之標題化合物: ESI-MS: 185.1  $[M+H]^+$ ; TLC:  $R_f=0.87$ (己烷/





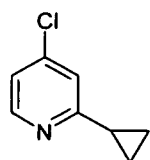
EtOAc, 1:1)。

實例 2：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-環丙基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 4 小時。在步驟 1.2 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.3 中，使用 4-氯-2-(1-甲基-環丙基)-吡啶(步驟 2.1)且在 150°C 下攪拌反應混合物 2 小時。標題化合物：ESI-MS: 372.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.35(DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 2.1：4-氯-2-環丙基-吡啶

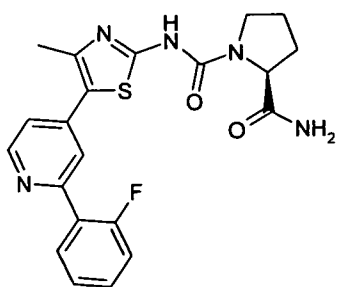


根據對文獻 [Comins, D. L.; Mantlo, N. B., Journal of Organic Chemistry, (1985), 50, 4410-4411] 中所述程序之修改來製備標題化合物。

將溴化環丙基鎂(於 THF 中之 0.5 M, 100 mL, 50 mmol, 2.2 當量)以一份添加至 4-氯吡啶鹽酸鹽(3.4 g, 22 mmol)於 THF(68 mL)中之冷(-78°C)懸浮液中。在 -78°C 下攪拌 10 分鐘後，逐滴添加氯甲酸苯酯(2.76 mL, 22

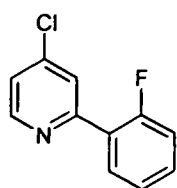
mmol)。在  $-78^{\circ}\text{C}$  下攪拌反應混合物 15 分鐘，使其升溫至室溫，添加 20%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液中止反應且以  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $2 \times 100 \text{ mL}$ ) 萃取。以飽和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (50 mL) 洗滌有機相，乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，過濾且濃縮。向溶解於甲苯 (100 mL) 中之殘餘物中添加鄰四氯代苯醌 (6 g, 24.2 mmol, 1.1 當量) 於冰醋酸 (50 mL) 中之溶液。在室溫下攪拌反應混合物 14 小時，冷卻至  $0^{\circ}\text{C}$ ，添加 10%  $\text{NaOH}$  水溶液鹼化且經矽藻土襯墊過濾。以  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) 洗滌來自濾液之有機層且以 10%  $\text{HCl}$  水溶液 ( $3 \times 25 \text{ mL}$ ) 萃取。添加 20%  $\text{NaOH}$  水溶液鹼化經合併之酸性層且以  $\text{DCM}$  ( $3 \times 25 \text{ mL}$ ) 萃取。以  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) 洗滌有機相，乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析 ( $\text{DCM}/\text{MeOH}$ , 1:0  $\rightarrow$  99:1) 純化殘餘物以得到 0.951 g 呈無色油狀之標題化合物：ESI-MS: 154.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ； $t_{\text{R}}=1.41 \text{ min}$  (系統 1)；TLC:  $R_{\text{f}}=0.85$  ( $\text{DCM}/\text{MeOH}$ , 9:1)。

實例 3：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-氟-苯基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



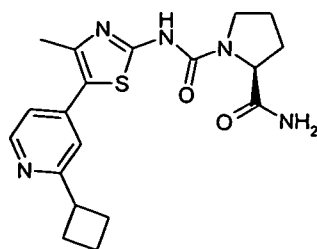
類似於實例 1 所述之程序，但使用 4-氯-2-(2-氟-苯基)-吡啶 (步驟 3.1) 且在步驟 1.3 中於  $150^{\circ}\text{C}$  下攪拌相應混合物 2 小時來製備標題化合物：ESI-MS: 426.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ； $t_{\text{R}}=2.60 \text{ min}$  (系統 1)；TLC:  $R_{\text{f}}=0.40$  ( $\text{DCM}/\text{MeOH}$ , 9:1)。

### 步驟 3.1：4-氯-2-(2-氟-苯基)-吡啶



在 105°C 於氫氣氛圍下，將 2-氟苯基酰胺 (141 mg, 1 mmol, 1.2 當量) 於 EtOH (1 mL) 中之混合物添加至 4-氯-2-碘-吡啶 [Choppin, S.; Gros, P.; Fort, Y., *European Journal of Organic Chemistry* (2001), (3), 603-606] (200 mg, 0.84 mmol)、PdCl<sub>2</sub>(dppf) (18 mg, 0.025 mmol, 0.03 當量) 及 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M 水溶液, 1.68 mL, 3.36 mmol, 4 當量) 於甲苯 (2 mL) 中之混合物中。在 105°C 下攪拌反應混合物 1 小時，使其冷卻至室溫，添加飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中止反應且以 EtOAc 萃取。以飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗滌有機相，乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析 (己烷/EtOAc, 1:0 → 97:3) 純化殘餘物以得到 127 mg 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 208.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=4.66 min (系統 1); TLC: R<sub>f</sub>=0.27 (己烷/EtOAc, 9:1)。

實例 4：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[[5-(2-環丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺]

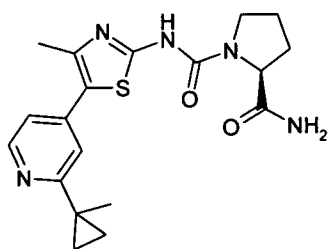


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化

合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物4小時，以EtOAc及H<sub>2</sub>O稀釋且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，在DCM中濕磨來純化殘餘物。在步驟1.3中，在120°C下攪拌反應混合物2小時，冷卻，以EtOAc及H<sub>2</sub>O稀釋，經矽藻土襯墊過濾且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，在Et<sub>2</sub>O中濕磨來純化殘餘物。在步驟1.5中，在80°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之環丁基羰基氯且使反應混合物經18小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 386.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.11 (DCM/MeOH, 95:5)。

實例5：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物1小時。在步驟1.3中，在120°C下攪拌反應混合物3小時。在步驟1.5中，在65-70°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，使用1-甲基-環丙烷羰基氯(步驟5.1)。

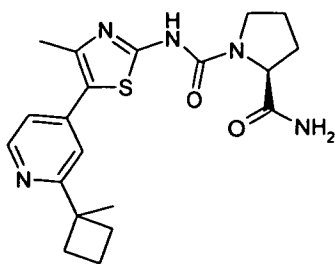
標題化合物：ESI-MS: 386.1  $[M+H]^+$ ；TLC:  $R_f=0.40$  (DCM/MeOH, 9:1)。 $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 0.71-0.87 (m, 2 H) 1.11-1.26 (m, 2 H) 1.47 (s, 3 H) 1.74-1.96 (m, 3 H) 2.00-2.15 (m, 1 H) 2.39 (s, 3 H) 3.35-3.52 (m, 1 H) 3.52-3.73 (m, 1 H) 4.10-4.40 (m, 1 H) 6.93 (br. s., 1 H) 7.15 (dd, 1 H) 7.27 (s, 1 H) 7.35 (s, 1 H) 8.40 (d, 1 H) 10.99 (br. s., 1 H)。

### 步驟5.1：1-甲基-環丙烷羧基氯



將1-甲基-環丙烷甲酸(10 g, 100 mmol)及乙二醯氯(10.49 ml, 120 mmol, 1.2當量)於 $CHCl_3$ (80 ml)中之混合物在 $70^\circ C$ 下攪拌4小時。濃縮反應混合物以得到11.8 g呈黃色油狀之標題化合物，其未經進一步純化即使用。

實例6：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

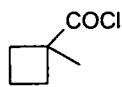


類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，以EtOAc及 $H_2O$ 稀釋來使反應混合物中止反應，且以EtOAc萃取。在步驟1.2中，在 $100^\circ C$ 下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.3中，在 $100^\circ C$ 下攪拌反應混

合物3小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋，且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:4)純化殘餘物。在步驟1.5中，在80°C下攪拌反應混合物2小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，將於THF(100 mL)中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮(50 mmol)添加至LiHMDS(於THF中之1 M, 100 mL)於THF(200 mL)中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加氯化1-甲基-環丁烷(步驟6.1)且使反應混合物經18小時達到室溫。

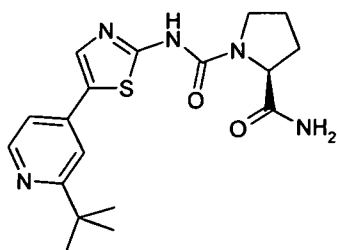
標題化合物：ESI-MS: 400.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.06 (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

#### 步驟6.1：1-甲基-環丁烷羧基氯



類似於步驟5.1所述之程序，但使用1-甲基-環丁烷甲酸 [Cowling, S. J.; Goodby, J. W., Chemical Communications, (2006), (39), 4107-4109] 製備標題化合物。

實例7：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺}

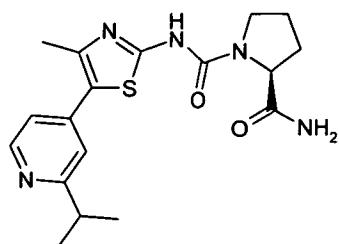


類似於實例1所述之程序，依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物16小時，以

EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 1 小時。在步驟 1.3 中，使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺。在 120°C 下攪拌反應混合物 2 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋且以 EtOAc 萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:1)，接著在 Et<sub>2</sub>O 中濕磨來純化殘餘物。

標題化合物：ESI-MS: 374.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.16 min(系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.10(DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

實例 8：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[[5-(2-異丙基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}

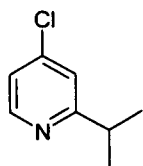


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 16 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.3 中，使用 4-氯-2-異丙基-吡啶(步驟 8.1)。在 150°C 下攪拌反應混合物 3 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋且以 EtOAc 萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 25:75)純化殘餘物。

標題化合物：ESI-MS: 374.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=1.99 min(系統

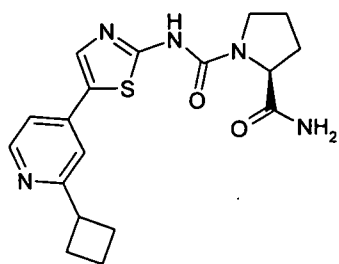
1) ; TLC:  $R_f=0.10$ (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

步驟 8.1 : 4-氯-2-異丙基-吡啶



類似於步驟 2.1 所述之程序，但使用氯化異丙基鎂(於 THF 中之 2 M) 來製備標題化合物：ESI-MS: 156.0  $[M+H]^+$  ; TLC:  $R_f=0.32$ (DCM)。

實例 9 : (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-環丁基-吡啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 16 小時，以 DCM/H<sub>2</sub>O 稀釋且以 DCM 萃取。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時，且不純化粗產物。在步驟 1.3 中，使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺。在 120°C 下攪拌反應混合物 3 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 2:3)純化殘餘物。在步驟 1.5 中，在 80°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.7 中，將於 THF(100 mL) 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮(50 mmol) 添加至 LiHMDS

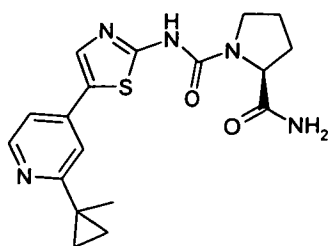




於 THF 中之 1 M, 100 mL) 於 THF (200 mL) 中之冷 (-78°C) 溶液中。30 分鐘後，添加環丁基羰基氯且使反應混合物經 18 小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 372.1  $[M+H]^+$ ；TLC:  $R_f=0.13$  (DCM/MeOH/氨水, 91.5:7.5:1)。

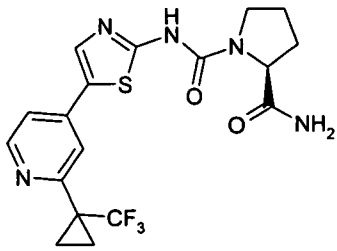
實例 10：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(1-甲基-環丙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 14 小時。在步驟 1.2 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 1 小時。在步驟 1.3 中，使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺且在 120°C 下攪拌反應混合物 4 小時。在步驟 1.5 中，不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.7 中，使用 1-甲基-環丙烷羰基氯(步驟 5.1)。

標題化合物：ESI-MS: 372.1  $[M+H]^+$ ；TLC:  $R_f=0.43$  (DCM/MeOH, 9:1)。

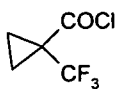
實例 11：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(1-三氟甲基-環丙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.3中，使用N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.4中，使用1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮2.55毫升)作為溶劑。在83°C下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.5中，在65°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，使用1-三氟甲基-環丙烷羧基氯(步驟11.1)。

標題化合物：ESI-MS: 426.0  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.35$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.25$ (DCM/MeOH, 9:1)。

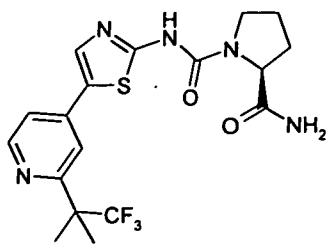
#### 步驟11.1：1-三氟甲基-環丙烷羧基氯



類似於步驟5.1所述之程序，但使用1-三氟甲基-環丙烷甲酸來製備標題化合物。

實例12：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

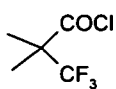




類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物5小時。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，使用N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物2.5小時。在步驟1.4中，在83°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.5中，在65°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，不純化粗產物。在步驟1.7中，使用3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟12.1)。

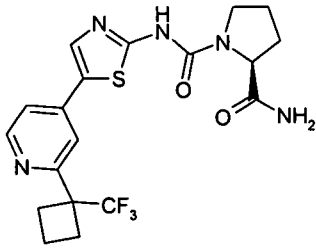
標題化合物：ESI-MS: 428.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.75 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.21(DCM/MeOH, 9:1)。

步驟12.1：3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯



類似於步驟5.1所述之程序，但使用3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙酸來製備標題化合物。

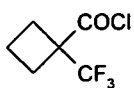
實例13：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(1-三氟甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物1小時。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物5小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以EtOAc萃取。在步驟1.4中，使用1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮2.26毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.5中，在室溫下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，在室溫下攪拌反應混合物18小時。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之1-三氟甲基-環丁烷羧基氯(步驟13.1)。使反應混合物經18小時達到室溫且在中止反應後以EtOAc萃取。

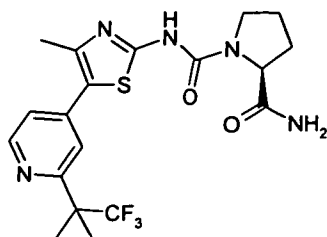
標題化合物：ESI-MS: 440.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.68 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.08(DCM/MeOH/氨水，91.5:7.5:1)。

步驟13.1：1-三氟甲基-環丁烷羧基氯



類似於步驟5.1所述之程序，但使用1-三氟甲基-環丁烷甲酸且在回流下攪拌反應混合物2小時來製備標題化合物。

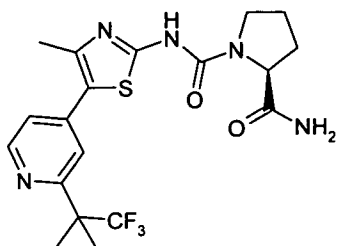
實例14：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-(1-三氟甲基-環丙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，在120°C下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.4中，使用1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮2.55毫升)作為溶劑。在83°C下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.5中，在65°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，使用1-三氟甲基-環丙烷羧基氯(步驟11.1)。

標題化合物：ESI-MS: 440.0 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.65 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.36(DCM/MeOH, 9:1)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 1.41 (s, 4 H) 1.70-1.90 (m, 3 H) 2.00-2.10 (m, 1 H) 2.40 (s, 3 H) 3.36-3.52 (m, 1 H) 3.52-3.65 (m, 1 H) 4.10-4.40 (m, 1 H) 6.95 (br. s., 1 H) 7.37 (d, 2 H) 7.47 (s, 1 H) 8.52 (d, 1 H) 10.94 (br. s., 1 H)。

實例 15：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 14 小時。在步驟 1.2 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 1 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.3 中，在 120°C 下攪拌反應混合物 2.5 小時。在步驟 1.4 中，在 83°C 下攪拌反應混合物 1 小時，且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.5 中，在 65°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，不純化粗產物。在步驟 1.7 中，使用 3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟 12.1)。

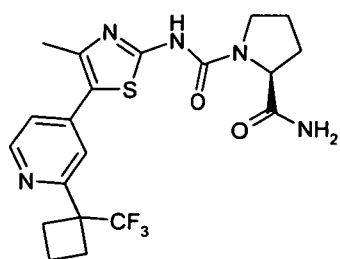
標題化合物：ESI-MS: 442.0  $[M+H]^+$ ； $t_R=3.02$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.35$ (DCM/MeOH, 9:1)。 $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ (ppm): 1.60 (s, 6 H) 1.70-1.95 (m, 3 H) 1.99-2.16 (m, 1 H) 2.40 (s, 3 H) 3.38-3.51 (m, 1 H) 3.51-3.69 (m, 1 H) 4.10-4.40 (m, 1 H) 6.95 (br. s., 1 H) 7.39 (d, 2 H) 7.53 (s, 1 H) 8.58 (d, 1 H) 10.93 (br. s., 1 H)。

在一替代程序中，類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物：使用 N,N-二甲基乙醯胺替代 DMF



且在 65°C 下攪拌混合物 2 小時。在步驟 1.1 中，使用氯甲酸苯酯(緩慢添加)替代 1,1'-羰基二咪唑且在 THF 中於 N,N-二乙基-異丙基胺存在下在室溫下進行反應(1.5 小時)。在步驟 1.2 中，(在回流下)於攪拌下加熱反應混合物 5 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.3 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.4 中，在甲苯中使用 1.1 當量之 POBr<sub>3</sub> 及 1.1 當量之三丙胺進行反應，且在 80°C 下攪拌混合物 2 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.5 中，在 65°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，使用甲苯替代苯且不純化粗產物。在步驟 1.7 中，使用 3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟 12.1)。

實例 16：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1-三氟甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

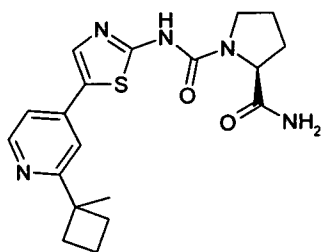


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 72 小時，以 DCM/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 DCM 萃取。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 1 小時。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時且在中止反應後以 DCM 萃取。在步驟 1.3 中，在 120°C 下攪拌反應混合物 6 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應，經矽藻土襯墊過濾且以 EtOAc 萃

取。在步驟1.4中，使用1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮2.26毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.5中，在室溫下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，在室溫下攪拌反應混合物18小時。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之1-三氟甲基-環丁烷羰基氯(步驟13.1)。使反應混合物經18小時達到室溫且在中止反應後以EtOAc萃取。

標題化合物：ESI-MS: 454.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.90$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.22$ (DCM/MeOH/氨水，91.5:7.5:1)。

實例17：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(1-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



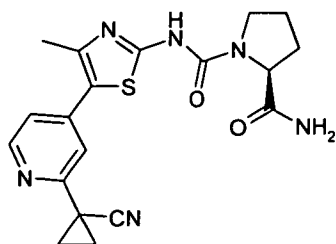
類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物24小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以EtOAc萃取。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物2小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用N-噻唑-2-基-乙醯胺。在100°C下攪拌反應混合物3小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己



烷/EtOAc, 25:75)純化殘餘物。在步驟1.5中, 在80°C下攪拌反應混合物2小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中, 將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後, 添加於THF中之氯化1-甲基-環丁烷(步驟6.1)且使反應混合物經18小時達到室溫。

標題化合物: ESI-MS: 386.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.32 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.05(DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

實例18: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(1-氟基-環丙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)

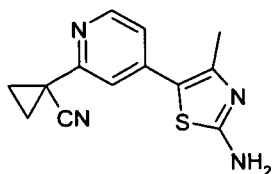


類似於實例1所述之程序, 但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中, 在室溫下攪拌反應混合物16小時, 以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以EtOAc萃取。在步驟1.1中, 使用1-[4-(2-氨基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丙腈(步驟18.1)且在回流下攪拌反應混合物2小時。

標題化合物: ESI-MS: 397.0 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.90 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.08(DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 1.69-1.93 (m, 7 H) 2.00-2.20 (m, 1 H) 2.42 (s, 3 H) 3.38-3.50 (m, 1 H) 3.50-3.65 (m, 1 H) 4.10-4.40 (m, 1 H) 6.94 (br. s., 1 H) 7.34 (dd, 1 H) 7.37

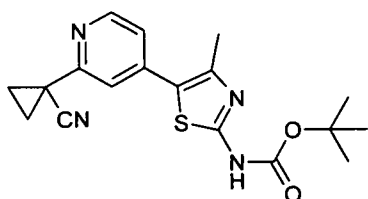
(br. s., 1 H) 7.47 (s, 1 H) 8.47 (d, 1 H)。

步驟 18.1：1-[4-(2-氨基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丙腈



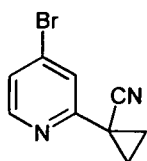
將 {5-[2-(1-氰基-環丙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-氨基甲酸第三丁酯 (步驟 18.2) (295 mg)、DCM (4 mL) 及 TFA (1 mL) 之混合物在室溫下攪拌 2 小時且隨後濃縮。藉由矽膠管柱層析 (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1) 純化殘餘物以得到 182 mg 標題化合物：ESI-MS: 257.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.54 min (系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.30 (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

步驟 18.2：{5-[2-(1-氰基-環丙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-氨基甲酸第三丁酯



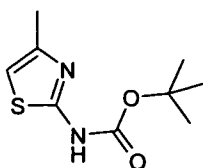
類似於步驟 1.3 所述之程序，但使用 1-(4-溴-吡啶-2-基)-環丙腈 (步驟 18.3) 及 (4-甲基-噻唑-2-基)-氨基甲酸第三丁酯 (步驟 18.4) 來製備標題化合物。在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。藉由矽膠管柱層析 (己烷/EtOAc, 1:1) 純化粗產物以得到 122 mg 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 357.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=4.86 min (系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.29 (Hex/EtOAc, 1:1)。

步驟 18.3：1-(4-溴-吡啶-2-基)-環丙腈



將LiHMDS(於甲苯中之1 M, 17.6 mL, 17.6 mmol, 3.1當量)逐滴添加至4-溴-2-氰-吡啶[Marsais, F.等人, Journal of Organic Chemistry, (1992), 57, 565-573](1 g, 5.7 mmol)、環丙腈(1.25 mL, 17 mmol, 3當量)、4 Å分子篩及甲苯(20 mL)之冷(-5°C)混合物中。使反應混合物升溫至室溫, 攪拌16小時, 傾入H<sub>2</sub>O中且過濾。以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋濾液且以EtOAc萃取。以H<sub>2</sub>O及鹽水洗滌有機相, 乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 9:1)純化殘餘物以得到620 mg呈白色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 223.1/225.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=4.22 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.25(己烷/EtOAc, 9:1)。

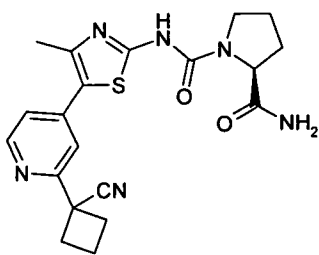
步驟 18.4：(4-甲基-噻唑-2-基)-胺基甲酸第三丁酯



將二碳酸二-第三丁酯(21 g, 96.5 mmol, 1.1當量)於*t*-BuOH(50 mL)中之溶液添加至4-甲基-2-胺基噻唑(10 g, 87.7 mmol)及DMAP(1.1 g, 8.8 mmol, 0.1當量)於*t*-BuOH(50 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物72小時且濃縮。以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋殘餘物且以EtOAc萃取。以

H<sub>2</sub>O及鹽水洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH，98:2)純化殘餘物以得到15.2 g呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 215.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=3.43 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.30 DCM/MeOH，98:2)。

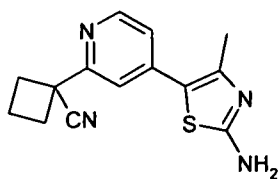
實例19：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(1-氰基-環丁基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物6小時。在步驟1.1中，使用1-[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丁腈(步驟19.1)且在回流下攪拌反應混合物3小時。

標題化合物：ESI-MS: 411.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.36 DCM/MeOH，9:1)。

步驟19.1：1-[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丁腈

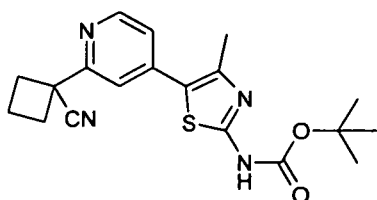


將{5-[2-(1-氰基-環丁基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯(步驟19.2)(300 mg)、DCM(5 mL)及



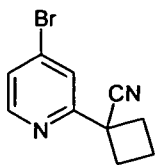
TFA(1 mL)之混合物在室溫下攪拌4小時，添加飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(50 mL)來中止反應且以DCM(3×75 mL)萃取。以飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2×50 mL)洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→96:4)純化殘餘物以得到181 mg呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 271.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.48 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.45(DCM/MeOH, 9:1)。

步驟19.2：{5-[2-(1-氟基-環丁基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯



類似於步驟1.3所述之程序，但使用1-(4-溴-吡啶-2-基)-環丁腈(步驟19.3)及(4-甲基-噻唑-2-基)-胺基甲酸第三丁酯(步驟18.4)來製備標題化合物。在100°C下攪拌反應混合物3小時。標題化合物：ESI-MS: 371.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=4.86 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.66(己烷/EtOAc, 1:1)。

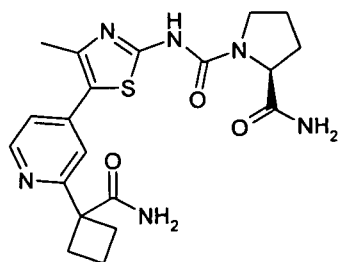
步驟19.3：1-(4-溴-吡啶-2-基)-環丁腈



將LiHMDS(於甲苯中之1 M, 17.7 mL, 17.7 mmol, 3.1當量)逐滴添加至4-溴-2-氟-吡啶[Marsais, F.等人, Journal of Organic Chemistry, (1992), 57, 565-573](1 g, 5.7 mmol)

及環丁腈(1.39 g, 17.1 mmol, 3當量)於甲苯(20 mL)中之冷(-5°C)溶液中。使反應混合物升溫至室溫，攪拌5小時，添加飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(50 mL)來中止反應且經矽藻土襯墊過濾。以EtOAc(3×75 mL)萃取濾液。以飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2×50 mL)洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:0→95:5)純化殘餘物以得到933 mg呈黃色油狀之標題化合物：ESI-MS: 237.0/239.0 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=4.27 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.30(己烷/EtOAc, 9:1)。

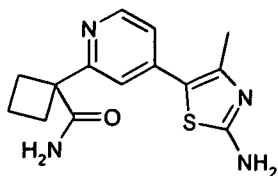
**實例 20：**(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(1-胺甲醯基-環丁基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物3小時。在步驟1.1中，使用1-[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丁烷甲酸醯胺(步驟20.1)且在回流下攪拌反應混合物12小時。

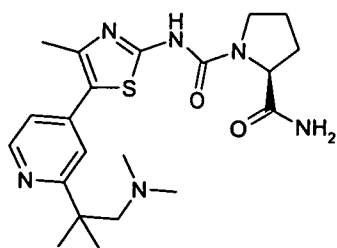
標題化合物：ESI-MS: 429.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.90 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.11(DCM/MeOH, 9:1)。

**步驟 20.1：**1-[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-吡啶-2-基]-環丁烷甲酸醯胺



將 {5-[2-(1-氨基-環丁基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-  
 胺基甲酸第三丁酯(步驟 19.2)(640 mg, 1.73 mmol)及濃硫  
 酸之混合物在 0°C 下攪拌 40 分鐘，使其升溫至室溫，攪拌 1  
 小時，添加飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (50 mL) 來中止反應且以  
 DCM(3×75 mL) 萃取。以飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (2×50 mL) 洗滌  
 有機相，乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析  
 (DCM/MeOH/氨水，99:0:1→93:6:1) 純化殘餘物以得到 35  
 mg 呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 289.1 [M+H]<sup>+</sup>；  
 TLC: R<sub>f</sub>=0.32(DCM/MeOH, 9:1)。

實例 21：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-二甲基  
 胺基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯  
 胺)

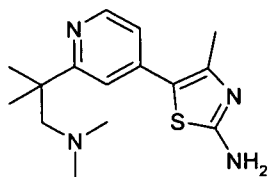


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化  
 合物。在步驟 1.1 中，使用 5-[2-(2-二甲基胺基-1,1-二甲基-  
 乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基胺(步驟 21.1)且在回流  
 下攪拌反應混合物 14 小時。

標題化合物：ESI-MS: 431.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.12

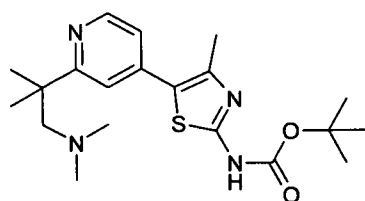
DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 21.1：5-[2-(2-二甲基氨基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基胺



類似於步驟 19.1 所述之程序，但使用 {5-[2-(2-二甲基氨基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯 (步驟 21.2) 且在室溫下攪拌反應混合物 2 小時來製備標題化合物。標題化合物：ESI-MS: 291.1 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.48 min(系統 1); TLC: R<sub>f</sub>=0.11 DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 21.2：{5-[2-(2-二甲基氨基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯



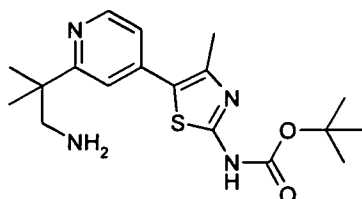
將甲醛 (36% 水溶液, 0.144 mL, 1.87 mmol, 2 當量) 添加至 {5-[2-(2-胺基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯 (步驟 21.3) (0.34 g, 0.94 mmol) 及乙醯氧基硼氫化鈉 (0.6 g, 2.82 mmol, 3 當量) 於 1,2-二氯乙烷 (10 mL) 中之混合物中。在室溫下攪拌反應混合物 1 小時且濃縮。藉由矽膠管柱層析 (DCM/MeOH/氨水, 99:0:1 → 97:2:1) 純化殘餘物以得到 0.222 g 呈白色固體





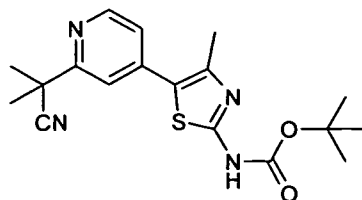
狀之標題化合物：ESI-MS: 391.2  $[M+H]^+$ ； $t_R=4.27$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.15$ (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 21.3：{5-[2-(2-氨基-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯



在氫氣氛圍下，將  $LiAlH_4$ (於 THF 中之 1 M, 3.06 mL, 3.06 mmol, 1.5 當量) 添加至 {5-[2-(氰基-二甲基-甲基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯 (步驟 21.4)(0.73 g, 2.04 mmol) 於 THF(10 mL) 中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物 2 小時，添加  $H_2O$ (20 mL) 來中止反應且以 EtOAc(2×75 mL) 萃取。以飽和  $NaHCO_3$  溶液(2×50 mL) 洗滌有機相，乾燥( $Na_2SO_4$ )，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH/氨水, 99:0:1→94:5:1) 純化殘餘物以得到 318 mg 呈棕色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 363.1  $[M+H]^+$ ；TLC:  $R_f=0.11$ (DCM/MeOH, 9:1)。

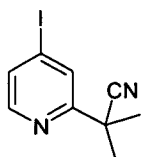
步驟 21.4：{5-[2-(氰基-二甲基-甲基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-胺基甲酸第三丁酯



類似於步驟 1.3 所述之程序，但使用 2-(4-碘-吡啶-2-基)-

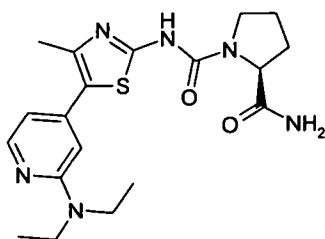
2-甲基-丙腈(步驟21.5)及(4-甲基-噻唑-2-基)-胺基甲酸第三丁酯(步驟18.4)來製備標題化合物。在100°C下攪拌反應混合物3小時。標題化合物：ESI-MS: 359.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.47(己烷/EtOAc, 1:1)。

步驟21.5：2-(4-碘-吡啶-2-基)-2-甲基-丙腈



類似於步驟19.3所述之程序，但使用2-氟-4-碘吡啶來製備標題化合物。標題化合物：ESI-MS: 273.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=4.22 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.36(己烷/EtOAc, 9:1)。

實例22：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-二乙基胺基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}

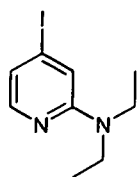


類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物1小時。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用二乙基-(4-碘-吡啶-2-基)-胺(步驟22.1)。在120°C下攪拌反應混合物16小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應，經矽藻土襯墊過濾且以EtOAc萃取。



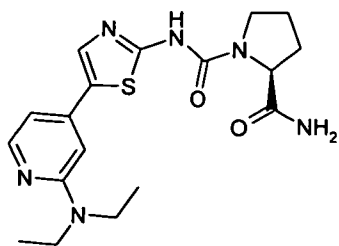
標題化合物：ESI-MS: 403.2  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.38$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.10$ (DCM/MeOH/氨水，91.5:7.5:1)。

步驟 22.1：二乙基-(4-碘-吡啶-2-基)-胺



將 2-氟-4-碘吡啶 (2 g, 8.97 mmol)、二乙胺 (2.77 ml, 26.9 mmol, 3當量) 及  $K_2CO_3$  (2.48 g, 17.94 mmol, 2當量) 於 DMF (20 mL) 中之混合物在  $100^\circ C$  下攪拌 18 小時，使其冷卻至室溫，以 EtOAc/ $H_2O$  稀釋且以 EtOAc 萃取。以  $H_2O$  及鹽水洗滌有機相，乾燥 ( $Na_2SO_4$ )，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析 (己烷/ $Et_2O$ , 98:2) 純化殘餘物以得到 2.3 g 呈黃色油狀之標題化合物：ESI-MS: 277.1  $[M+H]^+$ ；TLC:  $R_f=0.52$  己烷/ $Et_2O$ , 98:2)。

實例 23：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-二乙基氨基-吡啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺}

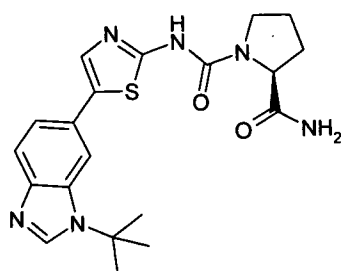


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 18 小時，以 DCM/ $H_2O$  稀釋來中止反應且以 DCM 萃取。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 1 小時。在步驟 1.2 中，在  $100^\circ C$

下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用二乙基-(4-碘-吡啶-2-基)-胺(步驟22.1)及N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物5小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應，經矽藻土襯墊過濾且以EtOAc萃取。

標題化合物：ESI-MS: 389.2 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.28 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.34(DCM/MeOH/氨水，91.5:7.5:1)。

實例24：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(3-第三丁基-3H-苯并咪唑-5-基)-噻唑-2-基]-醯胺}

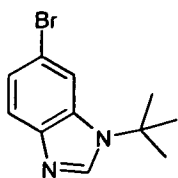


類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物5小時。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，使用6-溴-1-第三丁基-1H-苯并咪唑(步驟24.1)及N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物7小時。

標題化合物：ESI-MS: 413.2 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.29 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.45(DCM/MeOH，9:1)。

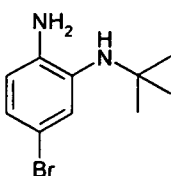
步驟24.1：6-溴-1-第三丁基-1H-苯并咪唑





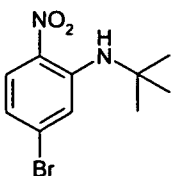
將 4-溴-N<sup>2</sup>-第三丁基-苯-1,2-二胺(步驟 24.2)(2.14 g, 8.80 mmol)及原甲酸三乙酯(14.7 mL, 88 mmol)之混合物在 148°C 下攪拌 1 小時，使其冷卻且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→99:1)純化殘餘物以得到 1.74 g 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 253.0/255.0 [M+H]<sup>+</sup>； $t_R=2.88$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.54$ (DCM/MeOH, 9:1)。

#### 步驟 24.2：4-溴-N<sup>2</sup>-第三丁基-苯-1,2-二胺



將 (5-溴-2-硝基-苯基)-第三丁基-胺(步驟 24.3)(6 g, 21.97 mmol)及阮尼鎳(2 g)於 MeOH/THF(1:1 v/v, 600 mL)中之懸浮液在室溫下於氫氣氛圍下攪拌 9 小時。經矽藻土襯墊過濾反應混合物且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 97:3→3:1)純化殘餘物以得到 4.4 g 呈黑色油狀之標題化合物：ESI-MS: 243.0/245.0 [M+H]<sup>+</sup>； $t_R=2.75$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.89$ (己烷/EtOAc, 1:1)。

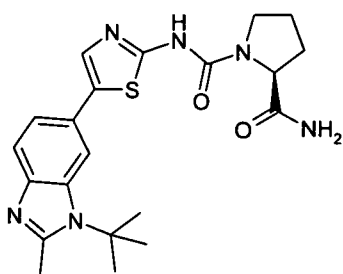
#### 步驟 24.3：(5-溴-2-硝基-苯基)-第三丁基-胺



將 4-溴-2-硝基苯(4 g, 18.2 mmol)及第三丁胺(4.78

mL, 45.5 mmol, 2.5當量)於EtOH(80 mL)中之混合物在85°C下攪拌15小時,使其冷卻且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:0→99:1)純化殘餘物以得到4.8 g呈橙色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 273.0/275.0 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=5.68 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.49(己烷/EtOAc, 9:1)。

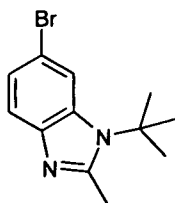
**實例 25:** (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(3-第三丁基-2-甲基-3H-苯并咪唑-5-基)-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例1所述之程序,但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中,在回流下攪拌反應混合物14小時。在步驟1.2中,在85°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中,使用6-溴-1-第三丁基-2-甲基-1H-苯并咪唑(步驟25.1)及N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物5小時。

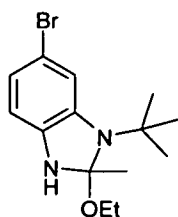
標題化合物: ESI-MS: 427.2 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.37 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.38(DCM/MeOH, 9:1)。

**步驟 25.1:** 6-溴-1-第三丁基-2-甲基-1H-苯并咪唑



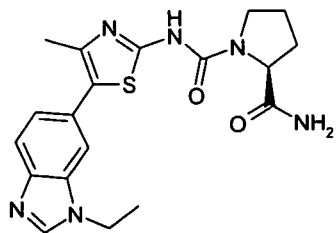
將 6-溴-1-第三丁基-2-乙氧基甲基-2-甲基-2,3-二氫-1H-苯并咪唑(步驟 25.2)(2.04 g, 6.51 mmol)及 TFA(10 ml)之混合物在室溫下攪拌隔夜，添加飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液(100 mL)來中止反應且以 EtOAc(2×150 mL)萃取。以飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液(2×50 mL)洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→98:2)純化殘餘物以得到 1.05 g 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 267.0/269.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.99 min(系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.58 (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 25.2：6-溴-1-第三丁基-2-乙氧基甲基-2-甲基-2,3-二氫-1H-苯并咪唑



將 4-溴-N,N'-第三丁基-苯-1,2-二胺(步驟 24.2)(2.14 g, 8.80 mmol)及原乙酸三乙酯(16.2 mL, 88 mmol, 10當量)之混合物在 142°C 下攪拌 1 小時，使其冷卻且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:0→95:5)純化殘餘物以得到 2.04 g 呈紫色油狀之標題化合物：ESI-MS: 313.0/315.0 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.67(己烷/EtOAc, 9:1)。

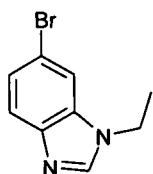
實例 26：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[[5-(3-乙基-3H-苯并咪唑-5-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物15小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物3小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，使用6-溴-1-乙基-1H-苯并咪唑(步驟26.1)及N-噻唑-2-基-乙醯胺。在120°C下攪拌反應混合物14小時。

標題化合物：ESI-MS: 399.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=1.73$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.25$ (DCM/MeOH, 9:1)。

#### 步驟26.1：6-溴-1-乙基-1H-苯并咪唑

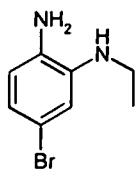


將4-溴-N\*2\*-乙基-苯-1,2-二胺(步驟26.2)(2 g, 9.3 mmol)及原甲酸三乙酯(15.5 mL, 93 mmol, 10當量)之混合物在148°C下攪拌1小時，使其冷卻且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 1:0→98:2)純化殘餘物以得到2.05 g 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 225.1/227.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.31$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.58$ (DCM/ eOH, 9:1)。

#### 步驟26.2：4-溴-N\*2\*-乙基-苯-1,2-二胺

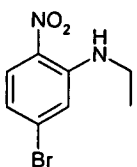






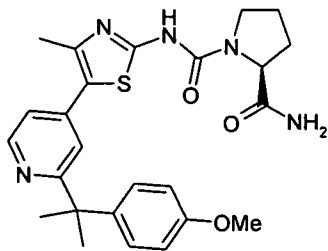
將(5-溴-2-硝基-苯基)-乙基-胺(步驟26.3)(6 g, 24.48 mmol)及阮尼鎳(2 g)於MeOH/THF(1:1 v/v, 600 mL)中之懸浮液在室溫下於氫氣氛圍下攪拌9小時。經矽藻土襯墊過濾反應混合物且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 95:5→85:15)純化殘餘物以得到4.51 g呈黑色油狀之標題化合物: ESI-MS: 213.1/215.1 [M-H]<sup>-</sup>; t<sub>R</sub>=2.53 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.57(己烷/EtOAc, 1:1)。

#### 步驟26.3: (5-溴-2-硝基-苯基)-乙基-胺



將4-溴-2-硝基-苯(6 g, 27.3 mmol)、甲胺(於MeOH中之2 M, 34.1 mL, 68.2 mmol, 2.5當量)及EtOH(80 mL)之混合物在85°C下攪拌15小時, 使其冷卻且濃縮。藉由濕磨純化殘餘物以得到6 g呈黃色固體狀之標題化合物: t<sub>R</sub>=5.13 min(系統1)。

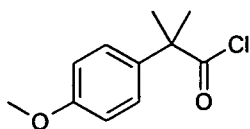
實例27: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-[(5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-吡啶-4-基}-4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺]



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物24小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物2小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，在100°C下攪拌反應混合物3小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應，且以EtOAc萃取。在步驟1.4中，使用1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮4.3毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物1小時，傾入飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液中且以DCM萃取。在步驟1.5中，在80°C下攪拌反應混合物23小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，在室溫下攪拌反應混合物21小時。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之2-(4-甲氧基-苯基)-2-甲基-丙醯氯(步驟27.1)且使反應混合物經16小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 480.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=3.05 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.13(DCM/MeOH/氨水，94:5:1)。

步驟27.1：2-(4-甲氧基-苯基)-2-甲基-丙醯氯

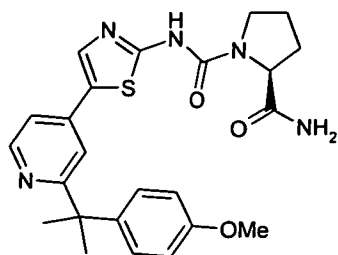


類似於步驟5.1所述之程序，但使用2-(4-甲氧基-苯基)-



2-甲基-丙酸且在回流下攪拌反應混合物3小時來製備標題化合物。

實例 28：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-吡啶-4-基}-噻唑-2-基)-醯胺]

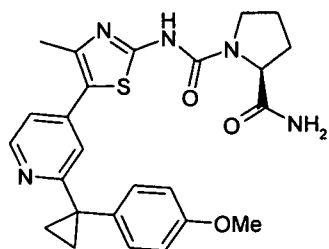


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 16 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 2 小時且在中止反應後以 DCM 萃取。在步驟 1.3 中，使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺。在 100°C 下攪拌反應混合物 5 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。在步驟 1.4 中，使用 1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮 4.3 毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物 1 小時，傾入飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中且以 DCM 萃取。在步驟 1.5 中，在 80°C 下攪拌反應混合物 23 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，在室溫下攪拌反應混合物 21 小時。在步驟 1.7 中，將於 THF 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至 LiHMDS 於 THF 中之冷(-78°C)溶液中。30 分鐘後，添加於 THF 中之 2-(4-甲氧基-苯基)-2-甲基-丙醯氯(步驟 27.1)且使反應混合物經 16 小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 466.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.91 min(系統

1) ; TLC:  $R_f=0.23$ (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

實例 29 : (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-環丙基]-吡啶-4-基}-4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺]

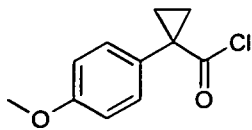


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 21 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 3 小時且在中止反應後以 DCM 萃取。在步驟 1.3 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 6 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。在步驟 1.4 中，使用 1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮 4.3 毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物 1 小時，傾入飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中且以 DCM 萃取。在步驟 1.5 中，在 80°C 下攪拌反應混合物 18 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，在室溫下攪拌反應混合物 18 小時。在步驟 1.7 中，將於 THF 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至 LiHMDS 於 THF 中之冷(-78°C)溶液中。30 分鐘後，添加於 THF 中之 1-(4-甲氧基-苯基)-環丙烷羰基氯(步驟 29.1)且使反應混合物經 16 小時達到室溫。

標題化合物 : ESI-MS: 478.1 [M+H]<sup>+</sup> ; t<sub>R</sub>=2.65 min(系統 1) ; TLC:  $R_f=0.09$ (DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

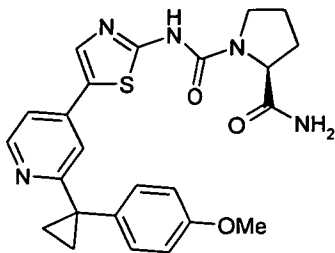
步驟 29.1 : 1-(4-甲氧基-苯基)-環丙烷羰基氯





類似於步驟 5.1 所述之程序，但使用 1-(4-甲氧基-苯基)-環丙基甲酸且在回流下攪拌反應混合物 3 小時來製備標題化合物。

實例 30：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-環丙基]-吡啶-4-基}-噻唑-2-基)-醯胺]

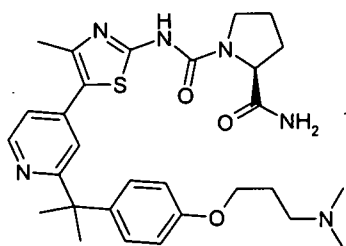


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 16 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 3 小時且在中止反應後以 DCM 萃取。在步驟 1.3 中，使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺。在 100°C 下攪拌反應混合物 28 小時，以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應且以 EtOAc 萃取。在步驟 1.4 中，使用 1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮 4.3 毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物 1 小時，傾入飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中且以 DCM 萃取。在步驟 1.5 中，在 80°C 下攪拌反應混合物 18 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，在室溫下攪拌反應混合物 18 小時。在步驟 1.7 中，將於 THF 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至 LiHMDS 於 THF 中之冷(-78°C)溶液中。30 分鐘後，添加於 THF 中之 1-

(4-甲氧基-苯基)-環丙烷羰基氯(步驟29.1)且使反應混合物經16小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 464.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.90$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.06$ (DCM/MeOH/氨水，94:5:1)。

實例31：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-{1-[4-(3-二甲基胺基-丙氧基)-苯基]-1-甲基-乙基}-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}

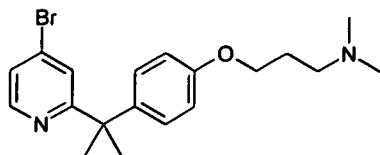


類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物7小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用(3-{4-[1-(4-溴-吡啶-2-基)-1-甲基-乙基]-苯氧基}-丙基)-二甲基-胺(步驟31.1)。在120°C下攪拌反應混合物2小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以EtOAc萃取。

標題化合物：ESI-MS: 551.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=2.38$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.05$ (DCM/MeOH/氨水，94:5:1)。

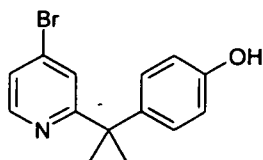
步驟31.1：(3-{4-[1-(4-溴-吡啶-2-基)-1-甲基-乙基]-苯氧基}-丙基)-二甲基-胺





將氫氧化鈉(細粉狀球粒, 0.488 g, 12.2 mmol, 5當量)添加至 4-[1-(4-溴-吡啶-2-基)-1-甲基-乙基]-酚(步驟 31.2)(0.714 g, 2.44 mmol)於 DMF(5 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌混合物 20 min。添加 3-二甲基胺基-1-丙基氯鹽酸鹽(0.611 g, 3.87 mmol, 1.6當量)。加熱反應混合物至 90°C, 攪拌 10 小時, 使其冷卻, 以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋且以 EtOAc 萃取。以 H<sub>2</sub>O 及鹽水洗滌有機相, 乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)純化殘餘物以得到 0.398 g 呈不純棕色油狀之標題化合物, 其未經進一步純化即使用: ESI-MS: 377.1/379.0 [M+H]<sup>+</sup>; TLC: R<sub>f</sub>=0.22(DCM/MeOH/氨水, 94:5:1)。

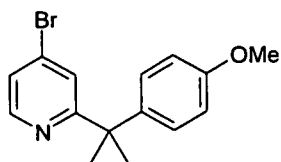
**步驟 31.2: 4-[1-(4-溴-吡啶-2-基)-1-甲基-乙基]-酚**



在氫氣氛圍下, 將 BBr<sub>3</sub>(於 DCM 中之 1 M, 23 mmol, 8 當量)逐滴添加至 4-溴-2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-吡啶(步驟 31.3)(0.878 g, 2.87 mmol)於 DCM(42 mL)中之冷(0°C)溶液中。在 0°C 下攪拌反應混合物 1 小時, 使其升溫至室溫, 攪拌 18 小時, 冷卻至 0°C 且添加無水 MeOH 來中止反應。濃縮混合物, 以 6 M HCl 水溶液稀釋, 攪拌 1 小時, 中和至 pH 7 且以 DCM 萃取。乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)有機相, 過濾且濃

縮。殘餘物未經純化即使用。

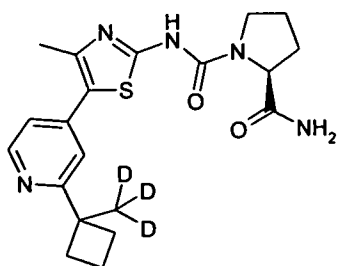
步驟 31.3：4-溴-2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-吡啶



類似於步驟 1.4 至 1.7 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟 1.4 中，使用 1,2-二氯乙烷(每毫莫耳吡啶-4-酮 4.3 毫升)作為溶劑。在回流下攪拌反應混合物 1 小時，傾入飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液中且以 DCM 萃取。在步驟 1.5 中，在  $80^\circ\text{C}$  下攪拌反應混合物 23 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，在室溫下攪拌反應混合物 21 小時。在步驟 1.7 中，將於 THF 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至 LiHMDS 於 THF 中之冷 ( $-78^\circ\text{C}$ ) 溶液中。30 分鐘後，添加於 THF 中之 2-(4-甲氧基-苯基)-2-甲基-丙醯氯(步驟 27.1) 且使反應混合物經 16 小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 306.0/308.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ； $t_{\text{R}}=3.94$  min(系統 1)；TLC:  $R_{\text{f}}=0.55$ (己烷/EtOAc, 7:3)。

實例 32：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1- $d_3$ -甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化

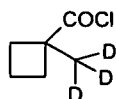




合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物1小時。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，將鈀催化劑添加至剩餘試劑之經加熱混合物中且在120°C下攪拌所得混合物1小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:4)純化殘餘物。在步驟1.5中，在80°C下攪拌反應混合物3小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之氯化1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁烷(步驟32.1)且使反應混合物經16小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 403.2 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.22 DCM/MeOH/氨水, 91.5:7.5:1)。

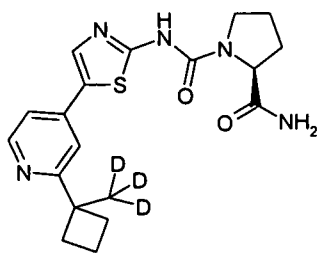
#### 步驟32.1：1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁烷羧基氯



類似於步驟5.1所述之程序，但使用1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁烷甲酸來製備標題化合物，1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁烷甲酸係根據所述程序 [Cowling, S. J.; Goodby, J. W., Chemical Communications, (2006), (39), 4107-4109]，但使用 *d*<sub>3</sub>-甲基-碘來製備。

實例33：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-

環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

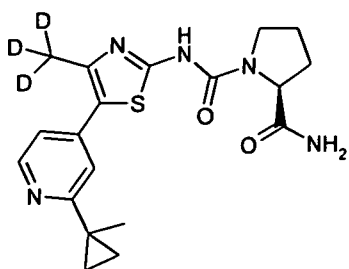


類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物1小時。在步驟1.2中，在100°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。在步驟1.3中，使用N-噻唑-2-基-乙醯胺。將鈀催化劑添加至剩餘試劑之經加熱混合物中。在120°C下攪拌所得混合物7小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋，經矽藻土襯墊過濾且以EtOAc萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:4)純化殘餘物。在步驟1.5中，在80°C下攪拌反應混合物3小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，將於THF中之4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至LiHMDS於THF中之冷(-78°C)溶液中。30分鐘後，添加於THF中之氯化1-d<sub>3</sub>-甲基-環丁烷(步驟32.1)且使反應混合物經16小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 389.2 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.30 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.11(DCM/MeOH/氨水, 91.5:7.5:1)。

實例34：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-d<sub>3</sub>-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

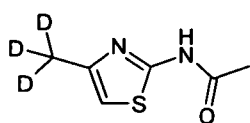




類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物8小時。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，使用2-乙醯胺基-4- $d_3$ -甲基-噻唑(步驟34.1)。在120°C下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.5中，在65-70°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.7中，使用1-甲基-環丙烷羰基氯(步驟5.1)。

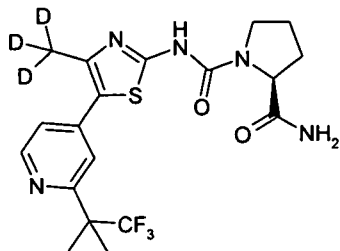
標題化合物：ESI-MS: 389.2  $[M+H]^+$  ;  $t_R=2.12$  min(系統1); TLC:  $R_f=0.35$ (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟34.1：2-乙醯胺基-4- $d_3$ -甲基-噻唑



將1-溴-丙-2-酮- $d_5$ [Challacombe, K.等人，Journal of the Chemical Society Perkin Trans. I, (1988), 2213-2218](1.25 g, 8.8 mmol)及1-乙醯基-2-硫脲(1 g, 8.8 mmol)於EtOH(20 mL)中之混合物在85°C下攪拌2小時，使其冷卻且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 85:15→1:1)純化殘餘物以得到1.08 g呈橙色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 160.0  $[M+H]^+$  ; TLC:  $R_f=0.25$ (己烷/EtOAc, 1:1)。

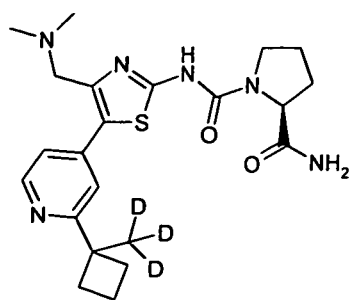
實例 35：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4- $d_3$ -甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 8 小時。在步驟 1.2 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 1 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.3 中，使用 2-乙醯胺基-4- $d_3$ -甲基-噻唑(步驟 34.1)。在 120°C 下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.4 中，在 83°C 下攪拌反應混合物 1 小時，且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.5 中，在 65°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，不純化粗產物。在步驟 1.7 中，使用 3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟 12.1)。

標題化合物：API-ES-MS: 445.1  $[M+H]^+$ ;  $t_R=3.00$  min(系統 1); TLC:  $R_f=0.51$ (DCM/MeOH, 9:1)。

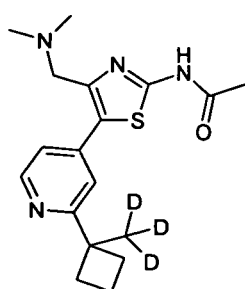
實例 36：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-二甲基胺基甲基-5-[2-(1- $d_3$ -甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例1所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.2中，使用N-{4-二甲基胺基甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺(步驟36.1)。在100°C下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以DCM萃取。

標題化合物：ESI-MS: 446.1 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.40 (DCM/MeOH/氨水，89:10:1)。

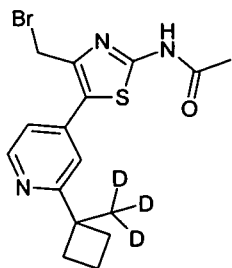
步驟36.1：N-{4-二甲基胺基甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺



將N-{4-溴甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺(步驟36.2)(150 mg, 0.391 mmol)、二甲胺鹽酸鹽(38.3 mg, 0.470 mmol, 1.2當量)及碳酸鈉(293 mg, 0.900 mmol, 2.3當量)於DMF(2 mL)中之混合物在室溫下攪拌2小時，以EtOAc/H<sub>2</sub>O稀釋且以EtOAc萃取。以

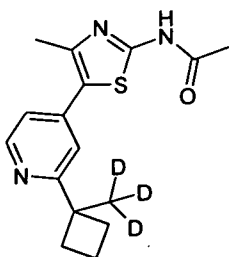
H<sub>2</sub>O及鹽水洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。在Et<sub>2</sub>O中濕磨來純化殘餘物以得到89 mg呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 348.2 [M+H]<sup>+</sup>。

步驟36.2：N-{4-溴甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺



將NBS(554 mg, 3.06 mmol, 1.1當量)添加至N-{4-甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺(步驟36.3)(846 mg, 2.78 mmol)於CCl<sub>4</sub>(20 mL)及CHCl<sub>3</sub>(16 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物1小時，以H<sub>2</sub>O及鹽水洗滌，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:4)純化殘餘物以得到572 mg呈淺黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 383.0/385.0 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=3.12 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.45(己烷/EtOAc, 1:4)。

步驟36.3：N-{4-甲基-5-[2-(1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺

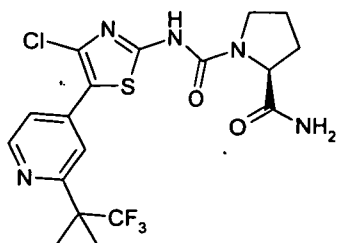


類似於步驟1.3至1.7所述之程序，但依以下修改來製備

標題化合物。在步驟 1.3 中，在 120°C 下攪拌反應混合物 1 小時，且以 EtOAc/H<sub>2</sub>O 稀釋來中止反應。在步驟 1.5 中，在 80°C 下攪拌反應混合物 3 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.7 中，將於 THF 中之 4-甲氧基-3-丁烯-2-酮添加至 LiHMDS 於 THF 中之冷 (-78°C) 溶液中。30 分鐘後，添加於 THF 中之氯化 1-*d*<sub>3</sub>-甲基-環丁烷(步驟 32.1)且使反應混合物經 16 小時達到室溫。

標題化合物：ESI-MS: 305.2 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.24(己烷/EtOAc, 1:4)。

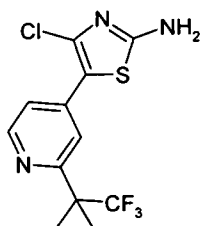
實例 37：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-氯-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



將 4-氯-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基胺(步驟 37.1)(100 mg, 0.311 mmol)及碳醯氯(0.164 mL, 0.311 mmol)於吡啶(2 mL)中之混合物在 105°C 下攪拌 1 小時。添加 L-脯胺醯胺(106 mg, 0.932 mmol, 3 當量)。在 105°C 下攪拌所得混合物 30 分鐘，使其冷卻，添加飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液(100 mL)來中止反應且以 EtOAc(2×100 mL)萃取。以飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液(100 mL)洗滌有機相，乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 5

99:1→94:6)純化殘餘物以得到46 mg呈黃色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 461.9  $[M+H]^+$ ； $t_R=3.60$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.28$ (DCM/MeOH, 9:1)。

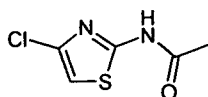
步驟37.1：4-氯-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基胺



類似於步驟1.2至1.7所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.2中，在85°C下攪拌反應混合物3小時且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.3中，使用N-(4-氯-噻唑-2-基)-乙醯胺(步驟37.2)。在120°C下攪拌反應混合物2小時。在步驟1.4中，在83°C下攪拌反應混合物1小時，且在中止反應後以EtOAc萃取。在步驟1.5中，在65°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，不純化粗產物。在步驟1.7中，使用3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟12.1)。

標題化合物：ESI-MS: 322.1  $[M+H]^+$ ； $t_R=3.58$  min(系統1)；TLC:  $R_f=0.45$ (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟37.2：N-(4-氯-噻唑-2-基)-乙醯胺



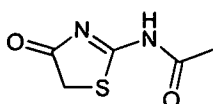
將N-(4-側氧基-4,5-二氫-噻唑-2-基)-乙醯胺(步驟37.3)





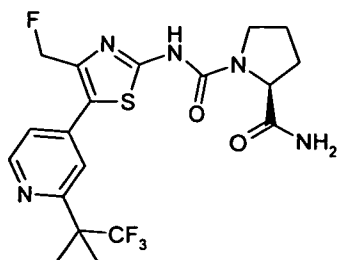
(14.8 g, 94 mmol)及POCl<sub>3</sub>(175 mL, 20當量)之混合物加熱至105°C, 攪拌15分鐘, 使其冷卻且濃縮。將殘餘物傾於冰-H<sub>2</sub>O上且以EtOAc(2×100 mL)萃取。以飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2×100 mL)洗滌有機相, 乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH, 99:1)純化殘餘物以得到13.9 g呈白色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 177.0 [M+H]<sup>+</sup>; t<sub>R</sub>=2.74 min(系統1); TLC: R<sub>f</sub>=0.66 DCM/MeOH, 9:1)。

**步驟37.3: N-(4-側氧基-4,5-二氫-噻唑-2-基)-乙醯胺**



將假硫代乙內醯脲(16 g, 138 mmol)及乙酸酐(16.9 mL, 179 mmol, 1.3當量)於吡啶(150 mL)中之混合物加熱至115°C, 攪拌1小時且使其冷卻。藉由過濾收集所得沈澱物以得到12.64 g呈棕色固體狀之標題化合物: ESI-MS: 159.0 [M+H]<sup>+</sup>。

**實例38: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-氟甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)**

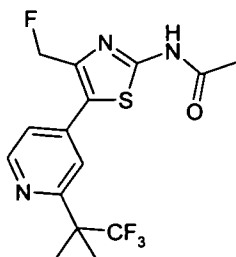


類似於實例1所述之程序, 但依以下修改來製備標題化

合物。在實例1中，在室溫下攪拌反應混合物18小時，以DCM/H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應且以DCM萃取。在步驟1.1中，在回流下攪拌反應混合物1小時，濃縮且所得粗物質未經純化即使用。在步驟1.2中，使用N-{4-氟甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺(步驟38.1)。在100°C下攪拌反應混合物1小時且在中止反應後以DCM萃取。不純化粗物質。

標題化合物：ESI-MS: 460.0 [M+H]<sup>+</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.44 (DCM/MeOH/氨水，91.5:7.5:1)。

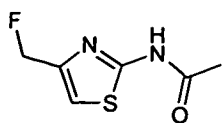
步驟38.1：N-{4-氟甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-乙醯胺



類似於步驟1.3至1.7所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在步驟1.3中，使用N-(4-氟甲基-噻唑-2-基)-乙醯胺(步驟38.2)。在90°C下攪拌反應混合物7小時，在100°C下攪拌5小時且以EtOAc及H<sub>2</sub>O稀釋來中止反應。在步驟1.5中，在65°C下攪拌反應混合物1小時且不在MeOH中進行濕磨。在步驟1.6中，不純化粗產物。在步驟1.7中，使用3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟12.1)。

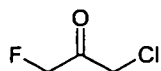
標題化合物：ESI-MS: 362.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=4.18 min(系統1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.29(己烷/EtOAc，1:1)。

步驟 38.2：N-(4-氟甲基-噻唑-2-基)-乙醯胺



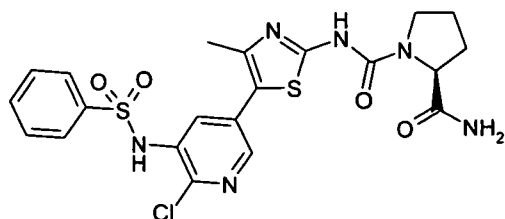
將 1-氯-3-氟-丙-2-酮(步驟 38.3)(1.14 g, 10.3 mmol)及 N-乙醯基-2-硫脲(1.22 g, 10.3 mmol)於 EtOH(10 mL)中之混合物在回流下攪拌 1.5 小時，使其冷卻且濃縮。將殘餘物溶解於 DCM/H<sub>2</sub>O 中且以 DCM 萃取。乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 有機相，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(己烷/EtOAc, 1:1)純化殘餘物以得到 0.143 g 標題化合物：ESI-MS: 173.1 [M-H]<sup>-</sup>；t<sub>R</sub>=1.98 min(系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.21(己烷/EtOAc, 1:1)。

步驟 38.3：1-氯-3-氟-丙-2-酮



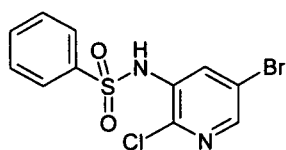
將 1-氯-3-氟異丙醇(2.7 mL, 31.2 mmol)緩慢添加至含有經冷卻至 5°C 之 30 mL 瓊斯試劑(Jones' reagent)(藉由將 230 mL 濃硫酸添加至於 700 mL H<sub>2</sub>O 中之 267 g 三氧化鉻中且以 H<sub>2</sub>O 稀釋至 1 L 來製備)之燒瓶中。使反應混合物升溫至室溫，攪拌 18 小時，傾入飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中且以 Et<sub>2</sub>O 萃取。以鹽水洗滌有機相，乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM)純化殘餘物以得到 1.14 g 呈不純黃色油狀之標題化合物。

實例 39：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[[5-(5-苯磺醯胺基-6-氯-吡啶-3-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於步驟 1.3 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。使用 (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺](步驟 39.2) 及 N-(5-溴-2-氯-吡啶-3-基)-苯磺醯胺(步驟 39.1)。將鈀催化劑添加至剩餘試劑之經加熱混合物中且在 135°C 下攪拌所得混合物 3 小時，以 EtOAc 及 H<sub>2</sub>O 稀釋，經矽藻土襯墊過濾且以 EtOAc 萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析及逆相 HPLC 純化殘餘物。標題化合物：ESI-MS: 519.0/521.1 [M-H]<sup>-</sup>；t<sub>R</sub>=3.33 min(系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.09(DCM/MeOH/氨水，84:15:1)。

#### 步驟 39.1：N-(5-溴-2-氯-吡啶-3-基)-苯磺醯胺

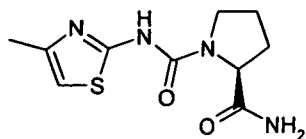


在氫氣氛圍下，經 15 min 將苯磺醯氯(1.23 mL，9.62 mmol，2 當量)於 DCM(50 mL)中之溶液逐滴添加至 3-胺基-5-溴-2-氯吡啶 [Jouve, K.; Bergman, J., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, (2003), 40(2), 261-268](1 g，4.81 mmol) 及吡啶(1.94 ml，24 mmol，5 當量)於 DCM(20 mL)中之溶液中。在室溫下攪拌所得混合物 20 小時，濃縮，以 H<sub>2</sub>O 稀釋且以 DCM 萃取。以鹽水洗滌有機相，乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，過濾且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM)純化殘



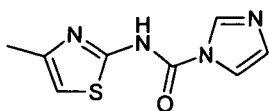
餘物以得到 163 mg 呈白色固體狀之標題化合物：ESI-MS: 346.9  $[M-H]^-$ ； $t_R=4.33$  min(系統 1)；TLC:  $R_f=0.23$ (DCM)。

步驟 39.2：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺]



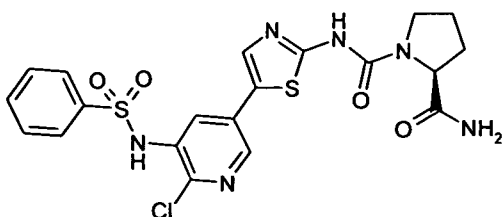
類似於實例 1 所述之程序，但使用咪唑-1-甲酸(4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺(步驟 39.3)製備標題化合物。在室溫下攪拌反應混合物 18 小時且濃縮。藉由矽膠管柱層析(DCM/MeOH/氨水，94:5:1)，接著在 Et<sub>2</sub>O 中濕磨來純化殘餘物。標題化合物：ESI-MS: 253.2  $[M-H]^-$ ；TLC:  $R_f=0.18$  DCM/MeOH/氨水，84:15:1)。

步驟 39.3：咪唑-1-甲酸(4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺



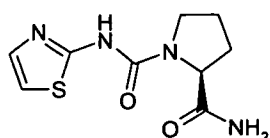
類似於步驟 1.1 所述之程序，但使用 2-乙醯胺基-4-甲基噻唑且在回流下攪拌反應混合物 5.5 小時來製備標題化合物。

實例 40：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(5-苯磺醯胺基-6-氯-吡啶-3-基)-噻唑-2-基]-醯胺}



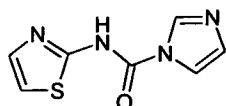
類似於步驟 1.3 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。使用 (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-噻唑-2-基醯胺 (步驟 40.1) 及 N-(5-溴-2-氯-吡啶-3-基)-苯磺醯胺 (步驟 39.1)。將鈀催化劑添加至剩餘試劑之經加熱混合物中且在 120°C 下攪拌所得混合物 6 小時，濃縮，以 DCM/MeOH 稀釋，經矽藻土襯墊過濾且濃縮濾液。藉由矽膠管柱層析及逆相 HPLC 純化殘餘物。標題化合物：ESI-MS: 506.9  $[M+H]^+$ ;  $t_R=3.21$  min(系統 1)。

**步驟 40.1：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-噻唑-2-基醯胺**



類似於實例 1 所述之程序，但使用咪唑-1-甲酸噻唑-2-基醯胺 (步驟 40.2) 來製備標題化合物。在室溫下攪拌反應混合物 18 小時且濃縮。藉由矽膠管柱層析 (DCM/MeOH/氨水，94:5:1)，接著在 EtOAc 中濕磨來純化殘餘物。標題化合物：ESI-MS: 239.2  $[M-H]^-$ ; TLC:  $R_f=0.11$  (DCM/MeOH/氨水，84:15:1)。

**步驟 40.2：咪唑-1-甲酸噻唑-2-基醯胺**

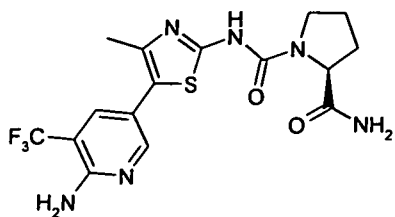


類似於步驟 1.1 所述之程序，但使用 N-噻唑-2-基-乙醯胺且在回流下攪拌反應混合物 5 小時來製備標題化合物。

**實例 41：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-噻唑-2-基醯胺 1-[[5-(6-胺基-5-三**

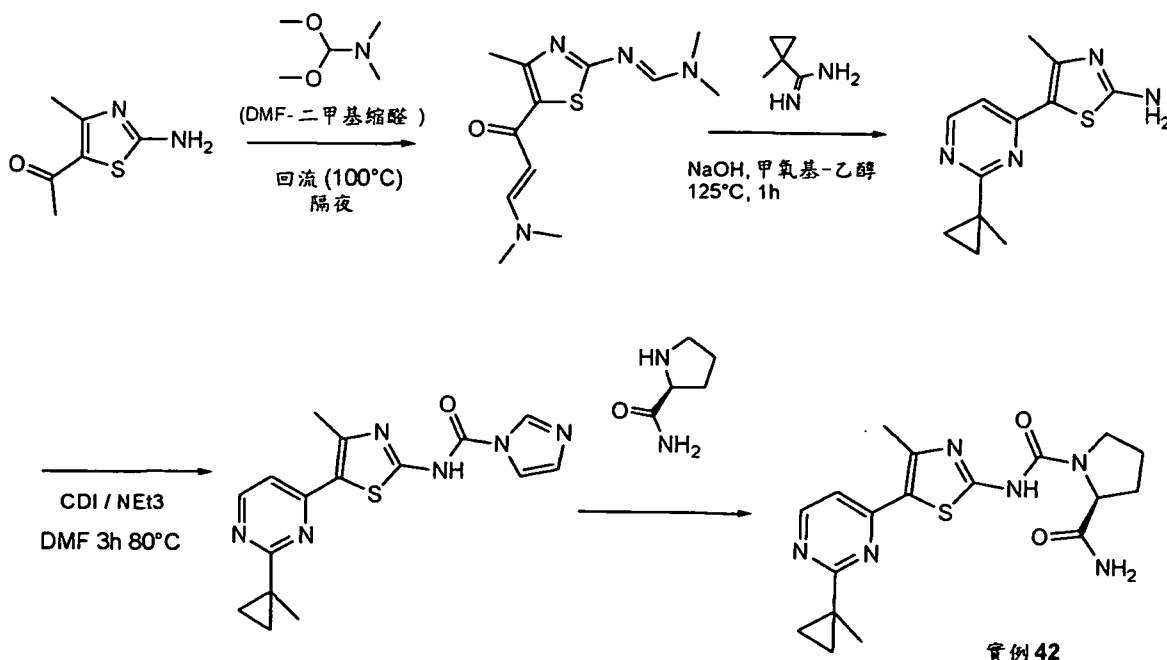


氣甲基-吡啶-3-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於步驟 1.3 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。使用 (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺](步驟 39.2) 及 5-溴-3-三氟甲基-吡啶-2-基胺 (WO 2007095588)。將鈀催化劑添加至剩餘試劑之經加熱混合物中且在 120°C 下攪拌所得混合物 3 小時，以 DCM/H<sub>2</sub>O 稀釋且以 DCM 萃取。乾燥且濃縮有機相後，藉由矽膠管柱層析及逆相 HPLC 純化殘餘物。標題化合物：ESI-MS: 413.1 [M-H]<sup>-</sup>；TLC: R<sub>f</sub>=0.27(DCM/MeOH/氨水，89:10:1)。

實例 42：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)

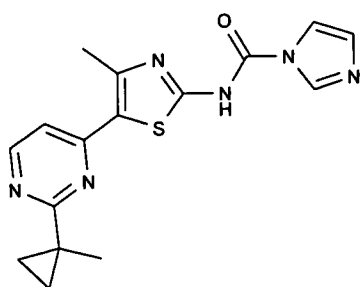


實例 42

在室溫下，將咪唑-1-甲酸 {4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙

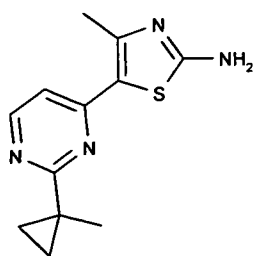
基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺(4.0 g)添加至L-脯胺醯胺(1.48 g)及三乙胺(4.1 ml)於DMF(46 ml)中之攪拌溶液中。使反應混合物在室溫下靜置22小時，蒸發，且在以甲醇(60 ml)及水(20 ml)結晶後獲得呈白色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間1.24分鐘，M+H 387.1及M-H 385.2。

步驟42.1：咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺



在室溫下將羧基咪唑(4.56 g)添加至4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺(10.5 g)及三乙胺(4.28 ml)於DMF(26 ml)中之溶液中，且隨後在80°C下加熱2小時。冷卻後，藉由過濾分離標題化合物。

步驟42.2：4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺

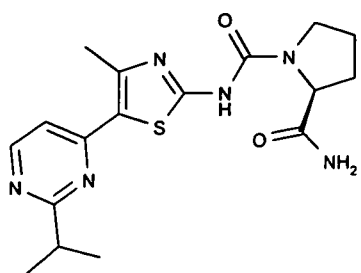


將粉狀氫氧化鈉(5.86 g)添加至N'-[5-(3-二甲基胺基-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(13 g，如S.



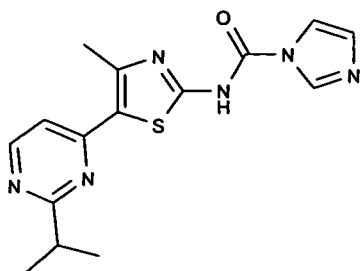
Wang 等人, J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675 所述來製備)及 1-甲基-環丙烷甲脒鹽酸鹽(7.2 g, 如 EP 0227415 所述來製備)於 2-甲氧基乙醇(98 ml)中之溶液中且在 125°C 於攪拌下加熱混合物 1 小時。冷卻反應混合物, 添加水且藉由過濾分離標題化合物。ESI-MS: M+H 247 及 M-H 245。

**實例 43: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-異丙基-嘓啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}**



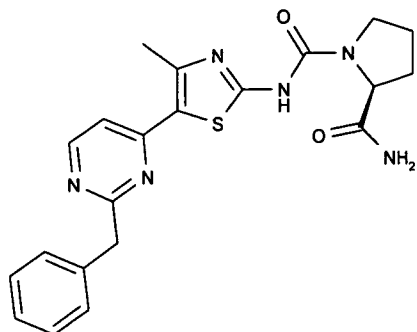
在室溫下, 將咪唑-1-甲酸[5-(2-異丙基-嘓啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺(50 mg)添加至 L-脯胺醯胺(19 mg)及三乙胺(26  $\mu$ l)於 DMF(152  $\mu$ l)中之溶液中。在 40°C 下攪拌混合物 2 小時且隨後藉由製備型逆相層析來純化。以 300 mg BondElut SPE, SCX 筒捕獲含有標題化合物之溶離份且隨後與 7 M 氨之甲醇溶液(1 ml)一起釋放。藉由蒸發獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 275 及 M-H 273。

**步驟 43.1: 咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-異丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺**



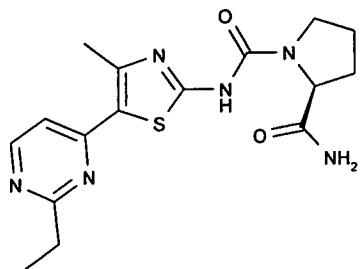
類似於實例 42 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。

實例 44：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-苄基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-苄基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 423 及 M-H 421。

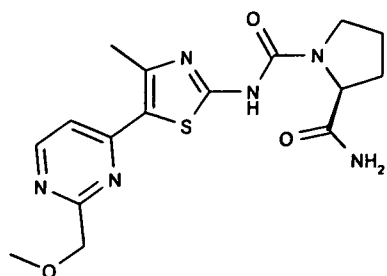
實例 45：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[5-(2-乙基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-乙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 361 及 M-H 359。

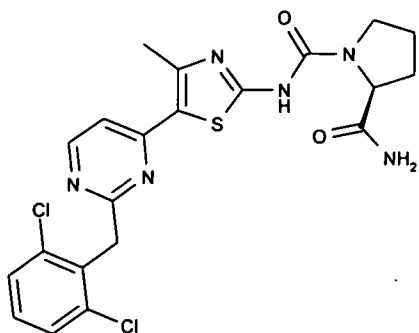


實例 46：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-甲氧基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}



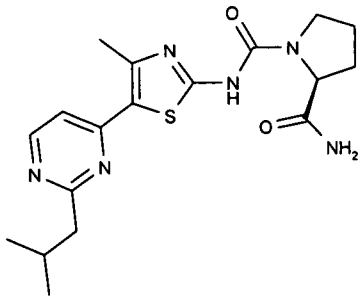
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-甲氧基甲基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 377 及 M-H 375。

實例 47：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2,6-二氯-苄基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



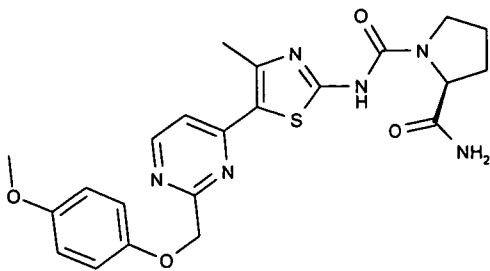
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(2,6-二氯-苄基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 491, 493 及 M-H 489, 491。

實例 48：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-異丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}



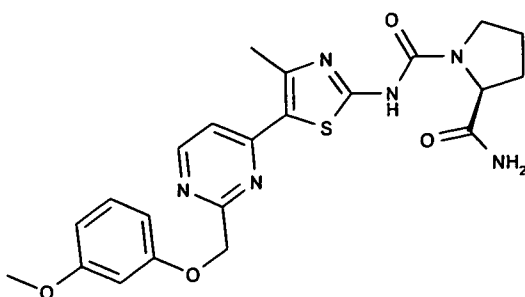
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-異丁基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 389 及 M-H 387。

實例 49：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(4-甲氧基-苯氧基甲基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



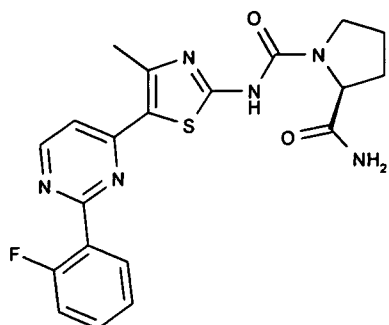
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(4-甲氧基-苯氧基甲基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 469 及 M-H 467。

實例 50：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(3-甲氧基-苯氧基甲基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



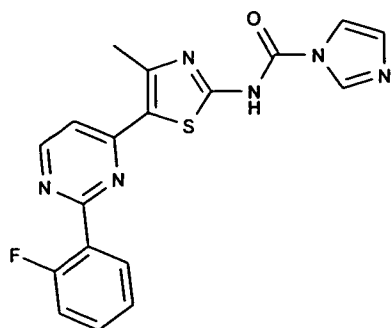
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(3-甲氧基-苯氧基甲基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS M-H 467。

實例 51：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



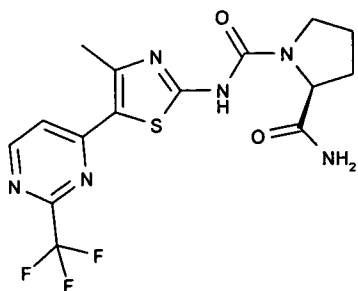
在室溫下，將咪唑-1-甲酸{5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺(415 mg)添加至L-脯胺醯胺(137 mg)及三乙胺(182  $\mu$ l)於DMF(1.1 ml)中之溶液中。在40°C下攪拌混合物18小時，蒸發且自甲醇(8 ml)及水(2 ml)中結晶以得到呈白色固體狀之標題化合物。ESI-MS: M+H 427及M-H 425。

步驟 51.1：咪唑-1-甲酸{5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺



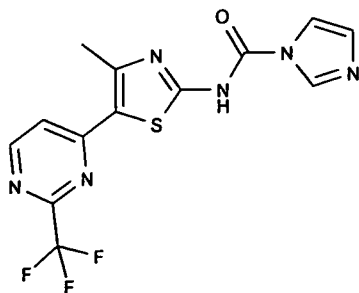
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。

實例 52：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-三氟甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}



在室溫下，將 L-脯胺醯胺 (9 mg) 添加至咪唑-1-甲酸 [5-(2-三氟甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺 (25 mg) 及三乙胺 (12  $\mu$ l) 於 DMF (71  $\mu$ l) 中之溶液中。在 25 $^{\circ}$ C 下攪拌混合物 18 小時且藉由製備型逆相層析來純化。以 300 mg BondElut SPE, SCX 筒捕獲含有標題化合物之溶離份且隨後與 7 M 氫之甲醇溶液 (1 ml) 一起釋放。藉由蒸發獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 401 及 M-H 399。

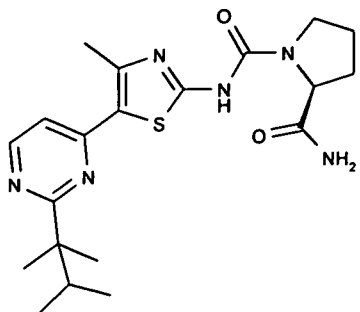
步驟 52.1：咪唑-1-甲酸 {4-甲基-5-[2-三氟甲基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺



類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-三氟甲

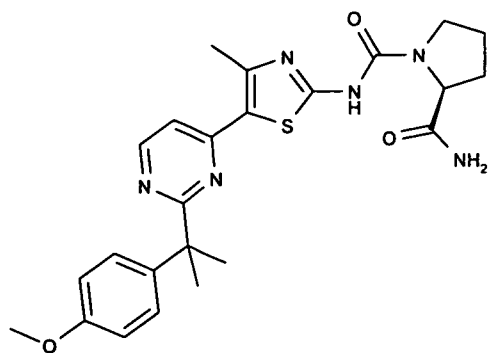
基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。

實例 53：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1,1,2-三甲基-丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 51 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(1,1,2-三甲基-丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 417 及 M-H 415。

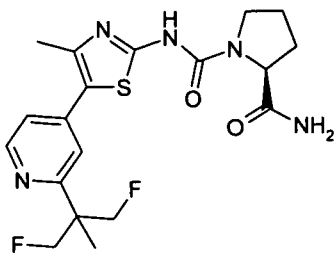
實例 54：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-[(5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-嘧啶-4-基}-4-甲基-噻唑-2-基)-醯胺]



類似於實例 51 所述之程序，但使用 5-{2-[1-(4-甲氧基-苯基)-1-甲基-乙基]-嘧啶-4-基}-4-甲基-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-(2-氟-苯基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化

合物。ESI-MS: M+H 495及M-H 493。

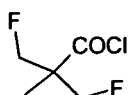
實例 55：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-氟-1-氟甲基-1-甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 6 小時。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 15 小時。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 1 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.3 中，在 120°C 下攪拌反應混合物 2 小時。在步驟 1.4 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 30 分鐘且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.5 中，在 65°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，不純化粗產物。在步驟 1.7 中，使用 3-氟-2-氟甲基-2-甲基-丙醯氯(步驟 55.1)。

標題化合物：ESI-MS: 424.1 [M+H]<sup>+</sup>；t<sub>R</sub>=2.40 min(系統 1)；TLC: R<sub>f</sub>=0.35(DCM/MeOH, 9:1)。

步驟 55.1：3-氟-2-氟甲基-2-甲基-丙醯氯

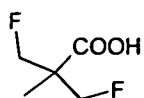


類似於步驟 5.1 所述之程序，但使用 3-氟-2-氟甲基-2-甲基-丙酸(步驟 55.2)來製備標題化合物。



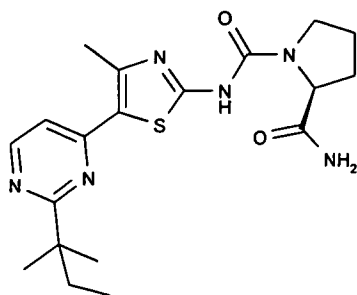


步驟 55.2：3-氟-2-氟甲基-2-甲基-丙酸



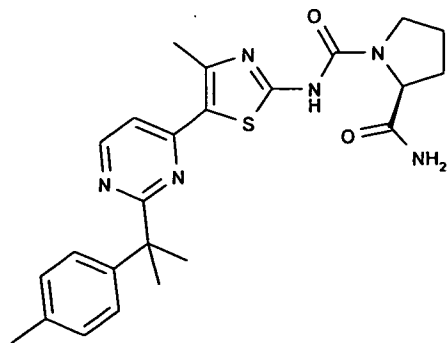
類似於步驟 73.2 所述之程序，但使用 3-氟-2-氟甲基-2-甲基-丙酸甲酯 (製備見 WO 2007/053394) 來製備標題化合物。ESI-MS: 137.0 [M-H]<sup>-</sup>。

實例 56：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1,1-二甲基-丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(1,1-二甲基-丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 403 及 M-H 401。

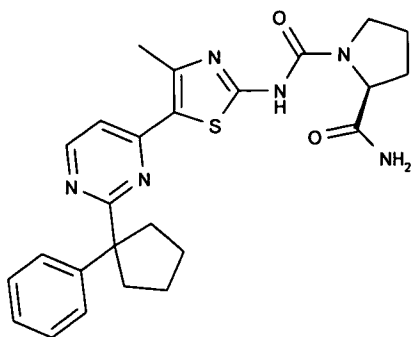
實例 57：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(1-甲基-1-對甲苯基-乙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(1-甲基-

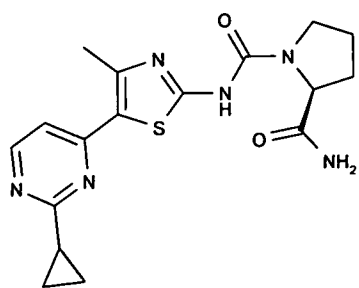
1-對甲苯基-乙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代4-甲基-5-[2-異丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。  
ESI-MS: M+H 479及M-H 477。

實例 58：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-(1-苯基-環戊基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



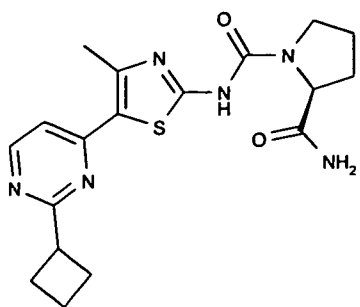
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-(1-苯基-環戊基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 477 及 M-H 475。

實例 59：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-環丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



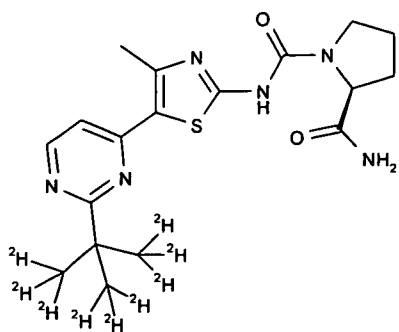
類似於實例 43 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-環丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-異丙基-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 373 及 M-H 371。

實例 60：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-環丁基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



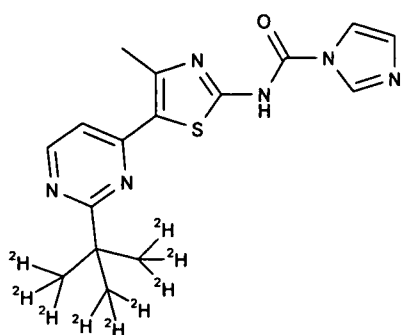
類似於實例 52 所述之程序，但使用 4-甲基-5-[2-環丁基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-三氟甲基-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺來製備標題化合物。ESI-MS: M+H 387 及 M-H 385。

實例 61：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-d<sub>9</sub>-第三丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}



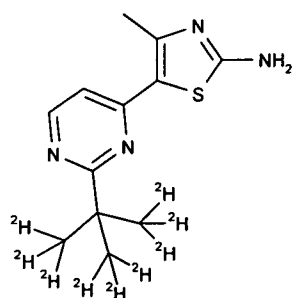
在室溫下，將咪唑-1-甲酸 [5-(2-d<sub>9</sub>-第三丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺 (0.82 g) 添加至 L-脯胺醯胺 (0.29 g) 及三乙胺 (0.81 ml) 於 DMF (5 ml) 中之攪拌溶液中。使反應混合物在室溫下靜置 22 小時，隨後蒸發，且在以 2:1 甲醇：水結晶兩次後獲得呈白色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 1.27 分鐘，M+H 398.3 及 M-H 396.3。

步驟 61.1：咪唑-1-甲酸[5-(2-d<sub>9</sub>-第三丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺



在室溫下，將羧基二咪唑(0.77 g)添加至5-(2-d<sub>9</sub>-第三丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺(1.11 g)於DMF(4.3 ml)中之攪拌溶液中。隨後，使反應混合物在25°C下靜置18小時，其後藉由過濾分離標題化合物。

步驟 61.2：5-(2-d<sub>9</sub>-第三丁基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺

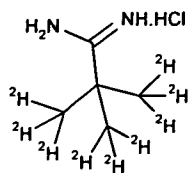


將粉狀氫氧化鈉(3.71 g)添加至N'-[5-(3-二甲基胺基-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(5.51 g)及d<sub>9</sub>-2,2-二甲基-丙脒鹽酸鹽(4.50 g)於2-甲氧基乙醇(41 ml)中之溶液中且在125°C於攪拌下加熱混合物1小時。冷卻反應混合物，添加水且藉由過濾分離粗產物。藉由製備型HPLC純化粗產物且將含有標題化合物之溶離份在二氯甲烷與碳酸氫鈉水溶液之間分溶。蒸發無水二氯甲烷層後，



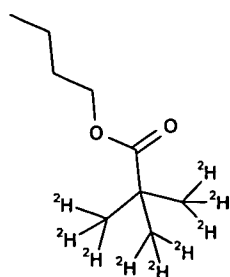
獲得呈黃色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 1.12分鐘，M+H 258.4。

**步驟 61.3：d<sub>9</sub>-2,2-二甲基-丙脒鹽酸鹽**



將三甲基鋁於甲苯 (61 ml) 中之 2 M 溶液逐滴添加至經冰浴冷卻之氯化銨 (6.53 g) 於甲苯 (46 ml) 中之懸浮液中。在室溫下攪拌反應混合物 4 小時且添加 d<sub>9</sub>-2,2-二甲基-丙酸丁酯 (6.3 g)。在 80°C 下加熱 4 天後，冷卻反應混合物至 0°C 且逐滴添加甲醇 (200 ml)。在室溫下攪拌且超音波處理 1 小時後，在以甲醇洗滌下經 Hyflo 過濾反應混合物，且蒸發濾液以得到呈灰白色固體狀之標題化合物。

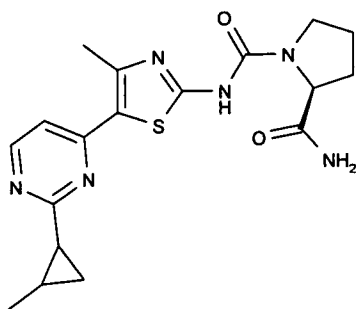
**步驟 61.4：d<sub>9</sub>-2,2-二甲基-丙酸丁酯**



將 d<sub>9</sub>-第三丁基氯 (5.0 g) 逐份添加至鎂 (1.50 g) 於四氫呋喃 (20 ml) 中之懸浮液中，視維持穩定回流之需要在加熱下經 1 小時以催化量之碘活化。隨後，再加熱反應混合物 1 小時以確保完全格林納溶液 (Grignard) 形成。隨後，將上述格林納溶液逐滴添加至經冰浴冷卻之咪唑-1-甲酸丁酯 (7.5 g，如 T. Werner 及 A.G.M. Barrett J. Org. Chem. 2006, 71,

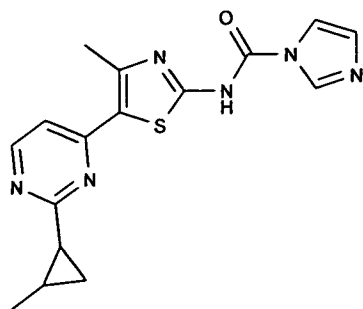
4302-4304所述來製備)於四氫呋喃(40 ml)中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物18小時，添加水(200 ml)，經Hyflo過濾混合物，以乙醚萃取濾液且經硫酸鈉乾燥乙醚層且蒸發以得到標題化合物。

實例 62：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(2-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



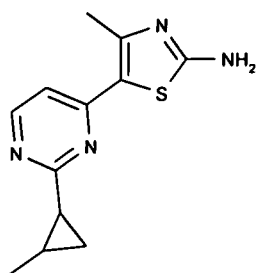
在室溫下，將咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(2-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺(50 mg)添加至L-脯胺醯胺(18 mg)及三乙胺(25  $\mu$ l)於DMF(147  $\mu$ l)中之攪拌溶液中。在40°C下攪拌反應混合物2小時且藉由製備型逆相層析來純化。以300 mg BondElut SPE, SCX筒捕獲含有標題化合物之溶離份且隨後與7 M氫之甲醇溶液(1 ml)一起釋放。藉由蒸發獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 387及M-H 385。

步驟 62.1：咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(2-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺



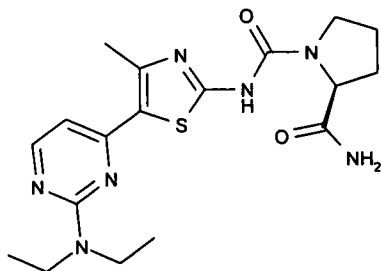
在室溫下，將羰基二咪唑(487 mg)添加至4-甲基-5-[2-(2-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺(370 mg)及三乙胺(251  $\mu$ l)於DMF(1.5 ml)中之溶液中，且隨後在40°C下加熱2小時。蒸發反應混合物且以氯仿濕磨。藉由過濾分離標題化合物。

步驟 62.2：4-甲基-5-[2-(2-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺



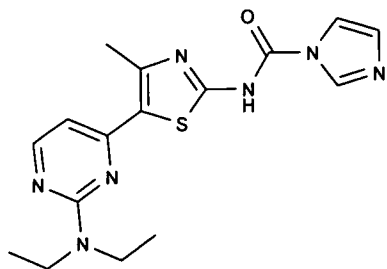
將粉狀氫氧化鈉(300 mg)添加至N'-[5-(3-二甲基胺基-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(1 g，如S. Wang等人，J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675所述來製備)及順/反2-甲基-環丙烷甲脒鹽酸鹽(0.61 g，如WO 03/087064所述來製備)於2-甲氧基乙醇(3.8 ml)中之溶液中且在125°C於攪拌下加熱混合物1小時。冷卻反應混合物，在以水洗滌下過濾以得到標題化合物。MS: M+H 247及M-H 245。

實例 63：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-二乙基胺基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



在室溫下，將咪唑-1-甲酸[5-(2-二乙基胺基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺(40 mg)添加至L-脯胺醯胺(14 mg)及三乙胺(19  $\mu$ l)於DMF(147  $\mu$ l)中之攪拌溶液中。在40°C下攪拌反應混合物2小時且藉由製備型逆相層析來純化。以300 mg BondElut SPE, SCX筒捕獲含有標題化合物之溶離份且隨後與7 M氬之甲醇溶液(1 ml)一起釋放。藉由蒸發獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 404及M-H 402。

**步驟 63.1：咪唑-1-甲酸[5-(2-二乙基胺基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺**

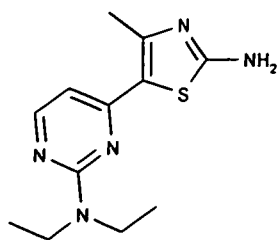


在室溫下將羧基咪唑(437 mg)添加至[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-嘧啶-2-基]-二乙基-胺(355 mg)及三乙胺(207  $\mu$ l)於DMF(1.4 ml)中之溶液中，且隨後在80°C下加熱18小時。蒸發反應混合物且以氯仿濕磨。藉由過濾分離標題化合物。

**步驟 63.2：[4-(2-胺基-4-甲基-噻唑-5-基)-嘧啶-2-基]-二乙基-胺**

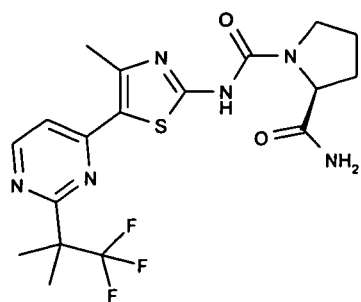






將粉狀氫氧化鈉(150 mg)添加至N'-[5-(3-二甲基胺基-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(0.5 g, 如S. Wang等人, J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675所述來製備)及1,1-二乙基胍(259 mg)於2-甲氧基乙醇(1.9 ml)中之溶液中且在125°C於攪拌下加熱混合物1小時。在真空下濃縮反應混合物且藉由正相層析(溶離劑: DCM/EtOAc)純化以得到標題化合物。ESI-MS: M+H 264及M-H 262。

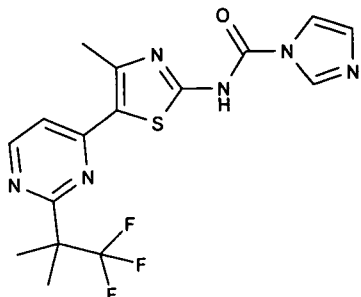
實例 64: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-嘓啉-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)



在室溫下, 將咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-嘓啉-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺(69 mg)添加至L-脯胺醯胺(22 mg)及三乙胺(53 mg)於DMF(1 ml)中之攪拌溶液中。使反應混合物在室溫下靜置22小時, 隨後蒸發, 且在以甲醇(2 ml)及水(1 ml)結晶後獲得呈白色固體狀之標題化合物。HPLC/MS: 滯留時間1.80分鐘, M+H 443.1及

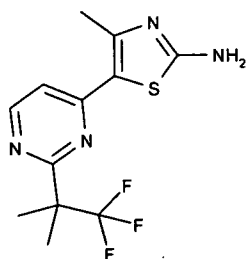
M-H 441.2。

步驟 64.1：咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺



在室溫下將羧基咪唑(38 mg)添加至4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺(65 mg)於DCM(1 ml)及DMF(0.2 ml)中之溶液中，且隨後在25°C下靜置18小時。冷卻後，藉由過濾分離標題化合物。

步驟 64.2：4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基胺

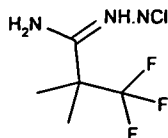


將粉狀氫氧化鈉(0.42 g)添加至N'-[5-((E)-3-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(0.93 g，如S. Wang等人，J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675所述來製備)及3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙脒鹽酸鹽(0.54 g)於2-甲氧基乙醇(7 ml)中之溶液中且在125°C於攪拌下加熱混合物1小時。冷卻反應混合物，添加水，且以於二氯甲烷中之



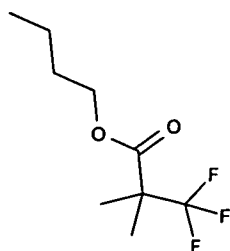
10% 甲醇萃取水層 4 次。藉由逆相層析純化經合併之有機層且將碳酸氫鈉添加至含有標題化合物之溶離份中以得到白色沈澱物，藉由過濾收集該沈澱物。HPLC/MS：滯留時間 1.47 分鐘，M+H 303.1。

**步驟 64.3：3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙脒鹽酸鹽**



遵循步驟 61.3 所述之程序，依以下修改來合成標題化合物。使用 3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙酸丁酯替代  $d_9$ -2,2-二甲基-丙酸丁酯且在 80°C 下攪拌混合物 3 天。將粗產物溶解於 DCM 中，以少量於 EtOH 中之 HCl 處理且蒸發。以 DCM 濕磨殘餘物，過濾且乾燥以得到呈灰白色固體狀之標題化合物。

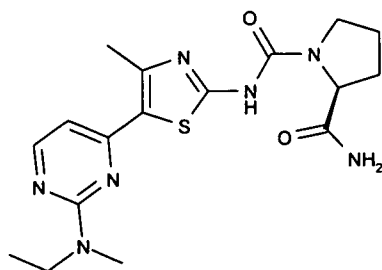
**步驟 64.4：3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙酸丁酯**



將 3,3,3-三氟-2,2-二甲基-丙酸 (3.0 g, 19.2 mmol) 及一滴 DMF 溶解於 30 mL DCM 中且在室溫下以乙二醯氯 (1.85 mL, 21.1 mmol) 逐滴處理。2 小時後，氣體停止逸出且以三乙胺 (5.36 mL, 38.4 mmol)、接著以正丁醇 (2.1 mL, 23 mmol) 緩慢處理混合物。攪拌混合物隔夜，蒸發溶劑且將殘餘物與己烷一起攪拌。濾除固體且將濾液蒸發成棕紅色

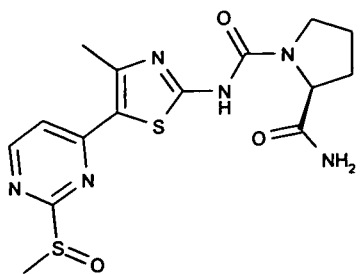
油狀物。庫格羅赫蒸餾 (Kugelrohr distillation)(10 毫巴 (mbar), 60-80°C 烘箱溫度) 得到呈無色液體狀之標題化合物。

實例 65：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(乙基-甲基-胺基)-噻啉-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



在 80°C 下於密封管中將 (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-甲烷亞磺醯基-噻啉-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}(60 mg) 及 N-乙基甲基胺 (45 mg) 之混合物加熱 18 小時。接著，藉由製備型逆相層析純化粗產物。以 300 mg BondElut SPE, SCX 筒捕獲含有標題化合物之溶離份且隨後與 7 M 氫之甲醇溶液 (1 ml) 一起釋放。藉由蒸發獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 390。

步驟 65.1：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{5-(2-甲烷亞磺醯基-噻啉-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}

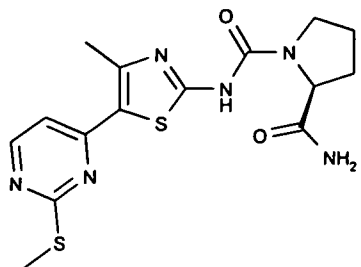


在 0°C 下，將間氯過氧苯甲酸 (0.50 g) 添加至 (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{{4-甲基-5-(2-甲基硫基-噻啉-4-基)-噻

唑-2-基]-醯胺}(1.7 g)於二氯甲烷(8.5 ml)中之溶液中。1小時後，蒸發反應混合物且藉由以二氯甲烷/甲醇梯度溶離進行正相層析來純化以得到呈黃色固體狀之標題化合物。

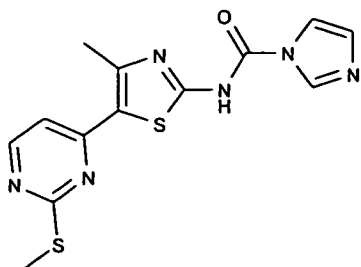
ESI-MS: M+H 395及M-H 393。

步驟 65.2: (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[4-甲基-5-(2-甲基硫基-嘧啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺}



在室溫下，將咪唑-1-甲酸[4-甲基-5-(2-甲基硫基-嘧啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺(1.0 g)添加至L-脯胺醯胺(379 mg)及三乙胺(0.51 ml)於DMF(3 ml)中之攪拌溶液中。在40°C下攪拌反應混合物2小時，隨後蒸發且在以二氯甲烷及水進行沈澱後獲得呈橙色固體狀之標題化合物。ESI-MS: M+H 379及M-H 377。

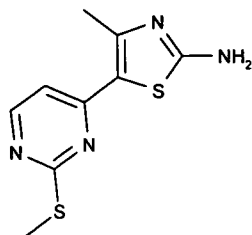
步驟 65.3: 咪唑-1-甲酸[4-甲基-5-(2-甲基硫基-嘧啶-4-基)-噻唑-2-基]-醯胺



在室溫下將羰基二咪唑(1.77 g)添加至4-甲基-5-(2-甲基硫基-嘧啶-4-基)-噻唑-2-基胺(1.3 g)於三乙胺(0.84 ml)及

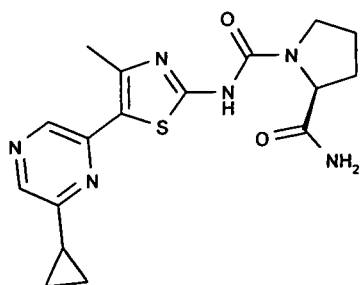
DMF(5.5 ml)中之溶液中，且在80°C下攪拌2小時。冷卻後，藉由過濾分離標題化合物。

**步驟 65.4：4-甲基-5-(2-甲基硫基-嘓啶-4-基)-噻唑-2-基胺**



將粉狀氫氧化鈉(1.09 g)添加至N'-[5-(3-二甲基胺基-丙烯醯基)-4-甲基-噻唑-2-基]-N,N-二甲基-甲脒(2.0 g，如S. Wang等人，J. Med. Chem. 2004, 47, 1662-1675所述來製備)及硫脲(0.57 g)於乙醇(25 ml)中之溶液中，且在回流下於攪拌下加熱混合物3小時。冷卻反應混合物至室溫且依序添加水、碘代甲烷(0.47 ml)。在室溫下1小時後，藉由蒸發移除乙醇且添加水且以2 N鹽酸水溶液調整pH值至7。隨後藉由過濾獲得標題化合物。ESI-MS: M+H 239及M-H 237。

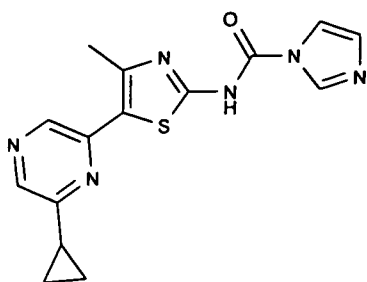
**實例 66：(S)-吡咯啶-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}**



在室溫下，將咪唑-1-甲酸[5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺(78 mg)添加至L-脯胺醯胺(30 mg)及三

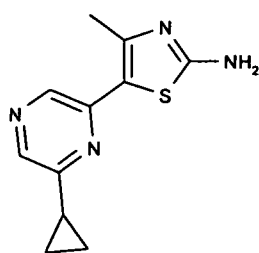
乙胺 (83  $\mu$ l) 於 DMF (1 ml) 中之攪拌溶液中。使反應混合物在室溫下靜置 18 小時，蒸發，且在以甲醇 (1 ml) 及水 (0.5 ml) 結晶後獲得呈黃色 / 白色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 1.40 分鐘，M+H 373.1 及 M-H 371.3。

**步驟 66.1：咪唑-1-甲酸 [5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺**



在室溫下將羧基二咪唑 (74 mg) 添加至 5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺 (96 mg) 於 DMF (2 ml) 中之溶液中，且在室溫下靜置 18 小時。在以二氯甲烷洗滌下過濾反應混合物，以得到標題化合物。

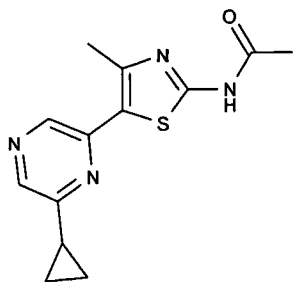
**步驟 66.2：5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺**



在室溫下將濃鹽酸 (0.4 ml) 添加至於乙醇 (9 ml) 中之 N-[5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺 (120 mg) 中，且在回流下加熱混合物 18 小時。蒸發經冷卻之反應混合物，以碳酸氫鈉水溶液中中和且以於 DCM 中之 10% 甲醇萃取。經硫酸鈉乾燥經合併之有機萃取物，且蒸發以得

到標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 0.93 分鐘，M+H 233.3。

步驟 66.3：N-[5-(6-環丙基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺

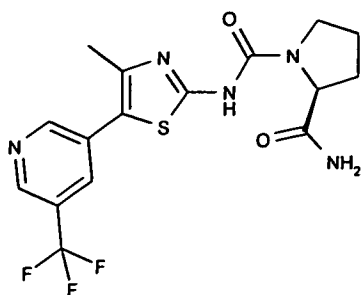


在室溫下，使氫氣鼓泡通過 2-環丙基-6-氯吡嗪 (154 mg，由 A. Fürstner 等人，J. Am. Chem. Soc. 2002, 214, 13856-13863 之方法製備)、2-乙醯胺基-4-甲基噻唑 (200 mg)、乙酸鈣 (24 mg)、四氟硼酸三-第三丁基磷 (61 mg) 及碳酸鈉 (678 mg) 於 DMF (3 ml) 中之混合物，歷時 5 分鐘。在 150°C 下於 Biotage Initiator™ 微波裝置中，將反應混合物在氫氣氛圍下於密封小瓶中加熱 45 分鐘。過濾反應混合物且藉由製備型 HPLC 純化。合併含有標題化合物之溶離份且蒸發以移除乙腈，且藉由過濾獲得呈米色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 1.65 分鐘，M+H 275.3。

實例 67：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{[4-甲基-5-(5-三氟甲基-吡啶-3-基)-噻唑-2-基]-醯胺}

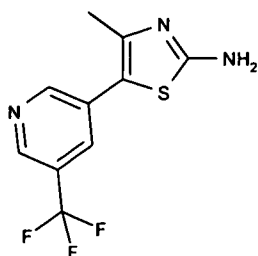






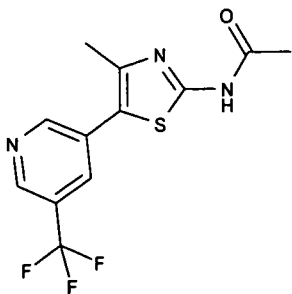
在室溫下將羧基二咪唑(29 mg)添加至4-甲基-5-(5-三氟甲基-吡啶-3-基)-噻唑-2-基胺(42 mg)及三乙胺(50  $\mu$ l)於DMF(1 ml)中之攪拌溶液中，且使混合物在室溫下靜置18小時。添加L-脯胺醯胺(20 mg)且使反應混合物在室溫下再靜置8小時，蒸發，且在以甲醇(3 ml)及水(1.5 ml)結晶後獲得呈白色固體狀之標題化合物。ESI-MS: M+H 400。

**步驟 67.1：4-甲基-5-(5-三氟甲基-吡啶-3-基)-噻唑-2-基胺**



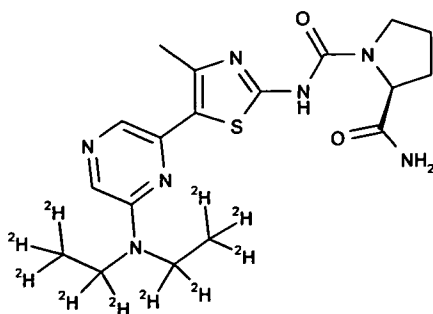
在室溫下將三甲基矽烷基氣(0.3 ml)添加至於乙醇(2 ml)中之N-[4-甲基-5-(5-三氟甲基-吡啶-3-基)-噻唑-2-基]-乙醯胺(44 mg)中且在室溫下攪拌混合物4.5小時。隨後，在50°C下加熱反應物18小時，冷卻，蒸發且在以乙醚濕磨後藉由過濾獲得標題化合物。

**步驟 67.2：N-[4-甲基-5-(5-三氟甲基-吡啶-3-基)-噻唑-2-基]-乙醯胺**



在室溫下，使氫氣鼓泡通過5-(三氟甲基)-3-吡啶基脞酸鹽酸鹽(263 mg，如WO 2007/134828所述來製備)、2-乙醯基胺基-5-碘-4-甲基噻唑(260 mg，如WO 2006/125807所述來製備)、1,1'-雙(二苯基膦基)-二茂鐵二氯鈹(II)(38 mg)、碳酸鈉(488 mg)於DME(2.3 ml)及水(2.3 ml)中之混合物，歷時5分鐘。在80°C於氫氣氛圍下在密封小瓶中加熱反應混合物30分鐘，且隨後在80°C下於Biotage Initiator™微波裝置中加熱60分鐘。冷卻後，以DCM萃取反應混合物，與矽膠一起蒸發經合併之有機層且藉由正相層析(溶離劑：梯度自DCM至1:1 DCM:乙酸乙酯)純化。隨後，以甲醇(5 ml)、DMF(0.3 ml)及水(1.3 ml)濕磨含有產物之溶離份且過濾以得到呈米色固體狀之標題化合物。

實例68：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{{5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺}

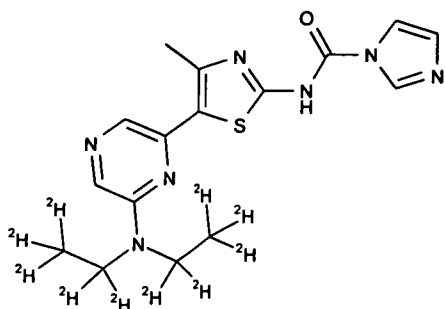


在室溫下，將咪唑-1-甲酸[5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺(82 mg)添加至L-脯胺醯胺(28



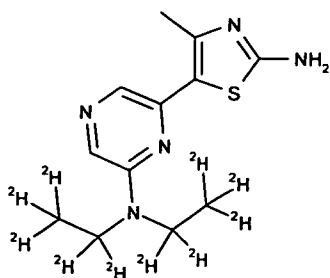
mg)及三乙胺(78  $\mu$ l)於DMF(1 ml)中之攪拌溶液中。使反應混合物在室溫下靜置14小時，蒸發，且在以甲醇(1 ml)及水(0.5 ml)結晶後獲得呈黃色/白色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間1.41分鐘，M+H 414.2及M-H 412.3。

步驟68.1：咪唑-1-甲酸[5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺



在室溫下將羧基咪唑(78 mg)添加至5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺(121 mg)於DMF(2 ml)中之溶液中，且在室溫下靜置3.5小時。在以二氯甲烷洗滌下過濾反應混合物，以得到標題化合物。

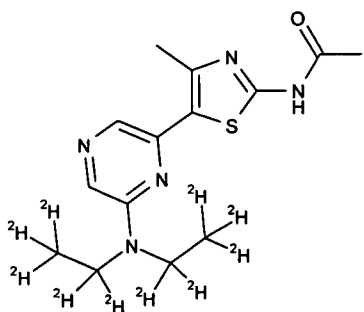
步驟68.2：5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺



在室溫下將濃鹽酸(0.4 ml)添加至於乙醇(9 ml)中之N-[5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺(140 mg)中，且在回流下加熱混合物40小時。蒸發經冷

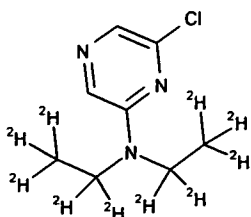
卻之反應混合物，以碳酸氫鈉水溶液中中和且以於DCM中之10%甲醇萃取。經硫酸鈉乾燥經合併之有機萃取物，且蒸發以得到標題化合物。HPLC/MS：滯留時間1.17分鐘，M+H 274.4。

**步驟 68.3：N-[5-(6-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺**



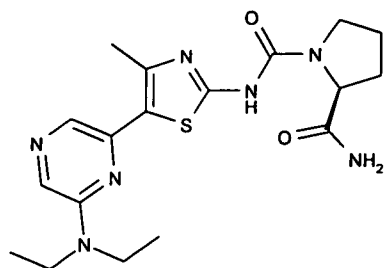
在室溫下，使氫氣鼓泡通過2-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-6-氯吡嗪(293 mg)、2-乙醯胺基-4-甲基噻唑(300 mg)、乙酸鈣(24 mg)、四氟硼酸三-第三丁基磷(61 mg)及碳酸鈉(1.02 g)於DMF(3 ml)中之混合物，歷時5分鐘。在150°C下於Biotage Initiator™微波裝置中，將反應混合物在氫氣氛圍下於密封小瓶中加熱45分鐘，過濾且藉由製備型HPLC純化。合併含有標題化合物之溶離份且蒸發以移除乙腈，且藉由過濾獲得呈米色固體狀之標題化合物。HPLC/MS：滯留時間1.68分鐘，M+H 316.3。

**步驟 68.4：2-d<sub>10</sub>-二乙基胺基-6-氯吡嗪**



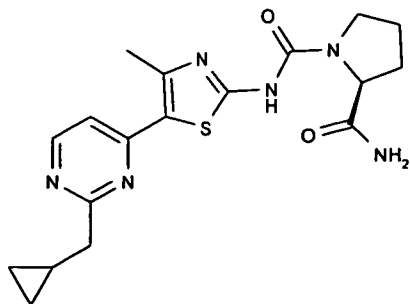
在室溫下，將  $d_{10}$ -二乙胺 (0.5 g) 添加至 2,6-二氯吡嗪 (0.93 g) 與碳酸鉀 (1.41 g) 於乙腈 (4 ml) 中之攪拌混合物中。隨後，在 55°C 下加熱反應混合物 60 小時，冷卻，添加水且隨後以二氯甲烷萃取。經硫酸鈉乾燥經合併之有機萃取物，蒸發且藉由正相層析 (溶離劑 DCM) 純化以得到標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 2.10 分鐘，M+H 196.4 及 198.4。

實例 69：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{\[5-(6-二乙基胺基-吡嗪-2-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 68 所述之程序，但使用二乙胺替代  $d_{10}$ -二乙胺來製備標題化合物。HPLC/MS：滯留時間 1.43 分鐘，M+H 404.2 及 402.3。

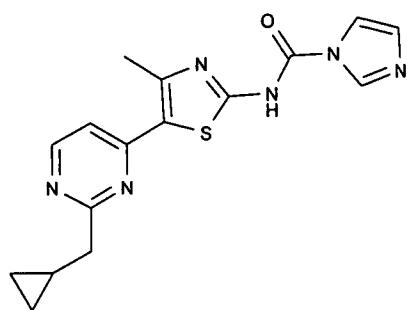
實例 70：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-{\[5-(2-環丙基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例 42 所述之程序，但使用咪唑-1-甲酸 [5-(2-環

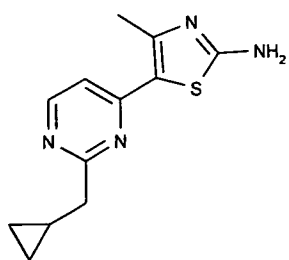
丙基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺替代咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺來製備標題化合物。熔點220-222°C；ESI-MS  $[M+H]^+$  387.1；TLC:  $R_f=0.2$ (DCM/EtOH, 95:5)。

步驟 70.1：咪唑-1-甲酸[5-(2-環丙基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺



類似於步驟42.1所述之程序，但使用5-(2-環丙基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺替代4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺且攪拌反應物15小時來製備標題化合物。熔點240-243°C；ESI-MS  $[M+H]^+$  305.1；TLC:  $R_f=0.35$ (DCM/EtOH, 95:5)。

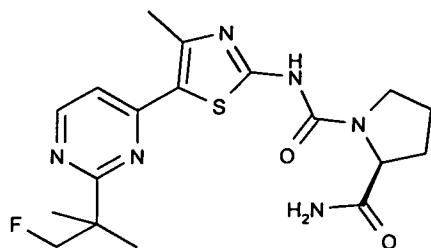
步驟 70.2：5-(2-環丙基甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺



類似於步驟42.2所述之程序，但使用2-環丙基-乙脒鹽酸鹽替代1-甲基-環丙烷甲脒鹽酸鹽來製備標題化合物。熔點

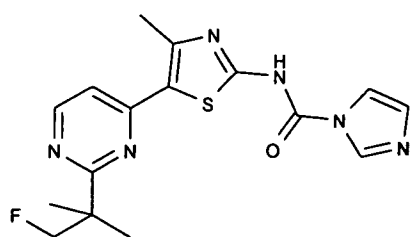
198-200°C ; ESI-MS  $[M+H]^+$  247.1 ; TLC:  $R_f=0.25$  (DCM/EtOH, 95:5)。

實例 71 : (S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)



類似於實例 42 所述之程序，但使用咪唑-1-甲酸 {5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺替代咪唑-1-甲酸 {4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺來製備標題化合物。熔點 187-190°C ; ESI-MS  $[M+H]^+$  407.1 ; TLC:  $R_f=0.3$  (DCM/EtOH, 95:5)。

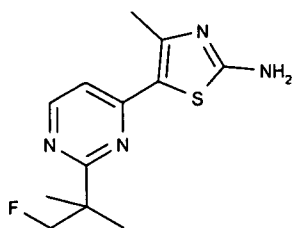
步驟 71.1 : 咪唑-1-甲酸 {5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺



類似於步驟 42.1 所述之程序，但使用 5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基胺替代 4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺且在 80°C 下攪拌反應物 16 小時來製備標題化合物。

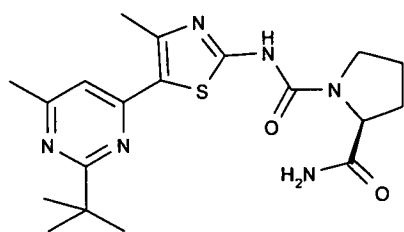
步驟 71.2 : 5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-嘧啶-4-基]-4-甲

## 基-噻唑-2-基胺



類似於步驟42.2所述之程序，但使用3-氟-2,2-二甲基-丙脞鹽酸鹽替代1-甲基-環丙烷甲脞鹽酸鹽來製備標題化合物。ESI-MS  $[M+H]^+$  267.1；TLC:  $R_f=0.4$ (DCM/EtOH, 95:5)。

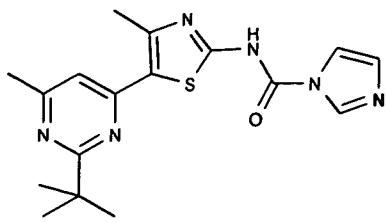
實例72：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-{[5-(2-第三丁基-6-甲基-嘓啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺}



類似於實例42所述之程序，但使用咪唑-1-甲酸[5-(2-第三丁基-6-甲基-嘓啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺替代咪唑-1-甲酸{4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘓啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺來製備標題化合物。熔點197-199°C；ESI-MS  $[M+H]^+$  403.1；TLC:  $R_f=0.3$ (DCM/EtOH, 95:5)。

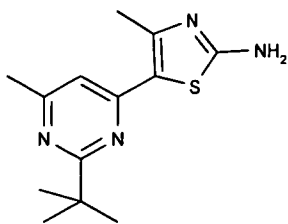
步驟72.1：咪唑-1-甲酸[5-(2-第三丁基-6-甲基-嘓啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-醯胺





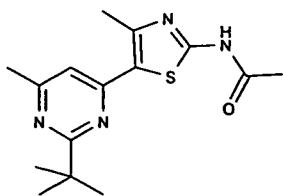
類似於步驟42.1所述之程序，但使用5-(2-第三丁基-6-甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺替代4-甲基-5-[2-(1-甲基-環丙基)-嘧啶-4-基]-噻唑-2-基胺且攪拌反應物16小時來製備標題化合物。ESI-MS  $[M-H]^-$  355.2。

步驟72.2：5-(2-第三丁基-6-甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基胺



類似於步驟1.2所述之程序，但使用N-[5-(2-第三丁基-6-甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺替代N-[5-(2-第三丁基-吡啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺且使用2 N HCl來製備標題化合物。在室溫下攪拌反應混合物16小時且隨後在90°C下攪拌3小時。ESI-MS  $[M+H]^+$  263.1。

步驟72.3：N-[5-(2-第三丁基-6-甲基-嘧啶-4-基)-4-甲基-噻唑-2-基]-乙醯胺

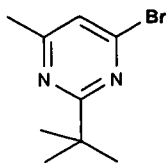


類似於步驟1.3所述之程序，但使用4-溴-2-第三丁基-6-

甲基-嘧啶替代4-溴-2-第三丁基-吡啶來製備標題化合物。

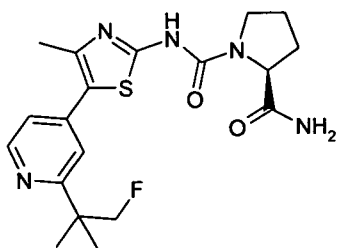
ESI-MS  $[M+H]^+$  305.2。

步驟 72.4：4-溴-2-第三丁基-6-甲基-嘧啶



類似於步驟 1.4 所述之程序，但使用 2-第三丁基-6-甲基-3H-嘧啶-4-酮替代 2-第三丁基-1H-吡啶-4-酮來製備標題化合物。ESI-MS  $[M+H]^+$  229/231.0。TLC:  $R_f=0.58$ (己烷/CM, 7:3)。

實例 73：(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸 2-醯胺 1-({5-[2-(2-氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-2-基}-醯胺)

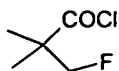


類似於實例 1 所述之程序，但依以下修改來製備標題化合物。在實例 1 中，在室溫下攪拌反應混合物 6 小時。在步驟 1.1 中，在回流下攪拌反應混合物 15 小時。在步驟 1.2 中，在 100°C 下攪拌反應混合物 1 小時且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.3 中，在 120°C 下攪拌反應混合物 4 小時。在步驟 1.4 中，在 85°C 下攪拌反應混合物 30 分鐘且在中止反應後以 EtOAc 萃取。在步驟 1.5 中，在 70°C 下攪拌反應混合物 1 小時且不在 MeOH 中進行濕磨。在步驟 1.6 中，

不純化粗產物。在步驟1.7中，使用3-氟-2,2-二甲基-丙醯氯(步驟76.1)。

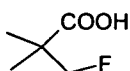
標題化合物：ESI-MS: 406.1  $[M+H]^+$  ;  $t_R=2.20$  min(系統1) ; TLC:  $R_f=0.47$ (DCM/MeOH, 9:1)。

步驟73.1：3-氟-2,2-二甲基-丙醯氯



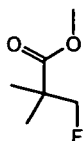
類似於步驟5.1所述之程序，但使用3-氟-2,2-二甲基-丙酸(步驟73.2)來製備標題化合物。

步驟73.2：3-氟-2,2-二甲基-丙酸



以38.6 mL(77 mmol) 2 N NaOH處理6.9 g(38.6 mmol)3-氟-2,2-二甲基-丙酸甲酯於30 mL甲醇中之溶液，且加熱混合物至回流，歷時3小時。將混合物冷卻至室溫且蒸發溶劑。將殘餘物在水與DCM之間分溶。添加50 mL 2 N HCl酸化水相且以乙酸乙酯萃取。以鹽水洗滌有機相，以硫酸鈉乾燥且蒸發。將無色殘餘物與己烷一起攪拌，藉由過濾移除不溶性物質且蒸發濾液以得到呈無色固體狀之標題化合物。ESI-MS: 119.0  $[M-H]^-$ 。

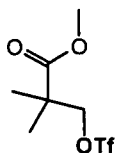
步驟73.3：3-氟-2,2-二甲基-丙酸甲酯



在冰冷卻下將氟化四丁基銨於THF中之27 mL 1 M溶液

緩慢添加至 7.25 g (27.4 mmol) 2,2-二甲基-3-三氟甲烷磺醯氧基-丙酸甲酯於 150 mL THF 中之溶液中。在 0°C 下攪拌所得溶液 6 小時且隨後在室溫下攪拌 10 小時。小心蒸發溶劑且將殘餘物在 DCM 與鹽水之間分溶。以鹽水洗滌有機相，以硫酸鈉乾燥且小心蒸發。在庫格羅赫烘箱 (烘箱溫度 120 至 150°C) 中蒸餾棕色油狀物以得到呈無色液體狀之標題化合物。

#### 步驟 73.4 : 2,2-二甲基-3-三氟甲烷磺醯氧基-丙酸甲酯



在 -70°C 及氮氣下向 3.64 g (27.5 mmol) 3-羥基-2,2-二甲基-丙酸甲酯及 4.82 mL (41.3 mmol) 2,6-二甲基吡啶於 50 mL 無水 DCM 中之溶液中緩慢添加三氟甲烷磺酸酐 (5.12 mL, 30.3 mmol)。在 -70°C 下攪拌黃色溶液 5 分鐘，隨後移除冷卻浴且在室溫下攪拌混合物 3 小時。顏色由黃色變成橙色，接著變成棕色。添加 DCM (50 mL) 且以 2 N HCl 洗滌溶液兩次，以硫酸鈉乾燥且蒸發至乾燥。在真空下乾燥棕色殘餘物且標題化合物未進一步純化即使用。TLC:  $R_f=0.72$  (EtOAc/己烷, 1:2)。

#### 分析型 HPLC 條件：

線性梯度：5 min 內 20-100% 溶劑 A + 1.5 min 100% 溶劑 A；在 215 nm 下偵測；流動速率：30°C 下 1 mL/min。管柱：Nucleosil 100-3 C18 (70×4.0 mm)。溶劑 A = CH<sub>3</sub>CN +



0.1% TFA；溶劑B=H<sub>2</sub>O+0.1% TFA。

#### MS條件：

儀器：Micromass Platform II，溶離劑：含有0.2%之25%  
氫氧化銨溶液的15%甲醇水溶液。

<sup>1</sup>H-NMR光譜：其在Varian Mercury 400光譜儀上於指定  
溶劑中量測。縮寫：br：寬峰；s：單峰；d：雙重峰；t：  
三重峰；q：四重峰；ppm：百萬分率。

#### HPLC/MS條件：

儀器：Hewlett Packard Agilent 1100系列，管柱：  
XBridge™ C18 2.5微米 3.0×30 mm，溫度：50℃；溶離  
劑：雙通道系統：通道A為於水中之5%乙腈，通道B為含  
有1.0%甲酸之乙腈。

時間(分鐘)	通道B%	流速(毫升/分鐘)
0	5	1.4
3.7	95	1.4
4.4	95	2.4
4.45	95	2.4

偵測：Agilent 1100 DAD 210-350 nm及 Waters  
Micromass ZQ 2000 ESI+與ESI-。

#### 製備型HPLC：

儀器：Gilson製備型HPLC系統，管柱：Sunfire™ Prep  
C18 OBD™ 5微米 30×100 mm，溫度：25℃，溶離劑：經  
20分鐘梯度自0.05%三氟乙酸水溶液中之5%乙腈至100%乙  
腈，流動速率：30毫升/分鐘，偵測：UV 254 nm。

#### 縮寫及頭字語：

BBr <sub>3</sub>	三溴化硼
<sup>t</sup> BuP.HBF <sub>4</sub>	四氟硼酸三-第三丁基鎂
DCM	二氯甲烷
DIEA	二異丙基乙基胺
DMAP	4-(二甲基胺基)吡啶
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	二甲基甲醯胺
DMP	1,3-二甲基-3,4,5,6-四氫-2-(1H)-嘧啶酮
DMSO	二甲亞砜
Hex	己烷
L	公升
LiHMDS	雙(三甲基矽烷基)胺基鋰
m.p.	熔點
MPLC	中壓液相層析
NBS	N-溴代丁二醯亞胺
NMP	1-甲基-2-吡咯啶酮
PdCl <sub>2</sub> (dppf)	[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]二氯化鈣(II)
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	肆(三苯基膦)鈣(0)
R <sub>f</sub>	前沿比(TLC)
rt	室溫
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
TLC	薄層層析
t <sub>R</sub>	滯留時間



v 體積

wt. 重量

#### 實例 A：作為 PI3 激酶抑制劑之功效

**PI3K KinaseGlo 檢定：**將 50 nL 化合物稀釋液分配至黑色 384 孔低容量非結合苯乙烯 (NBS) 盤 (Costar 目錄號 NBS#3676) 上。將以於甲醇中之 10 mg/mL 溶液形式提供之 L- $\alpha$ -磷脂醯肌醇 (PI) 轉移至玻璃管中且在氮束下乾燥。隨後藉由渦旋使其再懸浮於 3% 辛基糖苷 (OG) 中且儲存於 4°C 下。KinaseGlo 發光激酶檢定 (Promega, Madison/WI, USA) 為藉由定量激酶反應後保留於溶液中之 ATP 的量來量測激酶活性之均質 HTS 方法。

添加 PI/OG 與 PI3K 亞型之 5  $\mu$ L 混合物 (表 1)。藉由添加在 10  $\mu$ l 最終體積中含有 10 mM TRIS-HCl (pH 7.5)、3 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM NaCl、0.05% CHAPS、1 mM DTT 及 1  $\mu$ M ATP 之 5  $\mu$ l ATP 混合物來起始激酶反應且在室溫下進行。以 10  $\mu$ l KinaseGlo 使反應停止且 10 分鐘後在 Synergy2 讀取器中使用 0.1 秒/孔之積分時間讀取盤數據。將 2.5  $\mu$ M 總泛 (pan)1 類 PI3 激酶抑制劑 (標準物) 添加至檢定盤中以產生激酶反應 100% 抑制，且由溶劑媒劑 (90% DMSO 水溶液) 提供 0% 抑制。標準物用作參考化合物且一式兩份以 16 個稀釋點之形式包括於所有檢定盤中。

表 1 PI3K KinaseGlo：檢定條件及試劑方案

體積 (10 $\mu$ L)	酶 (nM)	ATP ( $\mu$ M)	PI/OG ( $\mu$ M/ $\mu$ g/ml)	NaCl (mM)	Mg <sup>2+</sup> (mM)	CHAPS(%)	DTT (mM)	時間 (分鐘)
PI3K $\alpha$	10	1	11/10	50	3	0.05	1	30
PI3K $\beta$	25	1	11/10	50	3	0.05	1	30
PI3K $\gamma$	150	1	22/20	50	3	0.05	1	90
PI3K $\delta$	10	1	11/10	50	3	0.05	1	30

## 選殖 PI3K

PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 及PI3K $\delta$ 構築體為p85 $\alpha$  iSH2域與各別p110同功異型物之融合體。如下所述，藉由以來自胎盤、睪丸及大腦之商業RNA進行RT-PCR所產生之第一股cDNA進行PCR來產生p85 $\alpha$ 片段及p110同功異型基因。PI3K $\gamma$ 構築體獲自英國醫學研究委員會劍橋分子生物學實驗室(MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK)之羅傑威廉斯實驗室(Roger Williams lab)(2003年11月)且經描述(Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. Cell (2000), 103(6), 931-943)。

PI3K $\alpha$ 構築體及蛋白質

PI3K $\alpha$ wt	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGG-p110 $\alpha$ (21-1068)-His
------------------	--------	--

BV1075：由包含選殖至載體pBlueBac4.5中之p85片段及p110 $\alpha$ 片段的三部分接合產生桿狀病毒BV-1075之構築體。p85片段獲自經Nhe/Spe消化之質體p1661-2。藉由定序驗





證源自純系之p110 $\alpha$ 片段且將其以SpeI/HindIII片段之形式用於LR410中。為產生桿狀病毒表現載體LR410，使用閘道(gateway)LR反應以將插入物轉移至閘道調適之pBlueBac4.5(Invitrogen)載體中。以Nhe/HindIII消化選殖載體pBlueBac4.5(Invitrogen)。此產生構築體PED 153.8。藉由使用ORF 318(如上所述)作為模板及一個前置引子KAC1028(5'-GCTAGCATGCGAGAATATGATAGAT-TATATGAAG-AATATACC)(SEQ ID NO: 1)及兩個反置引子KAC1029(5'-GCCTCCACCAC-CTCCGCCTG-GTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTC)(SEQ ID NO: 2)及KAC1039(5'-TACTAGTC-CGCCTCCAC-CACCTCCGCCTCCACCACCTCCGCC)(SEQ ID NO: 3)進行PCR來產生p85組件(iSH2)。兩個反置引子重疊且將12 $\times$ Gly連接子及p110 $\alpha$ 基因之N末端序列併入SpeI位點中。12 $\times$ Gly連接子置換BV1052構築體中之單一Gly連接子。將PCR片段選殖至pCR2.1 TOPO(Invitrogen)中。在所得純系中，藉由定序判定p1661-2正確。以Nhe及SpeI消化此質體且經凝膠分離所得片段且純化以供次選殖。

藉由以Spe I及HindIII對純系LR410(見上文)進行酶促消化來產生p110 $\alpha$ 選殖片段。SpeI位點位於p110 $\alpha$ 基因之編碼區域中。經凝膠分離所得片段且純化以供次選殖。藉由以Nhe及HindIII進行酶促消化來製備選殖載體pBlueBac4.5(Invitrogen)。以Qiagen管柱純化經切割之載體且隨後以小牛腸鹼性磷酸酶(CIP)(BioLabs)去磷酸化。CIP反應完成後，再次經管柱純化經切割之載體以產生最終載體。使用

Roche Rapid接合酶及供應商說明書進行三部分接合。藉由定序驗證最終質體。

### 激酶域

BV 1075之蛋白質序列：

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGGGGGG
121 GLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFFDETRRL CDLRLFQPFV KVIIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESPELPH HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIRKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGG YILKVCDCDE
361 YFLEKYPLSQ KYIIRSCIML GRMPNMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLRA ARLCLSICSV KGRKGAKEEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWVVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWSNRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLLE SYCRACGYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLEEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNEI
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNGQL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISKAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSSMLGSG MPQLQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALEYF
1141 MKQMNDAAHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

```

### PI3K $\beta$ 構築體及蛋白質

PI3K $\beta$	BV949	p85iSH2(461-N58K-568)-GGGGGG-p110 $\beta$ (2-1070)-His
--------------	-------	--

BV949：產生 p85 PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 及 PI3K $\delta$ 次單元之內部 SH2 域 (iSH2) 及全長 p110 $\beta$  次單元之 PCR 產物且藉由重疊 PCR 融合。最初使用引子 gwG130-p01(5'-CGAGAATATGAT AGATTATATGAAGAAT-3')(SEQ ID NO: 5) 及 gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3')(SEQ ID NO: 6)，以來自胎盤、睪丸及大腦之商業人類 RNA (Clontech) 進行 RT-PCR 所產生之第一股 cDNA 來獲得 iSH2



PCR產物。隨後，在第二PCR反應中，使用引子 gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTT-TGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGG AGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3')(SEQ ID NO: 7)及 gwG130-p05(5'-ACTGAAGCATCCTCCTC-CTCCTCCT-CCTGGTTTAATGCTGTTCATACGTTTGTC-3') (SEQ ID NO: 8)在 p85 iSH2 片段之 5'端及 3'端分別添加閘道重組 AttB1 位點及連接子序列。藉由使用 p110 $\beta$  純系(來自經序列驗證之未知來源)作為模板，使用含有連接子序列及 p110 $\beta$  之 5'端的引子 gwG130-p04(5'-ATTAAACCAGGAGG AGGAGGAGGAGGATGCTT-CAGTTTCATAATGCCTCCTGCT-3')(SEQ ID NO: 9)及含有與組胺酸標籤融合之 p110- $\beta$  之 3'端序列的引子 gwG130-p06(5'-AGCTCCGTGATGGTGAT GGTGATGTGCTCCAGATC-TGTAGTCTTTCCGAA-CTGTGTG-3')(SEQ ID NO: 10)進行 PCR 來獲得 p110 $\beta$  片段。藉由使用上述 gwG130-p03 引子及含有重疊組胺酸標籤及 AttB2 重組序列之引子 (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3')(SEQ ID NO: 11)進行重疊 PCR(在 iSH2 片段之 3'端與 p110 $\beta$  片段之 5'端的連接子之反應)來裝配 p85-iSH2/p110 $\beta$  融合蛋白。在閘道 (Invitrogen) OR 反應中將此最終產物重組至供體載體 pDONR201(Invitrogen) 中以產生 ORF253 入閘純系 (entry clone)。藉由定序驗證此純系且將其用於閘道 LR 反應 (Invitrogen) 中以將插入物轉移至閘道調適之 pBlueBac4.5(Invitrogen) 載體中以供產生桿狀病毒表現載

體LR280。此LR280在p85序列中具有胺基酸突變。

### 激酶域

BV949之蛋白質序列：

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGKEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGCFSFI
121 MPPAMADILD IWAVDSQIAS DGSIPVDFLL PTGIYIQLEV PREATISYIK QMLWKQVHNY
181 PMFNLLMDID SYMFACVNQT AVYEELEDET RRLCDVRPFL PVLKLVTRSC DPGEKLDISKI
241 GVLIQKGLHE FDSLKDPEVN EFRRKMRKFS EEKILSLVGL SWMDWLKQTY PPEHEPSIPE
301 NLEDKLYGGK LIVAVHFENC QDVFSFQVSP NMNPIKVNEL AIQKRLTIHG KEDEVSPYDY
361 VLQVSGRVEY VFGDHPHIQF QYIRNCVMNR ALPHFILVEC CKIKKMYEQE MIAIEAAINR
421 NSSNLPLPLP PKKTRIIISHV WENNNPFQIV LVKGNKLNTE ETVKVHVVRAG LFHGTPELLCK
481 TIVSSEVSGK NDHIWNEPLE FDINICDLPR MARLCFAVYA VLDKVKTKKS TKTINPSKYQ
541 TIRKAGKVHY PVAWVNTMVF DFKGQLRTGD IILHSWSSFP DELEEMLNPM GTVQTNPYTE
601 NATALHVKFP ENKKQPYYP PFDKIIKAA EIASSDSANV SSRGGKKFLP VLKEILDRDP
661 LSQLCENEMD LIWTLRQDCR EIFPQSLPKL LLSIKWNKLE DVAQLQALLQ IWPKLPPREA
721 LELLDFNYPD QYVREYAVGC LRQMSDEELS QYLLQLVQVL KYEPFLDCAL SRFLLERALG
781 NRRIGQFLFW HLRSEVHIPA VSVQFGVILE AYCRGSVGHM KVLKQVEAL NKLKTLNLSLI
841 KLNAVKLNRA KGKEAMHTCL KQSAYREALS DLQSPNLCV ILSELYVEKC KYMDSKMKPL
901 WLVYNNKVFG EDSVGVIFKN GDDLQDMLT LQMLRLMDLL WKEAGLDLRM LPYGCLATGD
961 RSLIEVVST SETIADIQLN SSNVAATAAF NKDALLNWLK EYNSGDDLDR AIEEFTLSCA
1021 GYCVASYVLG IGDRHSDNIM VKKTGQLFHI DFGHILGNFK SKFGIKRERV PFILTYDFIH
1081 VIQQGKTGNT EKFGFRQCC EDAYLILRRH GNLFITLFAL MLTAGLPELT SVKDIQYLKD
1141 SLALGKSEEE ALKQFKQKFD EALRESWTTK VNWMAHTVRK DYRSGAHHHH HHGA

```

(SEQ ID NO: 12)

### 激酶域

### PI3K $\gamma$ 構築體及蛋白質

PI3K $\gamma$	BV950	p110 $\gamma$ ( $\Delta$ 143-[Met144-1102])-His
---------------	-------	---

構築體獲自英國醫學研究委員會劍橋分子生物學實驗室之羅傑威廉斯實驗室(2003年11月)。該構築體之描述見(Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis

of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. Cell (2000), 103(6), 931-943)。構築體缺少N末端 144 aa。

BV950之蛋白質序列：

```

1 MSEESQAFQR QLTALIGYDV TDVSNVHDE LEFTRRGLVT PRMAEVASRD PKLYAMHPWV
61 TSKPLPEYLW KKIANNCFI VIHRSTTSQT IKVSPDDTPG AILQSFFTKM AKKKS LMDIP
121 ESQSEQDFVL RVCGRDEYLV GETPIKNFQW VRHCLKNGEE IHVVLDTPPD PALDEVKKEE
181 WPLVDDCTGV TGYHEQLTIH GKDHESVFTV SLWDCDRKFR VKIRGIDIPV LPRNTDLTVF
241 VEANIQHGOQ VLCQRRTSPK PFTEEV LWNV WLEFSIKIKD LPKGALLNLQ IYCGKAPALS
301 SKASAESPSS ESKGKVRLLY YVNL LLDHR FLLRRGEYVL HMWQISGKGE DQGSFNADKL
361 TSATNPDKEN SMSISILLDN YCHPIALPKH QPTPDPEGDR VRAEMP NQLR KQLEAIIATD
421 PLNPLTAEDK ELLWHFRYES LKHPKAYPKL FSSVKWQQE IVAKTYQLLA RREVWDQSAL
481 DVGLTMQLLD CNFSDENVRA IAVQKLESLE DDDVLHYLLQ LVQAVKFEFY HDSALARFLL
541 KRGLRNKRIG HFLFWFLRSE IAQSRHYQQR FAVILEAYLR GCGTAMLHDF TQQVQVIEML
601 QKVTLDIKSL SAEKYDVSSQ VISQLKQKLE NLQNSQLPES FRVPYDPGLK AGALAI EKCK
661 VMASKKKPLW LEFKCADPTA LSNETIGIIF KHGDDL RQDM LILQILRIME SIWETESLDL
721 CLLPYGCIST GDKIGMIEIV KDATTIAKIQ QSTVGNTGAF KDEVLNHWLW EKSPTEEKFQ
781 AAVERFVYSC AGYCVATFVL GIGDRHNDNI MITETGNLFH IDFGHILGNY KSFLGINKER
841 VPFVLT PDFL FVMGTSGKKT SPHFQKFQDI CVKAYLALRH HTNLLIILFS MMLMTGMPQL
901 TSKEDIEYIR DALTVGKNEE DAKKYFLDQI EVC RDKGWTV QFNWFLHLVL GIKQGEK HSA
961 HHHHHH (SEQ ID NO: 13)

```

### PI3K $\delta$ 構築體及蛋白質

PI3K $\delta$	BV1060	p85iSH2(461-568)-GGGGGG-p110 $\delta$ (2-1044)-His
---------------	--------	--

BV1060：產生 p85 次單元之內部 SH2 域 (iSH2) 及全長 p110 $\delta$  次單元之 PCR 產物且藉由重疊 PCR 融合。藉由使用 ORF318(見上文)作為模板及引子 gwG130-p03(5'-GGGACAAG-TTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGA GATATACATATGC-GAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3')(SEQ ID NO: 7)及 gwG154-p04(5'-TCCTCCTCCT-CCT CCTCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTC-3')(SEQ ID NO: 14)產生 iSH2 PCR 產物。最初使用引子 gwG154-p01(5'-

ATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCCAT-3')(SEQ ID NO: 15) 及 gwG154-p02(5'-CTACTGCCTGT-TGTCTTTGGACACGT-3')(SEQ ID NO: 16)，自以來自胎盤、睪丸及大腦之商業人類RNA(Clontech)進行RT-PCR所產生之第一股cDNA獲得p110δ片段。在後續PCR反應中，使用引子 gw154-p03(5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGACCCCCCTGGGGTGGAC-TGCCCCATGGA-3')(SEQ ID NO: 17) 及 gwG154-p06(5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGAT-GTGCT-CCCTGCTGTTGTCTTTGGACACGTTGT-3')(SEQ ID NO: 18) 在p110δ片段之5'端及3'端分別添加連接子序列及組胺酸標籤。在第三PCR反應中，使用上述gwG130-p03引子及含有重疊組胺酸標籤及閘道(Invitrogen)AttB2重組序列之引子(5'-GGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGGTTTAA-GCTCCGTGATGGTGATGGTGAGTGCTCC-3')(SEQ ID NO: 19)，經由在iSH2片段之3'端與p110δ片段之5'端的重疊連接子來裝配p85-iSH2/p110δ融合蛋白。在閘道OR反應中將此最終產物重組至供體載體pDONR201(Invitrogen)中以產生ORF319入閘純系。藉由定序驗證此純系且將其用於閘道LR反應(Invitrogen)中以將插入物轉移至閘道調適之pBlueBac4.5(Invitrogen)載體中以供產生桿狀病毒表現載體LR415。

BV1060之蛋白質序列：



1 MREYDRLYEE YTRTSQEIOM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK  
 61 EIQRIMHNYD KLKSRISEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGPPGVD  
 121 CPMEFWTKEE NQSVVDFLL PTGVYLNFPV SRNANLSTIK QLLWHRAQYE PLFHMLSGPE  
 181 AYVFTCINQT AEQQELEDEQ RRLCDVQPFV PVLRLVAREG DRVKKLINSQ ISLLIGKGLH  
 241 EFDSLCDPEV NDFRAKMCQF CEEAAARRQQ LGWEAWLQYS FPLQLEPSAQ TWGPGTLRLP  
 301 NRALLVNVKF EGSEESFTFQ VSTKDVPLAL MACALRKKAT VFRQPLVEQP EDYTLQVNGR  
 361 HEYLYGSYPL CQFQYICSCS HSGLTPLHTM VHSSSILAMR DEQSNPAPQV QKPRAKPPPI  
 421 PAKKPSSVSL WSLEQPFRIE LIQGSKVNAD ERMKLVVQAG LFHGNEMLCK TVSSSEVSVC  
 481 SEPVWKQRLE FDINICDLPR MARLCFALYA VIEKAKKARS TKKKSKKADC PIAWANLMLF  
 541 DYKDQLKTGE RCLYMWPSVP DEKGELLNPT GTVRSNPNTD SAAALLICLP EVAPHPVYYP  
 601 ALEKILELGR HSECVHVTEE EQLQLREILE RRGSGELYEH EKDLVWKL RH EVQEHFPEAL  
 661 ARLLLVTKWN KHEDVAQMLY LLCSPPEL PV LSALELLDFS FPDCHVGSEFA IKSLRKLTD  
 721 ELFQYLLQLV QVLKYESYLD CELTKFLLDR ALANRKIGHF LFWHLRSEMH VPSVALRFGL  
 781 ILEAYCRGST HHMKVLMKQG EALSCLKALN DFKLSSQKT PKPQTKELMH LCMRQEAYLE  
 841 ALSHLQSP LD PSTLLAEVCV EQCTFMDSKM KPLWIMYSNE EAGSGGSVGI IFKNGDDL RQ  
 901 DMLTLQMIQL MDVLWKQEGL DLRMTPYGCL PTGDRTGLIE VVLRSDTIAN IQLNKS NMAA  
 961 TAAFNKDALL NWLKSKNPGE ALDRAIEEFT LSCAGYCVAT YVLGIGDRHS DNIMIRESGQ  
 1021 LFHIDFGHFL GNFKTKFGIN RERVFILTY DFKVHVIQOGK TNNSEKFERF RGYCERAYTI  
 1081 LRRHGLLFLH LFALMRAAGL PELSCSKDIQ YLKDSLALGK TEEEALKHFR VKFNEALRES  
 1141 WKTKVNWLAH NVSKDNRQEL GGAHHHHHH (SEQ ID NO: 20)

### 純化 PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 及 PI3K $\gamma$ 構築體

以兩個層析步驟純化 PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 及 PI3K $\gamma$ ：在 Ni 瓊脂糖樹脂 (GE Healthcare) 上進行固定化金屬親和性層析 (IMAC) 且利用 Superdex 200 26/60 管柱 (GE Healthcare) 進行凝膠過濾。將所有緩衝液冷卻至 4°C 且在冰上冷卻下進行溶解。在室溫下進行管柱分級。用以純化 PI3K $\beta$  之所有緩衝液除以下所述以外亦含有 0.05% Triton X100。

通常，以 1:6 v/v 球粒與溶解緩衝液比率將來自 10 L Tn5 細胞培養物之冷凍細胞再懸浮於「溶解緩衝液」20 mM Tris-Cl (pH 7.5)、500 mM NaCl、5% 甘油、5 mM 咪唑、1 mM NaF、0.1  $\mu$ g/ml 岡田井酸 (okadaic acid, OAA)、5 mM BME、1 $\times$  完全蛋白酶抑制劑混合液 - 無 EDTA (20 片錠劑 / 1 L 緩衝液, Roche Applied Sciences)、非限制性核酸內切酶

(benzonase)(25 U/mL緩衝液，EMD Biosciences)中，且藉由使用緊固配合杵搗擊20次來機械溶解。將溶解產物以45,000 g離心30分鐘，且將上清液加載至預平衡IMAC管柱上(3 mL樹脂/100 mL溶解產物)。以3-5管柱體積之溶解緩衝液洗滌管柱，接著以3-5管柱體積之20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、5%甘油、45 mM咪唑、1 mM NaF、0.1 µg/mL OAA、5 mM BME、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA進行第二次洗滌。以20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、0.5 M NaCl、5%甘油、250 mM咪唑、1 mM NaF、0.1 µg/mL OAA、5 mM BME、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA對蛋白質進行溶離。由SDS-PAGE分析有關溶離份且由此加以彙集。藉由在20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、0.5 M NaCl、5%甘油、1 mM NaF、5 mM DTT、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA中平衡之Superdex 200 26/60管柱上進行凝膠過濾來進一步純化蛋白質。由SDS-PAGE分析有關溶離份且由此加以彙集。將等體積之透析緩衝液(20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、50%甘油、5 mM NaF、5 mM DTT)添加至池中且隨後針對透析緩衝液透析兩次(每次隔夜)。將蛋白質儲存於-20°C下。

#### 純化PI3Kδ

以三個層析步驟純化PI3Kδ：在Ni瓊脂糖樹脂(GE Healthcare)上進行固定化金屬親和性層析、利用Superdex 200 26/60管柱(GE Healthcare)進行凝膠過濾且最後在Q-HP管柱(GE Healthcare)上進行離子交換步驟。將所有緩衝液



冷卻至4°C且在冰上冷卻下進行溶解。在室溫下進行管柱分級。

通常，以1:10 v/v球粒與溶解緩衝液比率將來自10 L Tn5細胞培養物之冷凍細胞再懸浮於「溶解緩衝液」20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、5%甘油、5 mM咪唑、1 mM NaF、0.1 µg/ml岡田井酸(OAA)、5 mM BME、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA(20片錠劑/1 L緩衝液，Roche Applied Sciences)、非限制性核酸內切酶(25 U/mL緩衝液，EMD Biosciences)中，且藉由使用緊固配合杵搗擊20次來機械溶解。將溶解產物以45,000 g離心30分鐘，且將上清液加載至預平衡IMAC管柱上(5 mL樹脂/100 mL溶解產物)。以3-5管柱體積之溶解緩衝液洗滌管柱，接著以3-5管柱體積之20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、5%甘油、45 mM咪唑、1 mM NaF、0.1 µg/mL OAA、5 mM BME、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA進行第二次洗滌。以20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、0.5 M NaCl、5%甘油、250 mM咪唑、1 mM NaF、0.1 µg/mL OAA、5 mM BME、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA對蛋白質進行溶離。由SDS-PAGE分析有關溶離份且由此加以彙集。藉由在20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、5%甘油、1 mM NaF、0.1 µg/mL OAA、5 mM DTT、1×完全蛋白酶抑制劑混合液-無EDTA中平衡之Superdex 200上進行凝膠過濾來進一步純化蛋白質。由SDS-PAGE分析有關溶離份且由此加以彙集。用「緩衝液A」20 mM Tris-Cl(pH 8.2)、

5%甘油、1 mM NaF、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OAA、5 mM DTT以1:10 v/v池體積與緩衝液比率來稀釋此等溶離份且將其加載至製備型Q-HP管柱上。樣品加載完成後，以緩衝液A及5%「緩衝液B」20 mM Tris-Cl(pH 8.2)、1 M NaCl、5%甘油、1 mM NaF、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OAA、5 mM DTT洗滌3-5管柱體積。使用5%-30%緩衝液B梯度對蛋白質進行溶離。通常，以約200 mM NaCl對蛋白質進行溶離。由SDS-PAGE分析有關溶離份且由此加以彙集。將等體積之透析緩衝液(20 mM Tris-Cl(pH 7.5)、500 mM NaCl、50%甘油、1 mM NaF、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OAA、5 mM DTT)添加至池中且隨後針對透析緩衝液透析2次(每次隔夜)。將蛋白質儲存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 下。

使用上述檢定獲得以下結果。

實例	PI3Ka/IC50 [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	PI3Kb/IC50 [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	PI3Kd/IC50 [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	PI3Kg/IC50 [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]
1	0.014	4.428	0.971	0.680
27	0.081	5.200	0.271	1.563
12	0.010	3.874	0.197	0.352
35	0.006	0.860	0.029	0.360
15	0.008	1.212	0.077	1.097
13	0.013	4.491	0.161	0.183
3	0.067	2.301	0.432	0.362
5	0.044	3.905	0.648	2.047
37	0.039	5.521	0.386	4.447
29	0.056	6.175	0.804	0.684
18	0.019	4.137	0.538	0.612
51	0.113	8.838	0.690	3.480
47	0.094	2.903	0.156	1.875
59	0.064	3.497	0.881	0.917
64	0.010	0.692	0.032	0.451
61	0.072	6.113	0.901	1.517
66	0.013	2.740	0.298	0.435
42	0.012	3.165	0.289	0.858
63	0.016	1.2	0.098	0.79



本發明之化合物、尤其本發明之較佳化合物顯示對PI3K $\alpha$ 相對於 $\beta$ 及/或 $\delta$ 及/或 $\gamma$ 亞型改良之選擇性，例如，如在生物化學檢定中所量測。彼等化合物亦較佳相對於 $\beta$ 及/或 $\delta$ 及/或 $\gamma$ 亞型顯示對PI3K $\alpha$ 之選擇性，如在細胞檢定中所量測。

#### 實例B：測定活體外代謝清除率

縮寫

ACN	乙腈
ADME	吸收、分布、代謝及排泄
ALP	自動化實驗室設備定位器 (Automated labware positioner)
%B	HPLC溶劑B%
BT	生物轉化(或代謝穩定性或微粒體穩定性)
[C] <sub>t=0</sub>	TA之初始(時間0)活體外濃度
CL <sub>h</sub>	肝清除率 (mL/min/kg)
CL <sub>int</sub>	內在清除率(微升反應物體積/分鐘/毫克微粒體蛋白質)
CL <sub>int,s</sub>	針對肝質量定標之內在清除率(毫升反應物體積/分鐘/公克肝)
Cyno	獼猴
CYP	細胞色素P450
DiH <sub>2</sub> O	去離子水
ER <sub>h</sub>	肝提取率
ESI	電噴霧電離

fub	藥物在血液或血漿中之游離分數
fum	藥物在微粒體中之游離分數
IS	內標
kmic	微粒體中之消除速率
KPi	0.05 M磷酸鉀緩衝液，pH 7.4
LC-MS/MS	液相層析偶合串聯質譜分析
LOD	檢測極限
M	培育中之微粒體蛋白質含量(mg/mL)
NADPH	$\beta$ -菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，還原形式
NCE	新化學實體
NSB	非特異性結合
Qh	門脈血流量(mL/min/kg)
RPM	每分鐘轉數
SD	標準差
S-D	史泊格-多利(Sprague-Dawley)
SF1	定標因子：毫克微粒體蛋白質/公克肝
SF2	定標因子：公克肝/公斤動物體重
t $\frac{1}{2}$	活體外清除半衰期(min)
TA	測試品
UDPGA	尿苷5'二磷酸葡糖醛酸
UGT	尿苷5'二磷酸葡糖醛酸轉移酶
V	反應物培育體積( $\mu$ L)

最終測試品及蛋白質濃度以及培育持續時間展示如下(表1)。選擇低測試品濃度以遵照在小於(或約等於) $K_m$ 之



濃度下評估反應動力學之假定。

已知 DMSO 對 CYP 活性具有抑制作用。因此，培養基中 DMSO 之濃度已限於 0.01% (v/v) 以使對代謝過程之干擾降至最低。

表 1：代謝清除中之最終反應組份及濃度

培育物

反應組份	最終反應物濃度
磷酸鉀 (KPi) 緩衝液，pH 7.4	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM
NADPH	1.0 mM
UDPGA <sup>a</sup>	1.0 mM
Alamethacin <sup>a</sup>	25 µg/mg 肝微粒體
肝微粒體	0.5 mg/mL
測試品	1.0 µM
CAN	0.06% (v/v)
DMSO (測試品溶劑)	0.01% (v/v)

<sup>a</sup>視情況存在之組份僅在重構 UGT (尿苷 5' 二磷酸葡糖醛酸轉移酶) 活性時方需要。

在 37°C 震盪培育下，以 96 孔格局進行典型實驗。在包括輔因子 (NADPH 及 / 或 UDPGA) 之反應中自四個時間點 (例如 0、5、15 及 30 分鐘) 收集之數據得出活體外代謝清除率。亦進行 30 分鐘陰性對照培育 (減去輔因子) 以評估與 CYP 無關之穩定性問題 (例如化學不穩定性、CYP 非依賴性代謝)。

一般而言，在0.6% ACN(v/v)之 $\text{DiH}_2\text{O}$ 溶液中將DMSO中之10 mM TA以1:1000稀釋至10  $\mu\text{M}$ 。實驗臨開始前，將1.25 mg/mL微粒體蛋白質懸浮於50 mM KPi中。為評估UGT介導之代謝作用，可首先藉由在冰上與丙甲甘肽(alamethicin)(25  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 微粒體蛋白質)一起培育5分鐘來對懸浮液進行預處理。將TA(35  $\mu\text{L}$ )添加至140  $\mu\text{L}$ 微粒體懸浮液中以形成175  $\mu\text{L}$ 酶-受質混合物。在37°C下預培育此酶-受質混合物15分鐘。藉由將25  $\mu\text{L}$ 酶-受質混合物與等體積之含有4 mM  $\text{MgCl}_2$ 之50 mM KPi組合來處理30分鐘陰性對照培育。在37°C培育30分鐘後，藉由添加50  $\mu\text{L}$ 含有MS內標(2  $\mu\text{M}$ 阿普洛爾(alprenolol))之ACN使混合物中止反應。藉由將25  $\mu\text{L}$ 酶-受質混合物與50  $\mu\text{L}$ 含有MS內標(2  $\mu\text{M}$ 阿普洛爾)之ACN直接組合來處理T=0 min時間點。添加25  $\mu\text{L}$ 輔因子溶液(於50 mM KPi中之2 mM NADPH加上4 mM  $\text{MgCl}_2$ ；視情況包括2 mM UDPGA以供CYP+UGT檢定)以模擬完全中止反應之反應混合物。

藉由將125  $\mu\text{L}$ 輔因子溶液(於50 mM KPi中之2 mM NADPH加上4 mM  $\text{MgCl}_2$ )添加至剩餘125  $\mu\text{L}$ 酶-受質混合物中來引發剩餘時間點之本體反應。對於UGT代謝，在輔因子溶液中亦包括2 mM UDPGA。在特定反應時間點(例如5、15、30分鐘)，移出反應等分試樣(50  $\mu\text{L}$ )，且藉由添加含有質譜分析內標(2  $\mu\text{M}$ 阿普洛爾)之乙腈(50  $\mu\text{L}$ )終止反應。在4°C下將所有樣品以約3400  $\times g$ 離心10分鐘，且由LC-MS/MS分析上清液以定量剩餘TA。使用相對於0分鐘之剩

餘TA百分數來評估活體外消除速率常數( $k_{mic}$ )，其可用於計算活體外代謝清除率。

在由 Waters Quattro Premiere質譜儀、ESI離子源、CTC-HTS Pal自動進樣器及Agilent LC泵組成之高效液相層析-串聯質譜分析(LC/MS)系統上進行樣品分析。在Atlantic C18管柱(2.1×30 mm, 3.5微米)上使用表2所概述之快速移動相梯度來分離樣品。移動相A由含有10 mM甲酸銨之純水組成。移動相B由含有0.01%甲酸之乙腈組成。流動速率為1 mL/min。注射體積為10  $\mu$ L。拋棄頭30秒之溶離液，以使樣品淨化。使用收集與測試化合物之分子量相關之所有碎片的強度數據的軟體MassLynx/QuanLynx來偵測化合物。收集原始數據後，必要時，軟體可組合至多3個合格碎片之概況。一般而言，對最高強度之碎片峰進行積分。

表2：HPLC之移動相梯度

時間(min)	B%
0.0	5
0.2	5
0.85	95
1.02	95
1.05	5

各微粒體消除速率 $k_{mic}$ 係基於以單峰測試之4點消除曲線。返回反應盤之LC-MS/MS原始數據作為TA及IS之經積分分析物峰面積。此等值可轉化成分析物：IS峰面積比以使數據比較標準化。

繪製反應時間點(例如 0、5、20 或 30 分鐘)對相對於 0 分鐘之剩餘 TA 百分數之自然對數的曲線(基於相對峰面積比)。如方程式(1)所示，使用此清除率曲線之斜率  $k_{mic}$  計算活體外半衰期  $t_{1/2}$ 。為集中於線性反應動力學，若有可能，則一般自清除率曲線斜率之定義排除表示 <10% 剩餘 TA 之數據點。反應  $t_{1/2}$  為用於計算  $CL_{int}$  之核心實驗值(方程式 2)。

$$\text{方程式 (1): } t_{1/2} = 0.693 / -k_{mic}$$

$$\text{方程式 (2): } CL_{int} = 0.693 / -k_{mic} \cdot V/M$$

使用上述程序獲得以下結果：

實例	CYP MetCL-Ra/CL(int) [ $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	CYP MetCL-Hu/CL(int) [ $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]
比較實例		
WO 2004/096797， 編號 133	56	37
本發明之實例		
15	29	33
61	22	19
55	29	27

**實例 C：在螢光素酶發光檢定中測定之 PI3K $\alpha$  突變體 E545K 及 H1047R 的抑制**

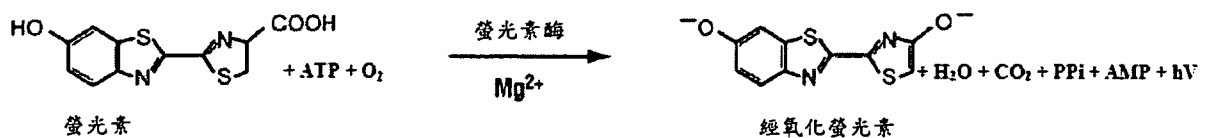
發光為測定 ATP 濃度之充分確立讀出值且由此可用以追蹤許多激酶之活性，而不用考慮其受質。KinaseGlo 發光激酶檢定 (Promega, Madison/WI, USA) 為藉由定量激酶反應後保留於溶液中之 ATP 的量來量測激酶活性之均質 HTS 方法。

在室溫下於含有 1  $\mu\text{M}$  ATP、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、50 mM NaCl、5  $\mu\text{g/ml}$  大豆磷脂醯肌醇 (Avanti Polar lipids, 目錄



號 840044C)、0.015% 辛基糖苷 (Sigma, 目錄號 O9882)、0.01% CHAPS、1 mM DTT、2.5% DMSO 及 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 之 50  $\mu$ l 培養基中培育磷酸肌醇 3-激酶。藉由添加 ATP (酶與抑制劑一起預培育 15 分鐘) 來起始激酶反應且 1 小時後以 50  $\mu$ l KinaseGlo<sup>®</sup> (Promega, 目錄號 V6714) 停止且由 Victor II 讀取器 (0.1 秒積分) 量測發光。藉由使用邏輯斯諦方程式 (205 型 XLfit<sup>®</sup>, ID Business Solutions, Guildford, UK) 進行非線性回歸分析來擬合曲線。

發光檢定 (KinaseGlo) 之檢定原理：



使用上述檢定系統且使用自下表所示之構築體獲得的 PI3K 蛋白質

類型	代碼	構築體
野生型	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGGGG-p110 $\alpha$ (21-1068)-His
E545K	BV1147	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGIMV-p110 $\alpha$ (21-E542K-1068)-His
H1047R	BV1097	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGIMV-p110 $\alpha$ (21-H1047R-1068)-His

評估針對野生型 PI3K $\alpha$  及突變 PI3K $\alpha$  之抑制活性。結果展示於下表中。

野生型 PI3K $\alpha$  及突變 PI3K $\alpha$  之抑制：

實例	野生型 PI3K $\alpha$	PI3K $\alpha$ E545K	PI3K $\alpha$ H1047R
IC <sub>50</sub> , 單位 nM			
5	8.2	6.7	7.7
15	4.6	4.0	4.8
61	3.9	2.7	3.6

BV1147：藉由以 QuickChange XL 誘變套組 (Stratagene)

進行定點誘變將許多癌症中所發現之活化突變E545K引入ORF318中。使用製造商推薦之方法及誘變引子 gwG152-p15(5'-CTCTCTGAAATCACTAAGCAGGAGAAAGATTTT-3')(SEQ ID NO: 21) 及 gwG152-p16(5'-AAAATCTTTCT-CCTGCTTAGTGATTTTCAGAGAG-3')(SEQ ID NO: 22)產生ORF544。藉由定序驗證此純系且將其用於閘道LR反應(Invitrogen)中以將插入物轉移至閘道調適之pBlueBac4.5(Invitrogen)載體中以供產生桿狀病毒表現載體LR561。

### 激酶域

BV 1147之蛋白質序列：

```

1  MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61  EIQRIMHNYD KLKSRISIEI DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFFDETRRL CDLRLFQPFV KVIIEVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESSPELPK HIYNKLDKGGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNLMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLRA ARLCLSICSV KGRKGAKKEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITKQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNNI
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNOGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTS SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISKGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSSMLGSG MPQLQSFDI AYIRKTLALD KTEQEALYF
1141 MKQMNDAAHG GWTTKMDWF HTIKQHALNE LGGAHHHHH (SEQ ID NO: 23).

```

BV1097：藉由以 QuickChange XL 誘變套組 (Stratagene) 進行定位誘變將許多癌症中所發現之活化突變H1047R引入ORF318中。使用製造商推薦之方法及誘變引子 gwG152-



p07(5'-CAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACA-3')(SEQ ID NO: 24) 及 gwG152-p11(5'-TGTCCAGCCACCATGACGTGCATCATTTCATTTG-3')(SEQ ID NO: 25)產生 ORF396。藉由定序驗證此純系且將其用於閘道 LR 反應 (Invitrogen) 中以將插入物轉移至閘道調適之 pBlueBac4.5 (Invitrogen) 載體中以供產生桿狀病毒表現載體 LR480。

激酶域

BV 1097 之蛋白質序列：

```

1  MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61  EIQRIMHNYD KLKSRRIEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEEFDETRRL CDLRLFQPFL KVIEPVG NRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNILNVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESSPELPK HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIRKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQ GK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ KYIRSCIML GRMPNLMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDL PRA ARLCLSICSV KGRKGAK EEH CPLAWGNINL FDYDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNP NKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLG NLRLEEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELFQNNEI
901 IFKNGDDL RQ DMLTLQIIRI MENIWQNQGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISKGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLF SMMLGSG MPELQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEAL EYF
1141 MKQMNDARHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 26)

```

## 序列表

<110> 瑞士商諾華公司

<120> 有機化合物

<130> PAT052777A

<140> 098130412

<141> 2009-09-09

<150> 08164104.5/2008-09-10

<151> 61/096,674/2008-09-12

<160> 26

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 1

gctagcatgc gagaatatga tagattatat gaagaatata cc 42

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 2

gcciccacca cctccgctg gtttaatgct gttcatacgt ttgtc 45

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> PCR引子

<400> 3

tactagtcgg cctccaccac ctccgcctcc accacctcgg cc 42

<210> 4

<211> 1180

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PI3K激酶構築體

<400> 4

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln  
1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile  
20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu  
35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg  
50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile



Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro  
 370 375 380

Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met  
 385 390 395 400

Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr  
 405 410 415

Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn  
 420 425 430

Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn  
 435 440 445

Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly  
 450 455 460

Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser  
 465 470 475 480

Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp  
 485 490 495

Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly  
 500 505 510

Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile  
 515 520 525

Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu  
 530 535 540

Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile  
 545 550 555 560

Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu  
 565 570 575

Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val  
 580 585 590

Ile Glu Glu His Ala Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser  
 595 600 605

Tyr Ser His Ala Gly Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu  
 610 615 620

Arg Glu Asn Asp Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro  
 625 630 635 640

Leu Ser Glu Ile Thr Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg  
 645 650 655

His Tyr Cys Val Thr Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser  
 660 665 670

Val Lys Trp Asn Ser Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val  
 675 680 685

Lys Asp Trp Pro Pro Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp  
 690 695 700

Cys Asn Tyr Pro Asp Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu  
 705 710 715 720

Glu Lys Tyr Leu Thr Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu  
 725 730 735

Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg  
 740 745 750

Phe Leu Leu Lys Lys Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe  
 755 760 765

Phe Trp His Leu Lys Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg  
 770 775 780

Phe Gly Leu Leu Leu Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu  
 785 790 795 800

Lys His Leu Asn Arg Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu  
 805 810 815

Thr Asp Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln  
 820 825 830

Met Lys Phe Leu Val Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala  
 835 840 845

Leu Gln Gly Phe Leu Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn  
 850 855 860

Leu Arg Leu Glu Glu Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu  
 865 870 875 880

Trp Leu Asn Trp Glu Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln  
 885 890 895

Asn Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met  
 900 905 910

Leu Thr Leu Gln Ile Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln  
 915 920 925

Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp  
 930 935 940

Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln  
 945 950 955 960

Ile Gln Cys Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His  
 965 970 975



Thr Leu His Gln Trp Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp  
 980 985 990

Ala Ala Ile Asp Leu Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala  
 995 1000 1005

Thr Phe Ile Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met  
 1010 1015 1020

Val Lys Asp Asp Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe  
 1025 1030 1035

Leu Asp His Lys Lys Lys Lys Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val  
 1040 1045 1050

Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly  
 1055 1060 1065

Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu Phe Glu Arg Phe Gln Glu  
 1070 1075 1080

Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg Gln His Ala Asn Leu  
 1085 1090 1095

Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Glu  
 1100 1105 1110

Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys Thr Leu Ala  
 1115 1120 1125

Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met Lys Gln  
 1130 1135 1140

Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp Trp  
 1145 1150 1155

Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn Glu Leu Gly Gly  
 1160 1165 1170

Ala His His His His His His  
 1175 1180

<210> 5  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 5  
 cgagaatag atagattata tgaagaat

28

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工



<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	6	30
	tggtttaatg ctgttcatac gtttgc	
<210>	7	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	7	60
	gggacaagtt tgtacaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgcg agaataatgat	
	agattatatg aagaat	76
<210>	8	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	8	54
	actgaagcat cctcctcctc ctcctcctgg tttaatgctg ttcatacgtt tgc	
<210>	9	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	9	54
	attaaaccag gaggaggagg aggaggatgc ttcagtttca taatgcctcc tgc	
<210>	10	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	10	57
	agctccgta tggatgatgt gatgtgctcc agatctgtag tctttccgaa ctgtgtg	
<210>	11	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	11	60
	gggaccactt tgtacaagaa agctgggttt aagctccgtg atggatgatg tgatgtgctc	
	c	61
<210>	12	
<211>	1194	
<212>	PRT	
<213>	人工	



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PI3K激酶構築體

&lt;400&gt; 12

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln  
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile  
 20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu  
 35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Lys Glu Lys Glu Ile Gln Arg  
 50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile  
 65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu  
 85 90 95

Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Cys Phe Ser Phe Ile Met Pro Pro Ala Met Ala Asp Ile  
 115 120 125

Leu Asp Ile Trp Ala Val Asp Ser Gln Ile Ala Ser Asp Gly Ser Ile  
 130 135 140

Pro Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ile Tyr Ile Gln Leu Glu Val  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Thr Ile Ser Tyr Ile Lys Gln Met Leu Trp Lys Gln  
 165 170 175

Val His Asn Tyr Pro Met Phe Asn Leu Leu Met Asp Ile Asp Ser Tyr  
 180 185 190

Met Phe Ala Cys Val Asn Gln Thr Ala Val Tyr Glu Glu Leu Glu Asp  
 195 200 205

Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp Val Arg Pro Phe Leu Pro Val Leu Lys  
 210 215 220

Leu Val Thr Arg Ser Cys Asp Pro Gly Glu Lys Leu Asp Ser Lys Ile  
 225 230 235 240

Gly Val Leu Ile Gly Lys Gly Leu His Glu Phe Asp Ser Leu Lys Asp  
 245 250 255

Pro Glu Val Asn Glu Phe Arg Arg Lys Met Arg Lys Phe Ser Glu Glu  
 260 265 270

Lys Ile Leu Ser Leu Val Gly Leu Ser Trp Met Asp Trp Leu Lys Gln

275                      280                      285  
 Thr Tyr Pro Pro Glu His Glu Pro Ser Ile Pro Glu Asn Leu Glu Asp  
     290                      295                      300  
 Lys Leu Tyr Gly Gly Lys Leu Ile Val Ala Val His Phe Glu Asn Cys  
     305                      310                      315                      320  
 Gln Asp Val Phe Ser Phe Gln Val Ser Pro Asn Met Asn Pro Ile Lys  
                             325                      330                      335  
 Val Asn Glu Leu Ala Ile Gln Lys Arg Leu Thr Ile His Gly Lys Glu  
                             340                      345                      350  
 Asp Glu Val Ser Pro Tyr Asp Tyr Val Leu Gln Val Ser Gly Arg Val  
                             355                      360                      365  
 Glu Tyr Val Phe Gly Asp His Pro Leu Ile Gln Phe Gln Tyr Ile Arg  
                             370                      375                      380  
 Asn Cys Val Met Asn Arg Ala Leu Pro His Phe Ile Leu Val Glu Cys  
     385                      390                      395                      400  
 Cys Lys Ile Lys Lys Met Tyr Glu Gln Glu Met Ile Ala Ile Glu Ala  
                             405                      410                      415  
 Ala Ile Asn Arg Asn Ser Ser Asn Leu Pro Leu Pro Leu Pro Pro Lys  
                             420                      425                      430  
 Lys Thr Arg Ile Ile Ser His Val Trp Glu Asn Asn Asn Pro Phe Gln  
                             435                      440                      445  
 Ile Val Leu Val Lys Gly Asn Lys Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Lys  
                             450                      455                      460  
 Val His Val Arg Ala Gly Leu Phe His Gly Thr Glu Leu Leu Cys Lys  
     465                      470                      475                      480  
 Thr Ile Val Ser Ser Glu Val Ser Gly Lys Asn Asp His Ile Trp Asn  
                             485                      490                      495  
 Glu Pro Leu Glu Phe Asp Ile Asn Ile Cys Asp Leu Pro Arg Met Ala  
                             500                      505                      510  
 Arg Leu Cys Phe Ala Val Tyr Ala Val Leu Asp Lys Val Lys Thr Lys  
                             515                      520                      525  
 Lys Ser Thr Lys Thr Ile Asn Pro Ser Lys Tyr Gln Thr Ile Arg Lys  
                             530                      535                      540  
 Ala Gly Lys Val His Tyr Pro Val Ala Trp Val Asn Thr Met Val Phe  
     545                      550                      555                      560  
 Asp Phe Lys Gly Gln Leu Arg Thr Gly Asp Ile Ile Leu His Ser Trp  
                             565                      570                      575



Ser Ser Phe Pro Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Asn Pro Met Gly Thr  
 580 585 590

Val Gln Thr Asn Pro Tyr Thr Glu Asn Ala Thr Ala Leu His Val Lys  
 595 600 605

Phe Pro Glu Asn Lys Lys Gln Pro Tyr Tyr Tyr Pro Pro Phe Asp Lys  
 610 615 620

Ile Ile Glu Lys Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ser Asp Ser Ala Asn Val  
 625 630 635 640

Ser Ser Arg Gly Gly Lys Lys Phe Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Leu  
 645 650 655

Asp Arg Asp Pro Leu Ser Gln Leu Cys Glu Asn Glu Met Asp Leu Ile  
 660 665 670

Trp Thr Leu Arg Gln Asp Cys Arg Glu Ile Phe Pro Gln Ser Leu Pro  
 675 680 685

Lys Leu Leu Leu Ser Ile Lys Trp Asn Lys Leu Glu Asp Val Ala Gln  
 690 695 700

Leu Gln Ala Leu Leu Gln Ile Trp Pro Lys Leu Pro Pro Arg Glu Ala  
 705 710 715 720

Leu Glu Leu Leu Asp Phe Asn Tyr Pro Asp Gln Tyr Val Arg Glu Tyr  
 725 730 735

Ala Val Gly Cys Leu Arg Gln Met Ser Asp Glu Glu Leu Ser Gln Tyr  
 740 745 750

Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Pro Phe Leu Asp Cys  
 755 760 765

Ala Leu Ser Arg Phe Leu Leu Glu Arg Ala Leu Gly Asn Arg Arg Ile  
 770 775 780

Gly Gln Phe Leu Phe Trp His Leu Arg Ser Glu Val His Ile Pro Ala  
 785 790 795 800

Val Ser Val Gln Phe Gly Val Ile Leu Glu Ala Tyr Cys Arg Gly Ser  
 805 810 815

Val Gly His Met Lys Val Leu Ser Lys Gln Val Glu Ala Leu Asn Lys  
 820 825 830

Leu Lys Thr Leu Asn Ser Leu Ile Lys Leu Asn Ala Val Lys Leu Asn  
 835 840 845

Arg Ala Lys Gly Lys Glu Ala Met His Thr Cys Leu Lys Gln Ser Ala  
 850 855 860

Tyr Arg Glu Ala Leu Ser Asp Leu Gln Ser Pro Leu Asn Pro Cys Val  
 865 870 875 880

Ile Leu Ser Glu Leu Tyr Val Glu Lys Cys Lys Tyr Met Asp Ser Lys  
 885 890 895

Met Lys Pro Leu Trp Leu Val Tyr Asn Asn Lys Val Phe Gly Glu Asp  
 900 905 910

Ser Val Gly Val Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met  
 915 920 925

Leu Thr Leu Gln Met Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Trp Lys Glu Ala  
 930 935 940

Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ala Thr Gly Asp  
 945 950 955 960

Arg Ser Gly Leu Ile Glu Val Val Ser Thr Ser Glu Thr Ile Ala Asp  
 965 970 975

Ile Gln Leu Asn Ser Ser Asn Val Ala Ala Ala Ala Ala Phe Asn Lys  
 980 985 990

Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Glu Tyr Asn Ser Gly Asp Asp Leu  
 995 1000 1005

Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser Cys Ala Gly Tyr Cys  
 1010 1015 1020

Val Ala Ser Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Ser Asp Asn  
 1025 1030 1035

Ile Met Val Lys Lys Thr Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly  
 1040 1045 1050

His Ile Leu Gly Asn Phe Lys Ser Lys Phe Gly Ile Lys Arg Glu  
 1055 1060 1065

Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Ile His Val Ile Gln  
 1070 1075 1080

Gln Gly Lys Thr Gly Asn Thr Glu Lys Phe Gly Arg Phe Arg Gln  
 1085 1090 1095

Cys Cys Glu Asp Ala Tyr Leu Ile Leu Arg Arg His Gly Asn Leu  
 1100 1105 1110

Phe Ile Thr Leu Phe Ala Leu Met Leu Thr Ala Gly Leu Pro Glu  
 1115 1120 1125

Leu Thr Ser Val Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala  
 1130 1135 1140

Leu Gly Lys Ser Glu Glu Glu Ala Leu Lys Gln Phe Lys Gln Lys  
 1145 1150 1155

Phe Asp Glu Ala Leu Arg Glu Ser Trp Thr Thr Lys Val Asn Trp  
 1160 1165 1170



Met Ala His Thr Val Arg Lys Asp Tyr Arg Ser Gly Ala His His  
1175 1180 1185

His His His His Gly Ala  
1190

<210> 13  
<211> 966  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> PI3K激酶構築體

<400> 13

Met Ser Glu Glu Ser Gln Ala Phe Gln Arg Gln Leu Thr Ala Leu Ile  
1 5 10 15

Gly Tyr Asp Val Thr Asp Val Ser Asn Val His Asp Asp Glu Leu Glu  
20 25 30

Phe Thr Arg Arg Gly Leu Val Thr Pro Arg Met Ala Glu Val Ala Ser  
35 40 45

Arg Asp Pro Lys Leu Tyr Ala Met His Pro Trp Val Thr Ser Lys Pro  
50 55 60

Leu Pro Glu Tyr Leu Trp Lys Lys Ile Ala Asn Asn Cys Ile Phe Ile  
65 70 75 80

Val Ile His Arg Ser Thr Thr Ser Gln Thr Ile Lys Val Ser Pro Asp  
85 90 95

Asp Thr Pro Gly Ala Ile Leu Gln Ser Phe Phe Thr Lys Met Ala Lys  
100 105 110

Lys Lys Ser Leu Met Asp Ile Pro Glu Ser Gln Ser Glu Gln Asp Phe  
115 120 125

Val Leu Arg Val Cys Gly Arg Asp Glu Tyr Leu Val Gly Glu Thr Pro  
130 135 140

Ile Lys Asn Phe Gln Trp Val Arg His Cys Leu Lys Asn Gly Glu Glu  
145 150 155 160

Ile His Val Val Leu Asp Thr Pro Pro Asp Pro Ala Leu Asp Glu Val  
165 170 175

Arg Lys Glu Glu Trp Pro Leu Val Asp Asp Cys Thr Gly Val Thr Gly  
180 185 190

Tyr His Glu Gln Leu Thr Ile His Gly Lys Asp His Glu Ser Val Phe  
195 200 205

Thr Val Ser Leu Trp Asp Cys Asp Arg Lys Phe Arg Val Lys Ile Arg  
210 215 220

Gly Ile Asp Ile Pro Val Leu Pro Arg Asn Thr Asp Leu Thr Val Phe  
 225 230 235 240  
 Val Glu Ala Asn Ile Gln His Gly Gln Gln Val Leu Cys Gln Arg Arg  
 245 250 255  
 Thr Ser Pro Lys Pro Phe Thr Glu Glu Val Leu Trp Asn Val Trp Leu  
 260 265 270  
 Glu Phe Ser Ile Lys Ile Lys Asp Leu Pro Lys Gly Ala Leu Leu Asn  
 275 280 285  
 Leu Gln Ile Tyr Cys Gly Lys Ala Pro Ala Leu Ser Ser Lys Ala Ser  
 290 295 300  
 Ala Glu Ser Pro Ser Ser Glu Ser Lys Gly Lys Val Arg Leu Leu Tyr  
 305 310 315  
 Tyr Val Asn Leu Leu Leu Ile Asp His Arg Phe Leu Leu Arg Arg Gly  
 325 330 335  
 Glu Tyr Val Leu His Met Trp Gln Ile Ser Gly Lys Gly Glu Asp Gln  
 340 345 350  
 Gly Ser Phe Asn Ala Asp Lys Leu Thr Ser Ala Thr Asn Pro Asp Lys  
 355 360 365  
 Glu Asn Ser Met Ser Ile Ser Ile Leu Leu Asp Asn Tyr Cys His Pro  
 370 375 380  
 Ile Ala Leu Pro Lys His Gln Pro Thr Pro Asp Pro Glu Gly Asp Arg  
 385 390 395 400  
 Val Arg Ala Glu Met Pro Asn Gln Leu Arg Lys Gln Leu Glu Ala Ile  
 405 410 415  
 Ile Ala Thr Asp Pro Leu Asn Pro Leu Thr Ala Glu Asp Lys Glu Leu  
 420 425 430  
 Leu Trp His Phe Arg Tyr Glu Ser Leu Lys His Pro Lys Ala Tyr Pro  
 435 440 445  
 Lys Leu Phe Ser Ser Val Lys Trp Gly Gln Gln Glu Ile Val Ala Lys  
 450 455 460  
 Thr Tyr Gln Leu Leu Ala Arg Arg Glu Val Trp Asp Gln Ser Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Asp Val Gly Leu Thr Met Gln Leu Leu Asp Cys Asn Phe Ser Asp Glu  
 485 490 495  
 Asn Val Arg Ala Ile Ala Val Gln Lys Leu Glu Ser Leu Glu Asp Asp  
 500 505 510  
 Asp Val Leu His Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Val Lys Phe Glu  
 515 520 525



Pro Tyr His Asp Ser Ala Leu Ala Arg Phe Leu Leu Lys Arg Gly Leu  
 530 535 540

Arg Asn Lys Arg Ile Gly His Phe Leu Phe Trp Phe Leu Arg Ser Glu  
 545 550 555 560

Ile Ala Gln Ser Arg His Tyr Gln Gln Arg Phe Ala Val Ile Leu Glu  
 565 570 575

Ala Tyr Leu Arg Gly Cys Gly Thr Ala Met Leu His Asp Phe Thr Gln  
 580 585 590

Gln Val Gln Val Ile Glu Met Leu Gln Lys Val Thr Leu Asp Ile Lys  
 595 600 605

Ser Leu Ser Ala Glu Lys Tyr Asp Val Ser Ser Gln Val Ile Ser Gln  
 610 615 620

Leu Lys Gln Lys Leu Glu Asn Leu Gln Asn Ser Gln Leu Pro Glu Ser  
 625 630 635 640

Phe Arg Val Pro Tyr Asp Pro Gly Leu Lys Ala Gly Ala Leu Ala Ile  
 645 650 655

Glu Lys Cys Lys Val Met Ala Ser Lys Lys Lys Pro Leu Trp Leu Glu  
 660 665 670

Phe Lys Cys Ala Asp Pro Thr Ala Leu Ser Asn Glu Thr Ile Gly Ile  
 675 680 685

Ile Phe Lys His Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Ile Leu Gln  
 690 695 700

Ile Leu Arg Ile Met Glu Ser Ile Trp Glu Thr Glu Ser Leu Asp Leu  
 705 710 715 720

Cys Leu Leu Pro Tyr Gly Cys Ile Ser Thr Gly Asp Lys Ile Gly Met  
 725 730 735

Ile Glu Ile Val Lys Asp Ala Thr Thr Ile Ala Lys Ile Gln Gln Ser  
 740 745 750

Thr Val Gly Asn Thr Gly Ala Phe Lys Asp Glu Val Leu Asn His Trp  
 755 760 765

Leu Lys Glu Lys Ser Pro Thr Glu Glu Lys Phe Gln Ala Ala Val Glu  
 770 775 780

Arg Phe Val Tyr Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Val Leu  
 785 790 795 800

Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Asp Asn Ile Met Ile Thr Glu Thr Gly  
 805 810 815

Asn Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Ile Leu Gly Asn Tyr Lys Ser



	820		825		830										
Phe	Leu	Gly	Ile	Asn	Lys	Glu	Arg	Val	Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Pro	Asp
		835					840					845			
Phe	Leu	Phe	Val	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ser	Pro	His	Phe
	850					855					860				
Gln	Lys	Phe	Gln	Asp	Ile	Cys	Val	Lys	Ala	Tyr	Leu	Ala	Leu	Arg	His
865					870					875					880
His	Thr	Asn	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Met	Leu	Met	Thr	Gly
			885						890					895	
Met	Pro	Gln	Leu	Thr	Ser	Lys	Glu	Asp	Ile	Glu	Tyr	Ile	Arg	Asp	Ala
			900					905					910		
Leu	Thr	Val	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Tyr	Phe	Leu	Asp
		915				920						925			
Gln	Ile	Glu	Val	Cys	Arg	Asp	Lys	Gly	Trp	Thr	Val	Gln	Phe	Asn	Trp
	930					935					940				
Phe	Leu	His	Leu	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Gln	Gly	Glu	Lys	His	Ser	Ala
945					950					955					960
His	His	His	His	His	His										
					965										

<210> 14  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 14 45  
 tctcctcct cctcctcctg gtttaatgct gttcatagct ttgtc

<210> 15  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 15 26  
 atgccccctg gggiggactg ccccat

<210> 16  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 16 26  
 ctactgcctg ttgtctttgg acacgt



<210> 17  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 17  
 attaaaccag gaggaggagg aggaggaccc cctggggigg actgcccacat gga 53

<210> 18  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 18  
 agctccgtga tggatgatggt gatgtgctcc ctgccigtgg tctttggaca cgttgt 56

<210> 19  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 19  
 gggaccactt tgtacaagaa agctgggittt aagctccgtg atggatgatgg tgagtgtccc 60

<210> 20  
 <211> 1169  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PI3K激酶構築體

<400> 20

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln  
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile  
 20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu  
 35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg  
 50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile  
 65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu  
 85 90 95

Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Pro Pro Gly Val Asp Cys Pro Met Glu Phe Trp Thr Lys

115                      120                      125  
 Glu Glu Asn Gln Ser Val Val Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Val  
 130                      135                      140  
 Tyr Leu Asn Phe Pro Val Ser Arg Asn Ala Asn Leu Ser Thr Ile Lys  
 145                      150                      155                      160  
 Gln Leu Leu Trp His Arg Ala Gln Tyr Glu Pro Leu Phe His Met Leu  
 165                      170                      175  
 Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Val Phe Thr Cys Ile Asn Gln Thr Ala Glu  
 180                      185                      190  
 Gln Gln Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Arg Leu Cys Asp Val Gln Pro  
 195                      200                      205  
 Phe Leu Pro Val Leu Arg Leu Val Ala Arg Glu Gly Asp Arg Val Lys  
 210                      215                      220  
 Lys Leu Ile Asn Ser Gln Ile Ser Leu Leu Ile Gly Lys Gly Leu His  
 225                      230                      235                      240  
 Glu Phe Asp Ser Leu Cys Asp Pro Glu Val Asn Asp Phe Arg Ala Lys  
 245                      250                      255  
 Met Cys Gln Phe Cys Glu Glu Ala Ala Ala Arg Arg Gln Gln Leu Gly  
 260                      265                      270  
 Trp Glu Ala Trp Leu Gln Tyr Ser Phe Pro Leu Gln Leu Glu Pro Ser  
 275                      280                      285  
 Ala Gln Thr Trp Gly Pro Gly Thr Leu Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu  
 290                      295                      300  
 Leu Val Asn Val Lys Phe Glu Gly Ser Glu Glu Ser Phe Thr Phe Gln  
 305                      310                      315  
 Val Ser Thr Lys Asp Val Pro Leu Ala Leu Met Ala Cys Ala Leu Arg  
 325                      330                      335  
 Lys Lys Ala Thr Val Phe Arg Gln Pro Leu Val Glu Gln Pro Glu Asp  
 340                      345                      350  
 Tyr Thr Leu Gln Val Asn Gly Arg His Glu Tyr Leu Tyr Gly Ser Tyr  
 355                      360                      365  
 Pro Leu Cys Gln Phe Gln Tyr Ile Cys Ser Cys Leu His Ser Gly Leu  
 370                      375                      380  
 Thr Pro His Leu Thr Met Val His Ser Ser Ser Ile Leu Ala Met Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Glu Gln Ser Asn Pro Ala Pro Gln Val Gln Lys Pro Arg Ala Lys  
 405                      410                      415



Pro Pro Pro Ile Pro Ala Lys Lys Pro Ser Ser Val Ser Leu Trp Ser  
 420 425 430

Leu Glu Gln Pro Phe Arg Ile Glu Leu Ile Gln Gly Ser Lys Val Asn  
 435 440 445

Ala Asp Glu Arg Met Lys Leu Val Val Gln Ala Gly Leu Phe His Gly  
 450 455 460

Asn Glu Met Leu Cys Lys Thr Val Ser Ser Ser Glu Val Ser Val Cys  
 465 470 475 480

Ser Glu Pro Val Trp Lys Gln Arg Leu Glu Phe Asp Ile Asn Ile Cys  
 485 490 495

Asp Leu Pro Arg Met Ala Arg Leu Cys Phe Ala Leu Tyr Ala Val Ile  
 500 505 510

Glu Lys Ala Lys Lys Ala Arg Ser Thr Lys Lys Lys Ser Lys Lys Ala  
 515 520 525

Asp Cys Pro Ile Ala Trp Ala Asn Leu Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp  
 530 535 540

Gln Leu Lys Thr Gly Glu Arg Cys Leu Tyr Met Trp Pro Ser Val Pro  
 545 550 555 560

Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Asn Pro Thr Gly Thr Val Arg Ser Asn  
 565 570 575

Pro Asn Thr Asp Ser Ala Ala Ala Leu Leu Ile Cys Leu Pro Glu Val  
 580 585 590

Ala Pro His Pro Val Tyr Tyr Pro Ala Leu Glu Lys Ile Leu Glu Leu  
 595 600 605

Gly Arg His Ser Glu Cys Val His Val Thr Glu Glu Glu Gln Leu Gln  
 610 615 620

Leu Arg Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Glu Leu Tyr Glu His  
 625 630 635 640

Glu Lys Asp Leu Val Trp Lys Leu Arg His Glu Val Gln Glu His Phe  
 645 650 655

Pro Glu Ala Leu Ala Arg Leu Leu Leu Val Thr Lys Trp Asn Lys His  
 660 665 670

Glu Asp Val Ala Gln Met Leu Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Pro Glu Leu  
 675 680 685

Pro Val Leu Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asp Phe Ser Phe Pro Asp Cys  
 690 695 700

His Val Gly Ser Phe Ala Ile Lys Ser Leu Arg Lys Leu Thr Asp Asp  
 705 710 715 720

Glu Leu Phe Gln Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu  
 725 730 735  
 Ser Tyr Leu Asp Cys Glu Leu Thr Lys Phe Leu Leu Asp Arg Ala Leu  
 740 745 750  
 Ala Asn Arg Lys Ile Gly His Phe Leu Phe Trp His Leu Arg Ser Glu  
 755 760 765  
 Met His Val Pro Ser Val Ala Leu Arg Phe Gly Leu Ile Leu Glu Ala  
 770 775 780  
 Tyr Cys Arg Gly Ser Thr His His Met Lys Val Leu Met Lys Gln Gly  
 785 790 795 800  
 Glu Ala Leu Ser Lys Leu Lys Ala Leu Asn Asp Phe Val Lys Leu Ser  
 805 810 815  
 Ser Gln Lys Thr Pro Lys Pro Gln Thr Lys Glu Leu Met His Leu Cys  
 820 825 830  
 Met Arg Gln Glu Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Gln Ser Pro  
 835 840 845  
 Leu Asp Pro Ser Thr Leu Leu Ala Glu Val Cys Val Glu Gln Cys Thr  
 850 855 860  
 Phe Met Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser Asn Glu  
 865 870 875 880  
 Glu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp  
 885 890 895  
 Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu Met Asp  
 900 905 910  
 Val Leu Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro Tyr Gly  
 915 920 925  
 Cys Leu Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val Leu Arg  
 930 935 940  
 Ser Asp Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met Ala Ala  
 945 950 955 960  
 Thr Ala Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Lys  
 965 970 975  
 Asn Pro Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser  
 980 985 990  
 Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg  
 995 1000 1005  
 His Ser Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe His  
 1010 1015 1020



Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly  
 1025 1030 1035

Ile Asn Arg Glu Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val  
 1040 1045 1050

His Val Ile Gln Gln Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu  
 1055 1060 1065

Arg Phe Arg Gly Tyr Cys Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg  
 1070 1075 1080

His Gly Leu Leu Phe Leu His Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala  
 1085 1090 1095

Gly Leu Pro Glu Leu Ser Cys Ser Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys  
 1100 1105 1110

Asp Ser Leu Ala Leu Gly Lys Thr Glu Glu Glu Ala Leu Lys His  
 1115 1120 1125

Phe Arg Val Lys Phe Asn Glu Ala Leu Arg Glu Ser Trp Lys Thr  
 1130 1135 1140

Lys Val Asn Trp Leu Ala His Asn Val Ser Lys Asp Asn Arg Gln  
 1145 1150 1155

Glu Leu Gly Gly Ala His His His His His His  
 1160 1165

<210> 21  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 21  
 ctctctgaaa tcactaagca ggagaaagat ttt

33

<210> 22  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 22  
 aaaatctttc tcctgcttag tgatttcaga gag

33

<210> 23  
 <211> 1180  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PI3K激酶構築體

<400> 23

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile  
 20 25 30  
 Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu  
 35 40 45  
 Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg  
 50 55 60  
 Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu  
 85 90 95  
 Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Ile  
 100 105 110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Met Val Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro  
 115 120 125  
 Asn Gly Met Ile Val Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile  
 130 135 140  
 Thr Ile Lys His Glu Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Leu Gln Asp Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln  
 165 170 175  
 Glu Ala Glu Arg Glu Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp  
 180 185 190  
 Leu Arg Leu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn  
 195 200 205  
 Arg Glu Glu Lys Ile Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met  
 210 215 220  
 Pro Val Cys Glu Phe Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe  
 225 230 235 240  
 Arg Arg Asn Ile Leu Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp  
 245 250 255  
 Leu Asn Ser Pro His Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val  
 260 265 270  
 Glu Ser Ser Pro Glu Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys  
 275 280 285  
 Gly Gln Ile Ile Val Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp  
 290 295 300



Lys Gln Lys Tyr Thr Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Val Ile Ala Glu Ala Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser  
 325 330 335  
 Ser Glu Gln Leu Lys Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile  
 340 345 350  
 Leu Lys Val Cys Gly Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu  
 355 360 365  
 Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro  
 370 375 380  
 Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met  
 385 390 395 400  
 Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr  
 405 410 415  
 Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn  
 420 425 430  
 Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn  
 435 440 445  
 Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly  
 450 455 460  
 Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp  
 485 490 495  
 Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly  
 500 505 510  
 Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile  
 515 520 525  
 Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu  
 530 535 540  
 Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile  
 545 550 555 560  
 Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu  
 565 570 575  
 Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val  
 580 585 590  
 Ile Glu Glu His Ala Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser



595                      600                      605  
 Tyr Ser His Ala Gly Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu  
 610                      615                      620  
 Arg Glu Asn Asp Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro  
 625                      630                      635                      640  
 Leu Ser Glu Ile Thr Lys Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg  
 645                      650                      655  
 His Tyr Cys Val Thr Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser  
 660                      665                      670  
 Val Lys Trp Asn Ser Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val  
 675                      680                      685  
 Lys Asp Trp Pro Pro Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp  
 690                      695                      700  
 Cys Asn Tyr Pro Asp Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu  
 705                      710                      715                      720  
 Glu Lys Tyr Leu Thr Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu  
 725                      730                      735  
 Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg  
 740                      745                      750  
 Phe Leu Leu Lys Lys Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe  
 755                      760                      765  
 Phe Trp His Leu Lys Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg  
 770                      775                      780  
 Phe Gly Leu Leu Leu Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu  
 785                      790                      795                      800  
 Lys His Leu Asn Arg Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu  
 805                      810  
 Thr Asp Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln  
 820                      825                      830  
 Met Lys Phe Leu Val Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala  
 835                      840                      845  
 Leu Gln Gly Phe Leu Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn  
 850                      855                      860  
 Leu Arg Leu Glu Glu Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu  
 865                      870                      875                      880  
 Trp Leu Asn Trp Glu Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln  
 885                      890                      895



Asn Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met  
 900 905 910

Leu Thr Leu Gln Ile Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln  
 915 920 925

Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp  
 930 935 940

Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln  
 945 950 955 960

Ile Gln Cys Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His  
 965 970 975

Thr Leu His Gln Trp Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp  
 980 985 990

Ala Ala Ile Asp Leu Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala  
 995 1000 1005

Thr Phe Ile Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met  
 1010 1015 1020

Val Lys Asp Asp Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe  
 1025 1030 1035

Leu Asp His Lys Lys Lys Lys Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val  
 1040 1045 1050

Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly  
 1055 1060 1065

Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu Phe Glu Arg Phe Gln Glu  
 1070 1075 1080

Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg Gln His Ala Asn Leu  
 1085 1090 1095

Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Glu  
 1100 1105 1110

Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys Thr Leu Ala  
 1115 1120 1125

Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met Lys Gln  
 1130 1135 1140

Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp Trp  
 1145 1150 1155

Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn Glu Leu Gly Gly  
 1160 1165 1170

Ala His His His His His His  
 1175 1180

<210> 24  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 24 33  
 caaatgaatg atgcacgtca tggtagctgg aca

<210> 25  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PCR引子

<400> 25 33  
 tgtccagcca ccatgacgtg catcattcat ttg

<210> 26  
 <211> 1180  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> PI3K激酶構築體

<400> 26

Met Arg Glu Tyr Asp Arg Leu Tyr Glu Glu Tyr Thr Arg Thr Ser Gln  
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Met Lys Arg Thr Ala Ile Glu Ala Phe Asn Glu Thr Ile  
 20 25 30

Lys Ile Phe Glu Glu Gln Cys Gln Thr Gln Glu Arg Tyr Ser Lys Glu  
 35 40 45

Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Arg Glu Gly Asn Glu Lys Glu Ile Gln Arg  
 50 55 60

Ile Met His Asn Tyr Asp Lys Leu Lys Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ile  
 65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Arg Leu Glu Glu Asp Leu Lys Lys Gln Ala Ala Glu  
 85 90 95

Tyr Arg Glu Ile Asp Lys Arg Met Asn Ser Ile Lys Pro Gly Gly Ile  
 100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Met Val Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro  
 115 120 125

Asn Gly Met Ile Val Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile  
 130 135 140

Thr Ile Lys His Glu Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His  
 145 150 155 160



Gln Leu Leu Gln Asp Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln  
 165 170 175

Glu Ala Glu Arg Glu Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp  
 180 185 190

Leu Arg Leu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn  
 195 200 205

Arg Glu Glu Lys Ile Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met  
 210 215 220

Pro Val Cys Glu Phe Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe  
 225 230 235 240

Arg Arg Asn Ile Leu Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp  
 245 250 255

Leu Asn Ser Pro His Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val  
 260 265 270

Glu Ser Ser Pro Glu Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys  
 275 280 285

Gly Gln Ile Ile Val Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp  
 290 295 300

Lys Gln Lys Tyr Thr Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln  
 305 310 315 320

Val Ile Ala Glu Ala Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser  
 325 330 335

Ser Glu Gln Leu Lys Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile  
 340 345 350

Leu Lys Val Cys Gly Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu  
 355 360 365

Ser Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro  
 370 375 380

Asn Leu Met Leu Met Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met  
 385 390 395 400

Asp Cys Phe Thr Met Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr  
 405 410 415

Pro Tyr Met Asn Gly Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn  
 420 425 430

Ser Ala Leu Arg Ile Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn  
 435 440 445

Ile Arg Asp Ile Asp Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly  
 450 455 460

Gly Glu Pro Leu Cys Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser  
 465 470 475 480

Asn Pro Arg Trp Asn Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp  
 485 490 495

Leu Pro Arg Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly  
 500 505 510

Arg Lys Gly Ala Lys Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile  
 515 520 525

Asn Leu Phe Asp Tyr Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu  
 530 535 540

Asn Leu Trp Pro Val Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile  
 545 550 555 560

Gly Val Thr Gly Ser Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu  
 565 570 575

Glu Phe Asp Trp Phe Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val  
 580 585 590

Ile Glu Glu His Ala Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser  
 595 600 605

Tyr Ser His Ala Gly Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu  
 610 615 620

Arg Glu Asn Asp Lys Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro  
 625 630 635 640

Leu Ser Glu Ile Thr Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg  
 645 650 655

His Tyr Cys Val Thr Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Ser  
 660 665 670

Val Lys Trp Asn Ser Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val  
 675 680 685

Lys Asp Trp Pro Pro Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp  
 690 695 700

Cys Asn Tyr Pro Asp Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu  
 705 710 715 720

Glu Lys Tyr Leu Thr Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu  
 725 730 735

Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg  
 740 745 750

Phe Leu Leu Lys Lys Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe  
 755 760 765



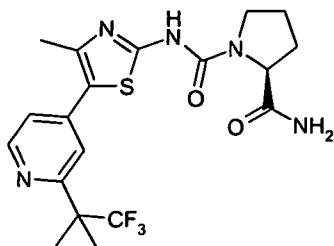
Phe Trp His Leu Lys Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg  
 770 775 780  
 Phe Gly Leu Leu Leu Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu  
 785 790 795 800  
 Lys His Leu Asn Arg Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu  
 805 810 815  
 Thr Asp Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln  
 820 825 830  
 Met Lys Phe Leu Val Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala  
 835 840 845  
 Leu Gln Gly Phe Leu Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn  
 850 855 860  
 Leu Arg Leu Glu Glu Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu  
 865 870 875  
 Trp Leu Asn Trp Glu Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln  
 885 890 895  
 Asn Asn Glu Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met  
 900 905 910  
 Leu Thr Leu Gln Ile Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln  
 915 920 925  
 Gly Leu Asp Leu Arg Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp  
 930 935 940  
 Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln  
 945 950 955 960  
 Ile Gln Cys Lys Gly Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His  
 965 970 975  
 Thr Leu His Gln Trp Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp  
 980 985 990  
 Ala Ala Ile Asp Leu Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala  
 995 1000 1005  
 Thr Phe Ile Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met  
 1010 1015 1020  
 Val Lys Asp Asp Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe  
 1025 1030 1035  
 Leu Asp His Lys Lys Lys Lys Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val  
 1040 1045 1050  
 Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly

1055		1060		1065
Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu Phe Glu Arg Phe Gln Glu				
1070		1075		1080
Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg Gln His Ala Asn Leu				
1085		1090		1095
Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Glu				
1100		1105		1110
Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys Thr Leu Ala				
1115		1120		1125
Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met Lys Gln				
1130		1135		1140
Met Asn Asp Ala Arg His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp Trp				
1145		1150		1155
Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn Glu Leu Gly Gly				
1160		1165		1170
Ala His His His His His His				
1175		1180		



## 七、申請專利範圍：

1. 一種化合物，其為具下列結構之(S)-吡咯啉-1,2-二甲酸2-醯胺1-({4-甲基-5-[2-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基)-吡啶-4-基]-噻唑-2-基}-醯胺)：



或其醫藥學上可接受之鹽。

2. 如請求項1之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其係用作藥品。
3. 如請求項1之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其係用於治療增生性疾病。
4. 如請求項3之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其中該增生性疾病包括良性或惡性腫瘤、癌症、腫瘤疾病、真性紅血球增多症、原發性(essential)血小板增多症、伴有骨髓化生(metaplasia)之骨髓纖維化、及瓦爾登斯特倫病(Walden stroem disease)。
5. 如請求項4之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其中癌症係選自以下：肉瘤、肺癌、支氣管癌、前列腺癌、乳癌、胰腺癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸癌瘤、結腸直腸腺瘤、甲狀腺癌、肝癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、腎上腺癌、胃癌(stomach cancer、gastric cancer)、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、子宮內膜癌、黑色素



瘤、腎癌、腎盂癌、膀胱癌、子宮體癌、子宮頸癌、陰道癌、卵巢癌、多發性骨髓瘤、食道癌、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴球性白血病、骨髓白血病、腦癌、腦癌瘤、口腔與咽癌、喉癌、小腸癌、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、黑色素瘤、絨毛狀結腸腺瘤、贅瘤形成、具上皮特徵之贅瘤形成、淋巴瘤、乳腺癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌及光化性角化症。

6. 如請求項5之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其中乳癌包括偶發性乳癌及考登病(Cowden disease)患者。
7. 如請求項4之化合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其中腫瘤疾病包括實體腫瘤及頸部或頭部腫瘤。
8. 一種如請求項1之化合物或醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製造供治療一或多種增生性疾病之藥劑。
9. 如請求項8之用途，其中該增生性疾病包括良性或惡性腫瘤、癌症、腫瘤疾病、真性紅血球增多症、原發性血小板增多症、伴有骨髓化生之骨髓纖維化、及瓦爾登斯特倫病。
10. 如請求項9之用途，其中癌症係選自以下：肉瘤、肺癌、支氣管癌、前列腺癌、乳癌、胰腺癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸癌瘤、結腸直腸腺瘤、甲狀腺癌、肝癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、腎上腺癌、胃癌(stomach cancer、gastric cancer)、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、子宮內膜癌、黑色素瘤、腎癌、腎盂癌、膀

膀胱癌、子宮體癌、子宮頸癌、陰道癌、卵巢癌、多發性骨髓瘤、食道癌、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴球性白血病、骨髓白血病、腦癌、腦癌瘤、口腔與咽癌、喉癌、小腸癌、非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、絨毛狀結腸腺瘤、贅瘤形成、具上皮特徵之贅瘤形成、淋巴瘤、乳腺癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌及光化性角化症。

11. 如請求項如請求項10之用途，其中乳癌包括偶發性乳癌及考登病患者。
12. 如請求項如請求項9之用途，其中腫瘤疾病包括實體腫瘤及頸部或頭部腫瘤。
13. 如請求項8之用途，其中該藥劑進一步包含治療有效量之一或多種組合搭配物，其與如請求項1之化合物或其醫藥學上可接受之鹽同時或依序使用。
14. 一種醫藥組合物，其特徵為包含治療有效量之如請求項1之化合物或其醫藥學上可接受之鹽及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。
15. 如請求項14之醫藥組合物，其係用於治療增生性疾病。
16. 如請求項15之醫藥組合物，其中該增生性疾病包括良性或惡性腫瘤、癌症、腫瘤疾病、真性紅血球增多症、原發性血小板增多症、伴有骨髓化生之骨髓纖維化、及瓦爾登斯特倫病。
17. 如請求項16之醫藥組合物，其中癌症係選自以下：肉瘤、肺癌、支氣管癌、前列腺癌、乳癌、胰腺癌、胃腸

癌、結腸癌、直腸癌、結腸癌瘤、結腸直腸腺瘤、甲狀腺癌、肝癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、腎上腺癌、胃癌、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、子宮內膜癌、黑色素瘤、腎癌、腎盂癌、膀胱癌、子宮體癌、子宮頸癌、陰道癌、卵巢癌、多發性骨髓瘤、食道癌、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴球性白血病、骨髓白血病、腦癌、腦癌瘤、口腔與咽癌、喉癌、小腸癌、非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、絨毛狀結腸腺瘤、贅瘤形成、具上皮特徵之贅瘤形成、淋巴瘤、乳腺癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌及光化性角化症。

18. 如請求項如請求項17之醫藥組合物，其中乳癌包括偶發性乳癌及考登病患者。
19. 如請求項如請求項16之醫藥組合物，其中腫瘤疾病包括實體腫瘤及頸部或頭部腫瘤。
20. 一種組合型醫藥組合物，其適於同時或依序投藥，其包含治療有效量之如請求項1之化合物或其醫藥學上可接受之鹽及治療有效量之一或多種組合搭配物；及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。
21. 如請求項20之組合型醫藥組合物，其係用於治療增生性疾病。
22. 如請求項21之組合型醫藥組合物，其中該增生性疾病包括良性或惡性腫瘤、癌症、腫瘤疾病、真性紅血球增多症、原發性血小板增多症、伴有骨髓化生之骨髓纖維化、及瓦爾登斯特倫病。

23. 如請求項22之組合型醫藥組合物，其中癌症係選自以下：肉瘤、肺癌、支氣管癌、前列腺癌、乳癌、胰腺癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸癌瘤、結腸直腸腺瘤、甲狀腺癌、肝癌、肝內膽管癌、肝細胞癌、腎上腺癌、胃癌、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、子宮內膜癌、黑色素瘤、腎癌、腎盂癌、膀胱癌、子宮體癌、子宮頸癌、陰道癌、卵巢癌、多發性骨髓瘤、食道癌、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴球性白血病、骨髓白血病、腦癌、腦癌瘤、口腔與咽癌、喉癌、小腸癌、非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、絨毛狀結腸腺瘤、贅瘤形成、具上皮特徵之贅瘤形成、淋巴瘤、乳腺癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌及光化性角化症。
24. 如請求項如請求項23之組合型醫藥組合物，其中乳癌包括偶發性乳癌及考登病患者。
25. 如請求項如請求項22之組合型醫藥組合物，其中腫瘤疾病包括實體腫瘤及頸部或頭部腫瘤。