



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I693218 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：104135473

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 28 日

(51)Int. Cl. : C07D401/14 (2006.01)

A61K31/444 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/11/14 美國

62/079,742

(71)申請人：美商美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：亨瑞 詹姆士 羅伯特 HENRY, JAMES ROBERT (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201339150A

WO 2009/104802A1

審查人員：陳世芹

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：0 共 39 頁

(54)名稱

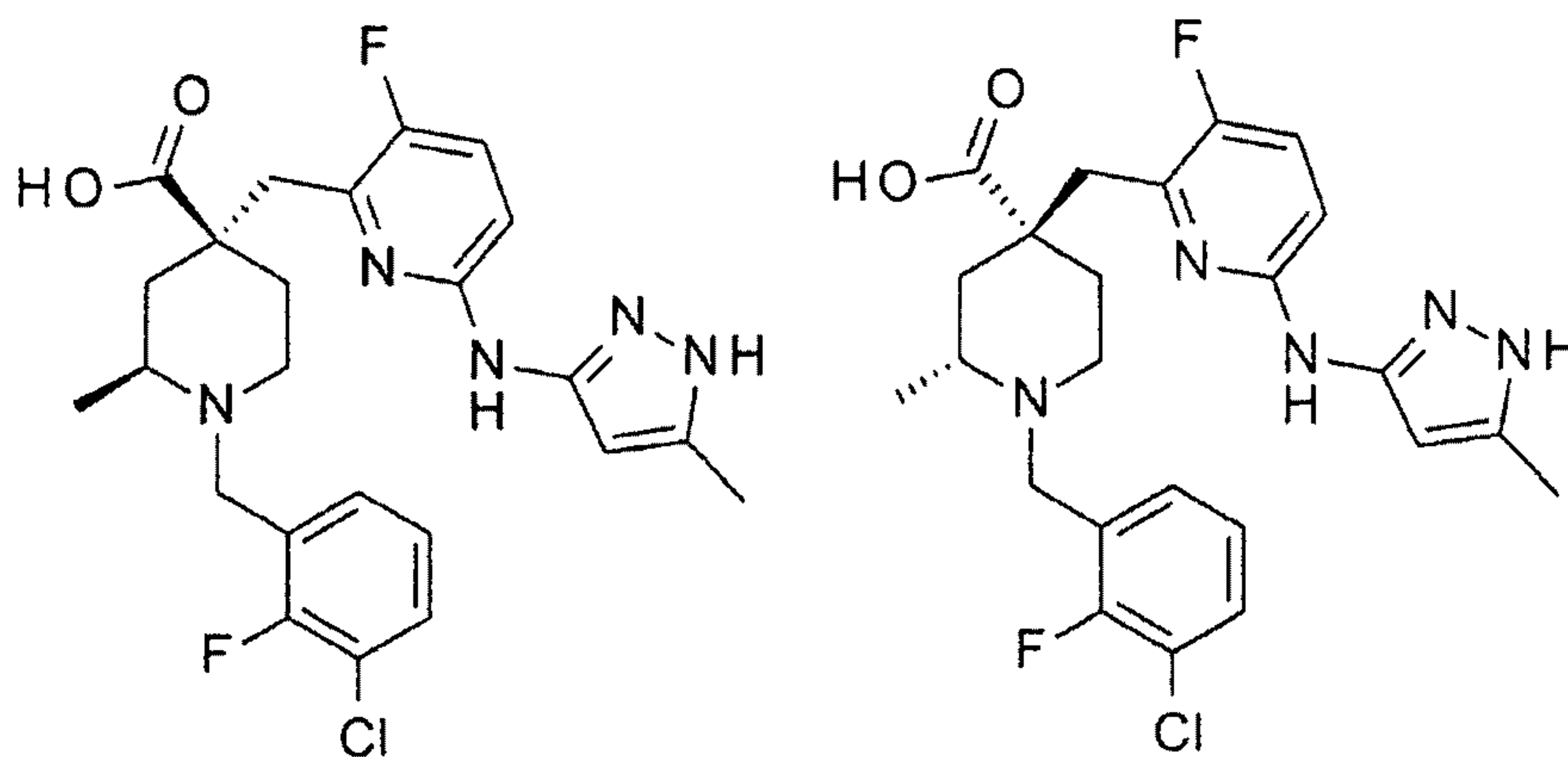
極光 A 激酶抑制劑

(57)摘要

本發明提供抑制極光 A 且因此可用於治療癌症之胺基吡啶化合物或其醫藥上可接受之鹽。

The present invention provides an aminopyridine compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, that inhibits Aurora A and, therefore may be useful in treating cancer.

特徵化學式：



I693218

發明摘要

※ 申請案號：104135473

※ 申請日：104年10月28日

※IPC 分類：**C07D 401/14** (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

極光A激酶抑制劑

AURORA A KINASE INHIBITOR

【中文】

本發明提供抑制極光A且因此可用於治療癌症之胺基吡啶化合物或其醫藥上可接受之鹽。

【英文】

The present invention provides an aminopyridine compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, that inhibits Aurora A and, therefore may be useful in treating cancer.

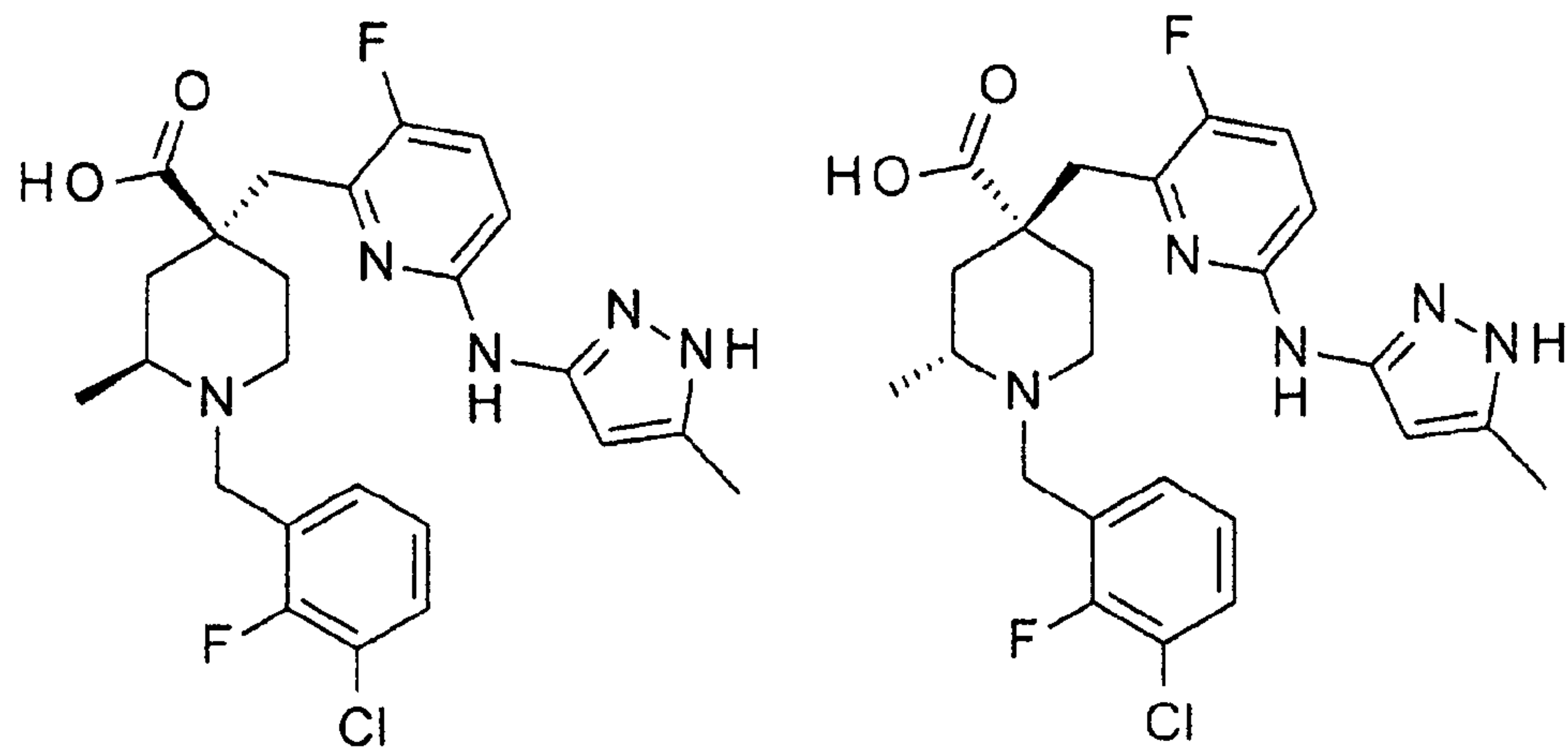
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

極光A激酶抑制劑

AURORA A KINASE INHIBITOR

本發明係關於抑制極光A且可用於治療癌症之胺基吡啶化合物或其醫藥上可接受之鹽。

極光激酶係絲胺酸/蘇胺酸激酶家族且係有絲分裂之關鍵調節劑。存在極光激酶之三種人類同系物A、B及C，其中極光A涉及不同組織學起源之癌症且可在過度表現時具有致癌性。

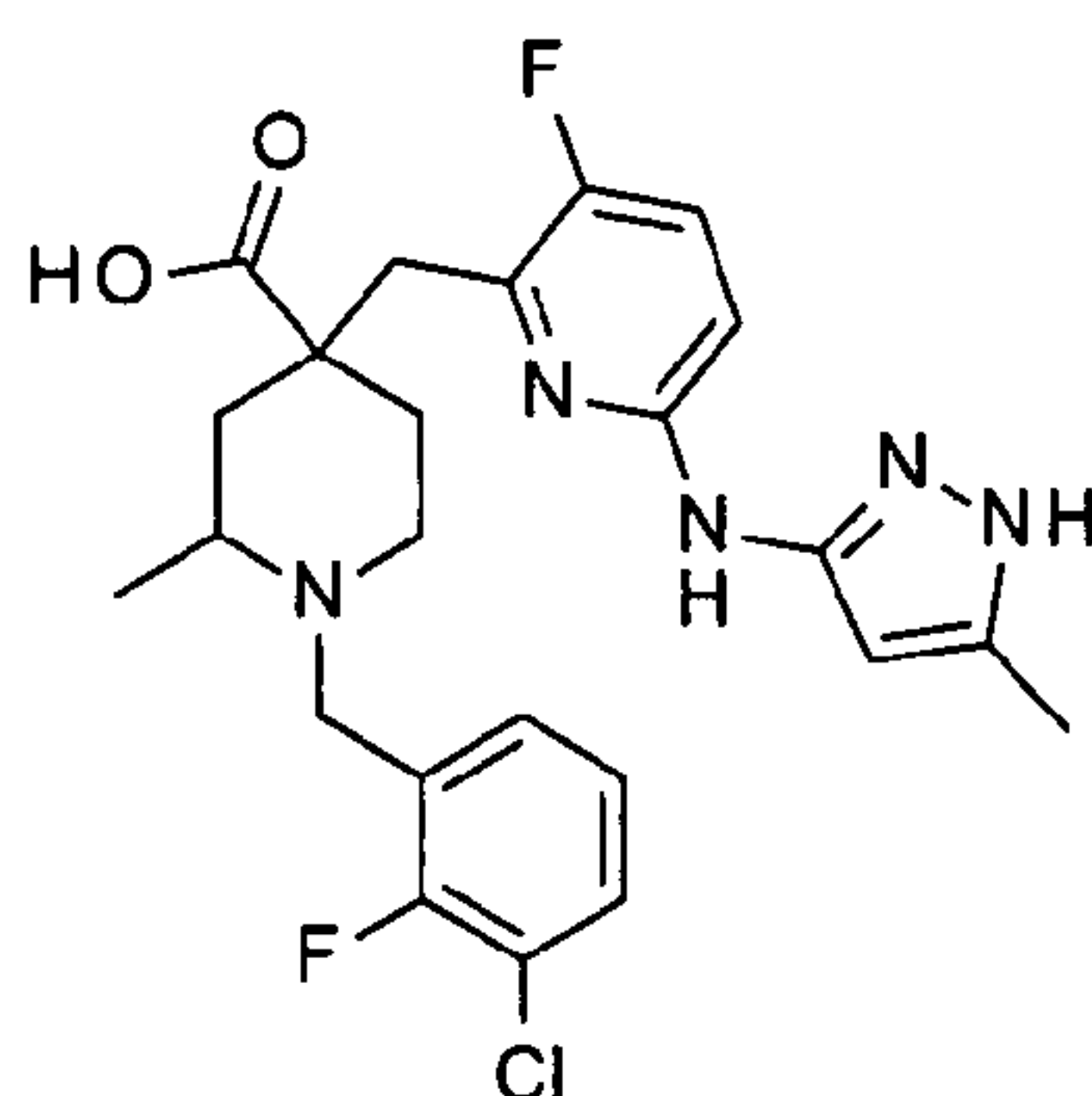
非整倍體或基因體不穩定性係癌症之最普遍特徵之一。更特定而言，極光B抑制誘導之核內染色體倍加及後續多倍性係基因體不穩定性之主要途徑之一。此外，DNA核內染色體倍加/多倍性表現型可保持多次細胞分裂而不會完全殺死癌症細胞。另一選擇為，極光A選擇性抑制導致許多癌症細胞中之有絲分裂停滯。有絲分裂停滯常進一步進展至癌症細胞凋亡或死亡，此對於癌症藥劑而言係相比於由極光B或極光A/B雙重抑制劑導致之DNA核內染色體倍加/多倍性更期望之屬性。另外，臨床開發中之某些極光B抑制劑及極光A/B雙重抑制劑已報導為在患者中呈現嗜中性球減少症及骨髓細胞毒性，而臨床開發中之某些相對選擇性極光A抑制劑不顯示該等病症。因此，期望選擇性抑制極光A並減少或避免極光B或極光A/B雙重抑制。由此，選擇性極光A抑制可用於癌症療法。

極光A抑制劑為業內所已知。WO 2008/026768、EP 2062887及WO2009/104802揭示某些具有極光A選擇性抑制作用之胺基吡啶化合

物。WO 2013/129443揭示某些具有極光A選擇性抑制活性之六氫吡啶化合物。

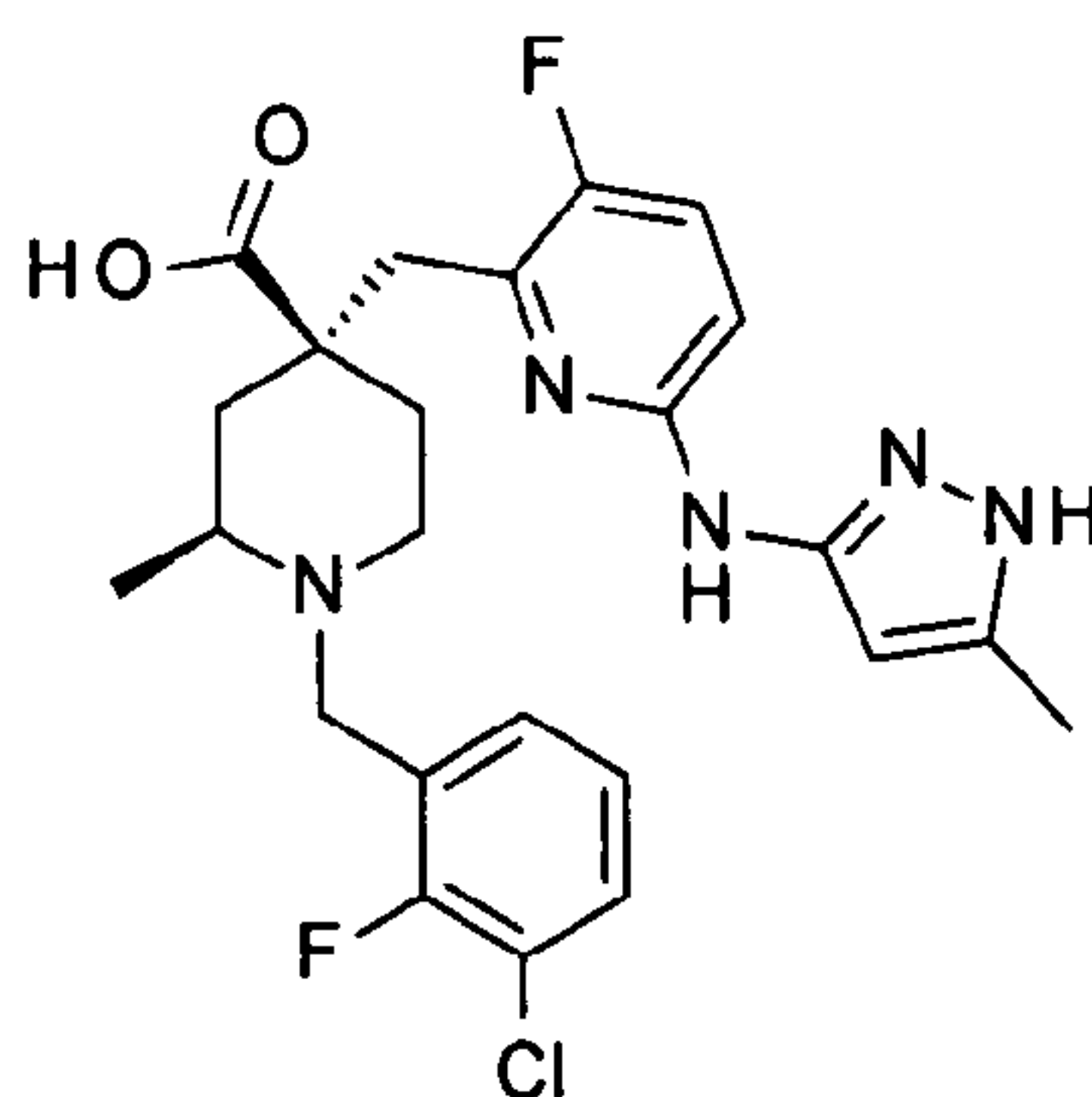
業內仍需要提供用於治療癌症之替代極光A抑制劑。同樣，業內仍需要提供減少或避免極光B或極光A/B雙重抑制之選擇性極光A抑制劑。因此，本發明提供可用於治療癌症之某些極光A抑制劑。另外，本發明提供某些可減少極光B或極光A/B雙重抑制之選擇性極光A抑制劑。

本發明提供為1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之化合物：



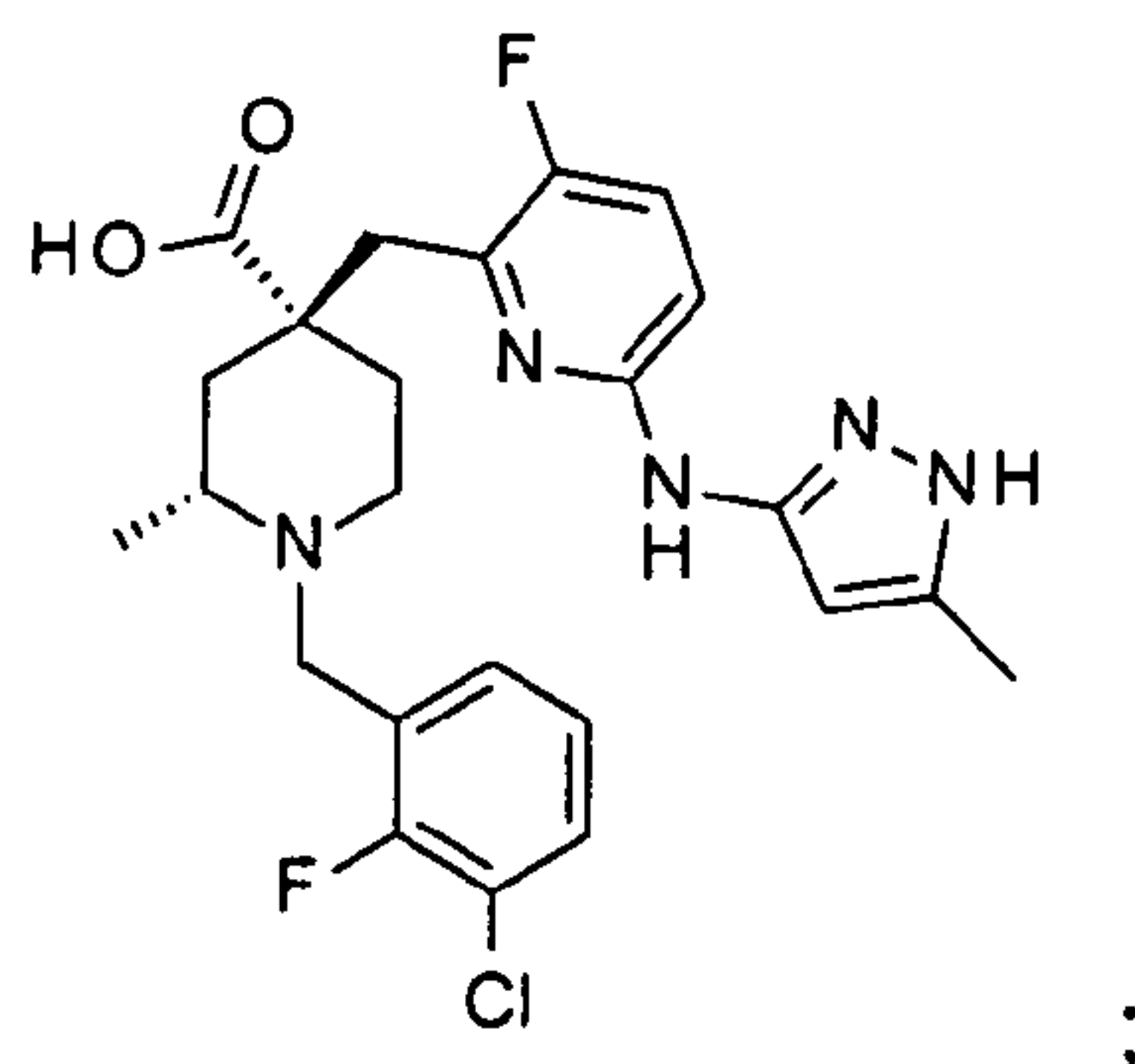
或其醫藥上可接受之鹽。

較佳地，本發明提供選自由以下組成之群之化合物：(2S,4S)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸



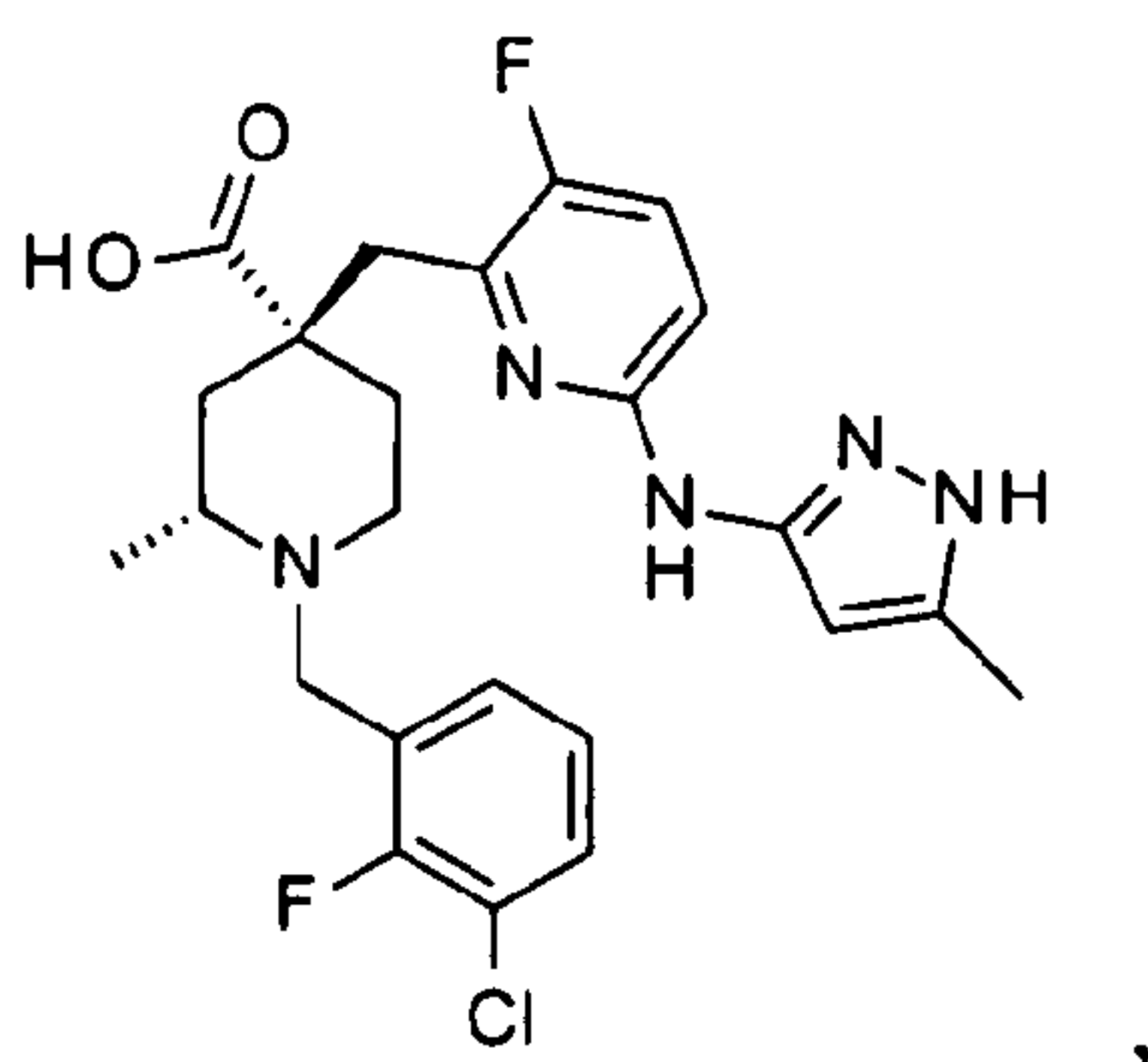
及

(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸：



或其醫藥上可接受之鹽。

更佳地，本發明提供為(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之化合物：



或其醫藥上可接受之鹽。

作為特定實施例，本發明提供為(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之化合物。

作為特定實施例，本發明亦提供為(2S,4S)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之化合物。

本發明提供包含(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽及醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑之醫藥組合物。本發明提供包含(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲

酸及醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑之醫藥組合物。

本發明提供用於治療癌症之方法，其包含向需要其之患者投與有效量之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽。本發明提供用於治療癌症之方法，其包含向需要其之患者投與有效量之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸。

本發明提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽，其用於療法。本發明提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療癌症。本發明提供用於治療癌症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽。

本發明亦提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸，其用於療法。本發明提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸，其用於治療癌症。本發明提供用於治療癌症之醫藥組合物，該醫藥組合物包含(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸。

本發明提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽之用途，其用於製造用以治療癌症之藥劑。本發明亦提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-

基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之用途，其用於製造用以治療癌症之藥劑。

本發明提供呈結晶形式之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之第三丁基胺鹽。本發明亦提供呈結晶形式之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之第三丁基胺鹽，其特徵在於X射線粉末繞射圖案具有在 17.0° 處出現之特徵峰(以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 表示)與選自由 11.5° 、 23.2° 及 15.0° 組成之群之峰中之一或多者之組合。

本發明提供呈結晶形式之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之鉍鹽。本發明亦提供呈結晶形式之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之鉍鹽，其特徵在於X射線粉末繞射圖案具有在 4.6° 處出現之特徵峰(以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 表示)與選自由 13.8° 、 17.2° 及 15.9° 組成之群之峰中之一或多者之組合。

此外，本發明提供本文所述方法及用途之較佳實施例，其中癌症選自由小細胞肺癌、結腸直腸癌、胃癌、前列腺癌、乳癌、三陰性乳癌、子宮頸癌、頭頸癌、食道癌、卵巢癌、非小細胞肺癌及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)組成之群。較佳癌症係小細胞肺癌、前列腺癌、三陰性乳癌、子宮頸癌及頭頸癌。

本發明亦提供(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸或其醫藥上可接受之鹽，其用於與一或多種化學治療劑組合同時、單獨或依序投與以治療癌症。

除非另有說明，否則如上文及在本發明說明通篇所用之以下術

語應理解為具有以下含義：

「醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑」係業內通常接受用於將生物活性劑遞送至哺乳動物(例如人類)之介質。

「醫藥上可接受之鹽 (Pharmaceutically acceptable salts 或 a pharmaceutically acceptable salt)」係指本發明化合物之相對無毒之無機及有機鹽。

「有效量」意指本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽或含有本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽之醫藥組合物將引發研究員、獸醫、醫學醫生或其他臨床醫生所尋求之組織、系統、動物、哺乳動物或人類之生物或醫學反應或對其之期望治療效應之量。

術語「治療(treatment、treat、treating)」及諸如此類意欲包括減緩或逆轉病症之進展。該等術語亦包括緩解、改善、減弱、消除或減少病症或病狀之一或多種症狀，即使該病症或病狀實際上並未消除且即使該病症或病狀之進展本身並未減緩或逆轉。

本發明化合物能夠與(例如)許多無機及有機酸及鹼反應以形成醫藥上可接受之鹽。該等醫藥上可接受之鹽及其常用製備方法為業內所熟知。例如，參見 P. Stahl 等人，HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002)；S.M. Berge 等人，「Pharmaceutical Salts,」 *Journal of Pharmaceutical Sciences*，第66卷，第1期，1977年1月。

本發明化合物較佳地使用醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑調配為醫藥組合物並藉由各種途徑投與。較佳地，該等組合物係用於經口投與。該等醫藥組合物及其製備方法為業內所熟知。例如，參見 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro 等人編輯，第21版，Mack Publishing公司，2005)。

本發明化合物之實際投與量將由內科醫師根據包括以下之相關情況來決定：欲治療之病狀、所選投與途徑、實際投與之本發明化合物、個別患者之年齡、體重及反應及患者症狀之嚴重程度。每日劑量通常在約1 mg至約1000 mg範圍內。在一些情形下，低於前述範圍下限之劑量值可綽綽有餘，而在其他情形下仍可採用較大劑量。劑量值可由熟習此項技術者決定。

本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽可藉由業內已知之各種程序以及下文製備及實例中所述之彼等來製備。每一所述途徑之具體合成步驟可以不同方式組合以製備本發明化合物或其醫藥上可接受之鹽。

試劑及起始材料通常可由熟習此項技術者容易地獲得。其他可藉由標準有機及雜環化學技術、熟習此項技術者已知之技術及於下文實例中所述包括任何新穎程序之程序來製得。以下製備及實例進一步闡釋本發明。除非說明相反之情形，否則本文所闡釋之化合物係使用 Accelrys Draw 4.1來命名及編號。

可由熟習此項技術者在化合物合成中之任一方便點處藉由諸如選擇性結晶技術或對掌性層析等方法來分離或拆分個別異構物、鏡像異構物或非鏡像異構物(例如，參見 Enantiomers, Racemates, and Resolutions (J. Jacques等人，John Wiley and Sons公司，1981))。

熟習此項技術者將瞭解本發明化合物含有至少一個對掌性中心。更特定而言，本發明化合物含有兩個對掌性中心。本發明涵蓋所有個別鏡像異構物或非鏡像異構物以及包括外消旋物之該等化合物之鏡像異構物與非鏡像異構物之混合物。較佳地，本發明化合物以單一鏡像異構物或非鏡像異構物形式存在。單一鏡像異構物或非鏡像異構物可以對掌性試劑開始或藉由立體選擇性或立體特異性合成技術來製備。另一選擇為，單一鏡像異構物或非鏡像異構物可藉由標準對掌性

層析或結晶技術自混合物分離。

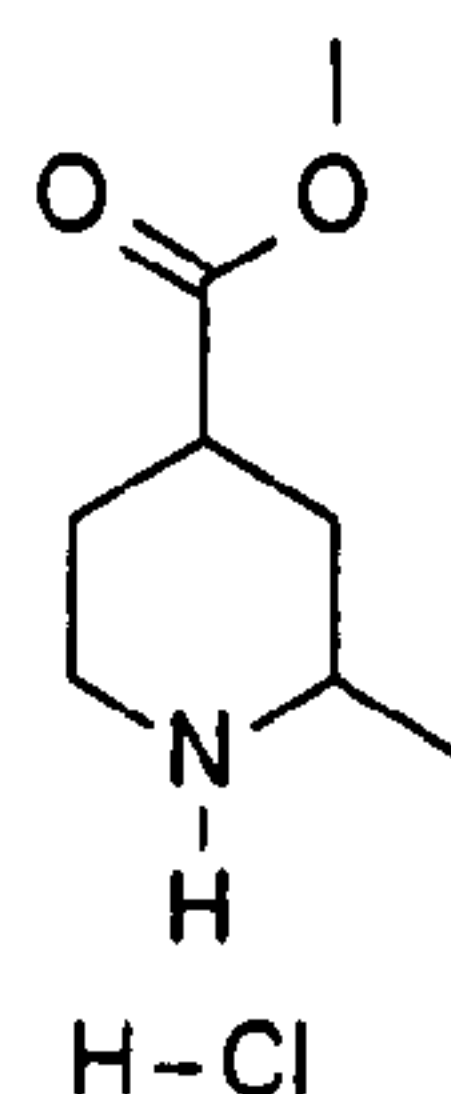
熟習此項技術者亦已知，具有吡唑基環之化合物可以互變異構物對形式存在，其中氫可在吡唑基環上之兩個氮間遷移。

本發明化合物可根據業內熟知且理解之合成方法製備。該等反應之步驟之適宜反應條件為業內所熟知且溶劑及輔助試劑之適當取代為熟習此項技術者所熟知。同樣，熟習此項技術者應瞭解，可根據需要或期望藉由各種熟知技術分離及/或純化合成中間物，且經常地，將可能經少許純化或未經純化即使用各種中間物直接用於後續合成步驟中。此外，熟習此項技術者應瞭解，在一些情況下，引入各部分之順序並不重要。產生本發明化合物所需步驟之特定順序取決於所合成之特定化合物、起始化合物及經取代部分之相對不穩定性，如為熟習此項技術之化學家所熟知。除非另有說明，否則所有取代者皆如先前所定義，且所有試劑為業內熟知並瞭解。

本文所用之以下術語具有所示含義：「ADP」係指腺苷5'-二磷酸；「ATP」係指腺苷5'-三磷酸；「BSA」係指牛血清白蛋白；「DNA」係指去氧核糖核酸；「DMSO」係指二甲亞砜；「DTT」係指二硫蘇糖醇；「EDTA」係指乙二胺四乙酸；「EGTA」係指乙二醇四乙酸；「FBS」係指胎牛血清；「IVTI」係指活體內標靶抑制；「HEPES」係指4-(2-羥乙基)六氫吡嗪-1-乙烷磺酸；「MEM」係指最小必須培養基；「MS」係指質譜法；「NMR」係指核磁共振；「PBS」係指磷酸鹽緩衝鹽水；「MSR」係指最小顯著比率；「PMSF」係指苯基甲基磺醯氟；「PNPP」係指磷酸4-硝基苯基酯二鈉鹽六水合物；「psi」係指磅/平方英吋；「SCLC」係指小細胞肺癌。「TAME」係指Na-4-甲磺醯基-L-精氨酸甲酯鹽酸鹽；「TED」係指臨限有效劑量；「TPCK」係指甲磺醯基苯丙氨酸基氯甲基酮。

製備 1

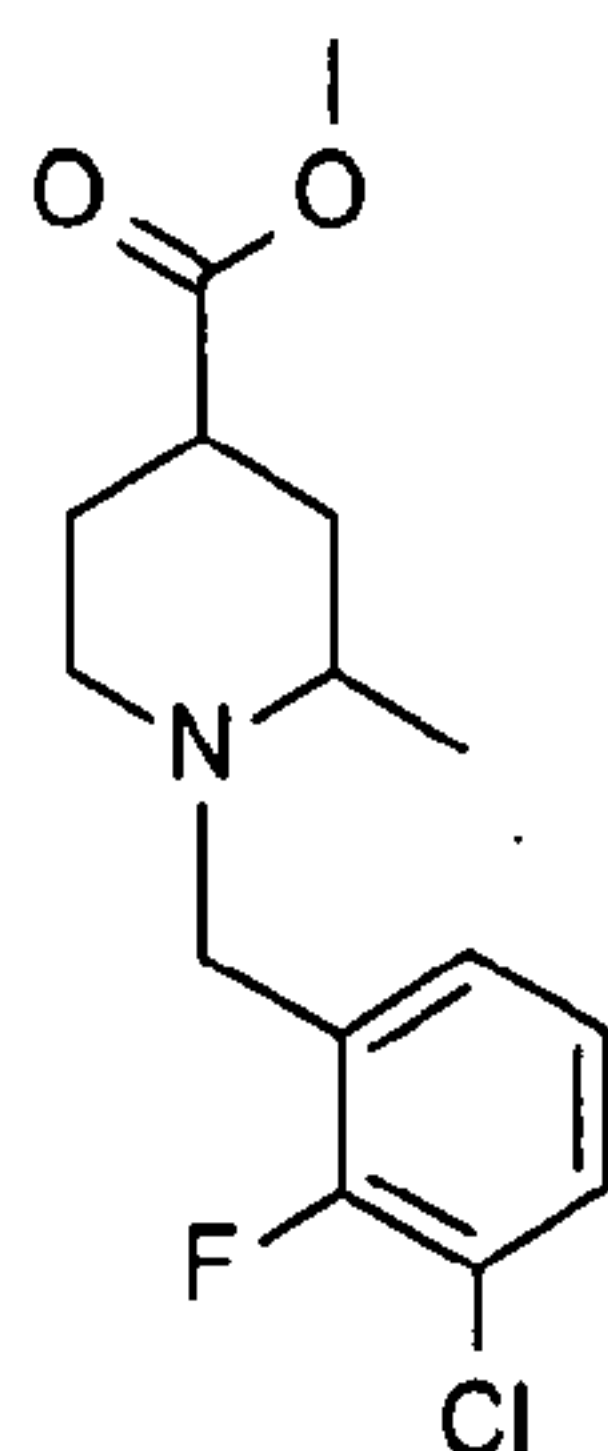
2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯鹽酸鹽



將PtO₂ (11.5 g)裝填至反應容器中。然後用N₂吹掃該容器並用乙酸(225 ml)潤濕。將2-氯-6-甲基-吡啶-4-甲酸甲酯(125 g)及乙酸(1000 ml)添加至漿液中。密封該反應容器，用N₂吹掃其，且然後用H₂吹掃其，並用H₂加壓。在60°C下在60 psi之氫下將該反應混合物加熱7小時。在相同規模及相同條件下運行兩個單獨反應。過濾每一反應之反應混合物並合併濾液。在真空下濃縮濾液，以提供含有一些乙酸之濃油狀物。將甲基第三丁醚(2 L)添加至該濃油狀物中並在室溫下攪拌。收集所得固體，用甲基第三丁醚(2×1000 mL)洗滌並在真空下在35°C下乾燥，以提供呈白色固體之標題化合物(400 g)。¹H NMR (CDCl₃) δ 1.55 (d, *J*=6.3 Hz, 3H)；1.85 (q, *J*=12.3 Hz, 1H)；2.23-1.98 (m, 3H)；2.59-2.46 (m, 1H)；2.85 (dt, *J*=13.0, 3.5 Hz, 1H)；3.20-3.06 (m, 1H)；3.53 (br d, *J*=12.6 Hz, 1H)；3.69 (s, 3H)；9.7 (br s, 1H)

製備 2

1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯

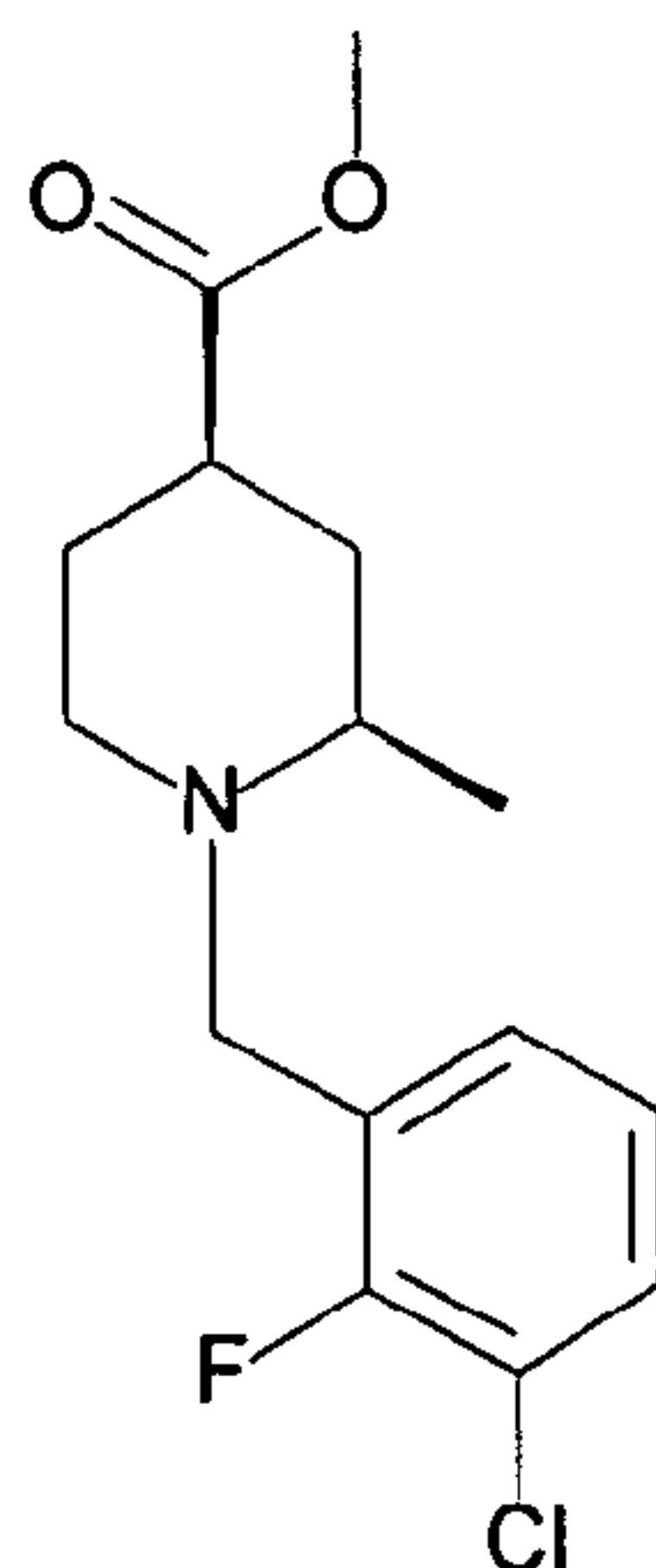


將2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯鹽酸鹽(205.4 g, 1.06 mol)、1-(溴

甲基)-3-氯-2-氟-苯(261 g, 1.17 mol)、乙腈(2050 mL)及碳酸鉀(293 g, 2.12 mol)添加至三頸圓底燒瓶(1 L)中。在回流下將該反應混合物攪拌18小時。然後停止加熱，過濾固體，且然後用乙腈(2×250 mL)沖洗固體。在真空下濃縮濾液，以得到綠色粗產物。溶解於甲基第三丁醚(2500 mL)中，添加CELITE®，攪拌，然後過濾。用水洗滌濾液。用1.25 N鹽酸水溶液(2000 mL)、然後用1 M鹽酸水溶液(1000 mL)萃取有機物。合併水性萃取物並用48%氫氧化鈉水溶液(250 g)鹼化至約12之pH。用甲基第三丁醚(3L)萃取。經硫酸鎂乾燥有機物，過濾並濃縮，以得到呈褐色油狀物之標題化合物(272.8 g)。MS (m/z): 300 (M+1)。

製備3

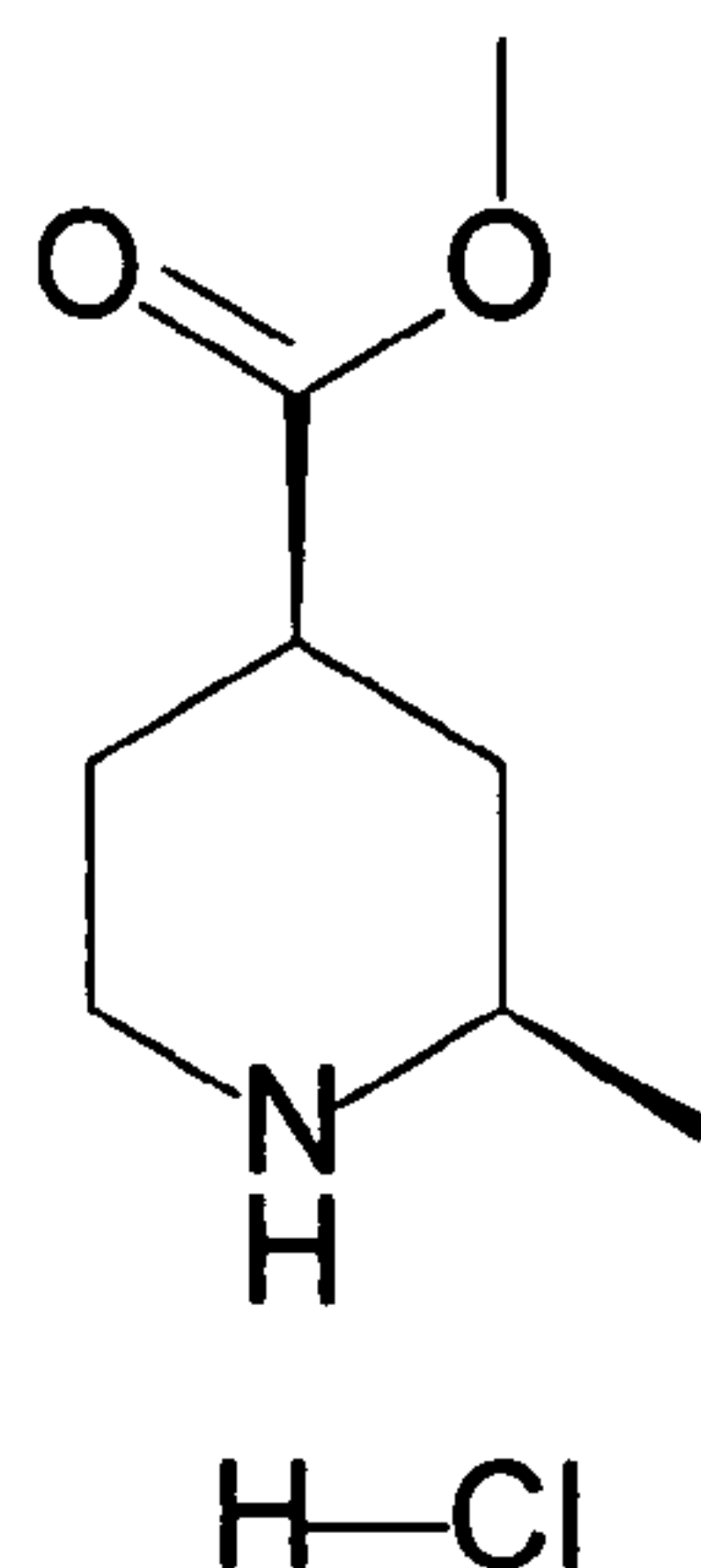
(2R, 4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯



使用超臨界流體對掌性層析分離1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯(272.8 g)之鏡像異構物。固定相：Chiralpak IC，流動相：3%異丙醇及0.2%二甲基乙胺。收集第一溶析之鏡像異構物($R_T = 1.73$ min)。收集為標題化合物之第二溶析之鏡像異構物(158 g, 49.7%產率； $R_T = 2.19$ min；MS (m/z): 300 (M+1))。分析條件：固定相：Chiralpak IC，流動相：5%異丙醇/ 0.2%異丙胺，流速3 mL/min，溫度：35°C。

製備4

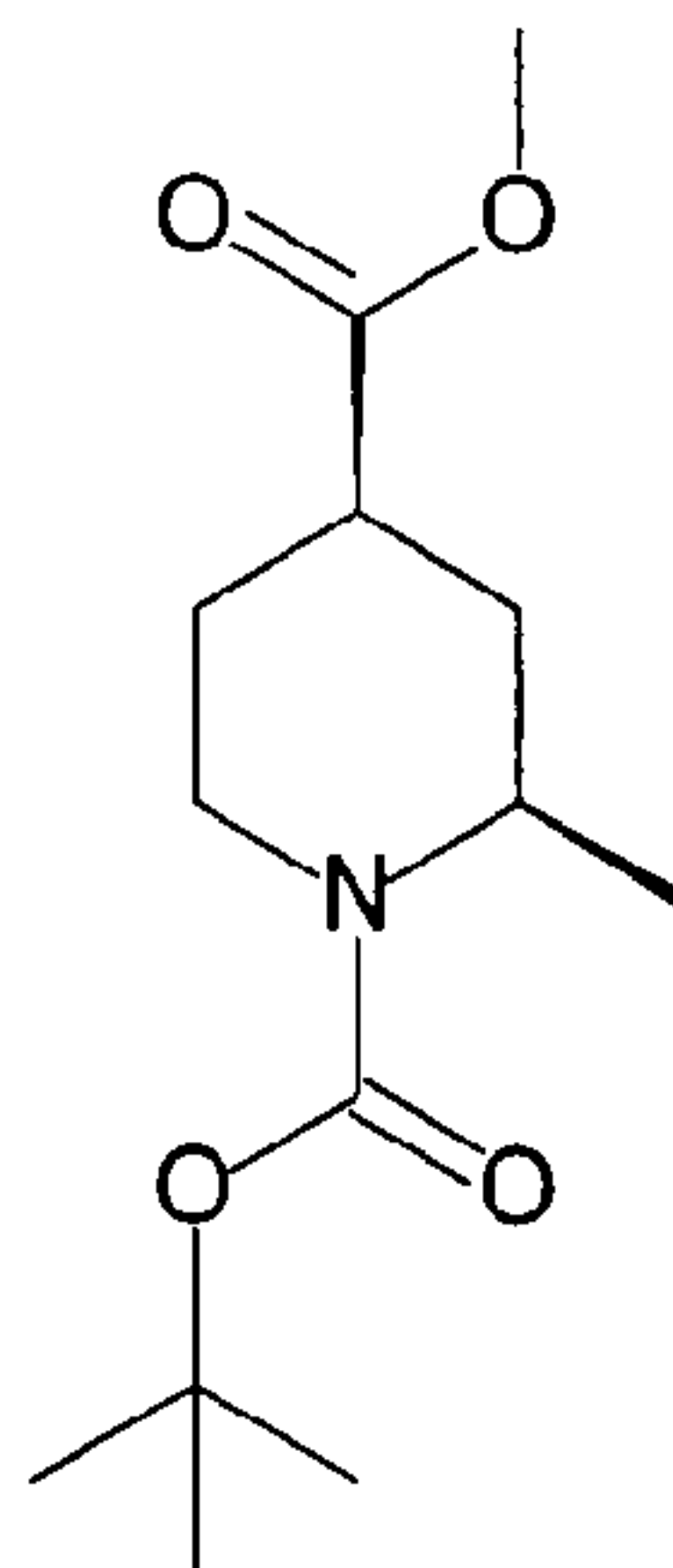
(2R,4R)-2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯鹽酸鹽



將(2R, 4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯(250g, 0.834 mol)、1,2-二氯乙烷(1200 ml)及氯甲酸1-氯乙酯(112 ml, 1.04 mol)添加至4000 ml三頸燒瓶中。在70℃下用機械攪拌器攪拌72小時。添加氯甲酸1-氯乙酯(30 ml, 0.227 mol)並在回流下攪拌6小時。使混合物冷卻至60℃並經30 min至45 min經由加料漏斗添加甲醇(250 ml)。在60℃至65℃下攪拌18小時。添加甲醇(400 ml)並在65℃至68℃下攪拌5小時。使混合物冷卻至室溫並攪拌過夜。在真空下濃縮至漿液。用乙酸乙酯(1500 ml)稀釋漿液並在0℃下攪拌30 min。收集固體並用乙酸乙酯(1000 ml)洗滌，以得到呈灰色固體之標題化合物(136.5 g, 84.5%產率)。¹H NMR (399.81 MHz, d₆-DMSO): δ 1.22 (d, J= 6.5 Hz, 3H), 1.53-1.43 (m, 1H), 1.73-1.62 (m, 1H), 1.99-1.91 (m, 2H), 2.71-2.63 (m, 1H), 2.89-2.83 (m, 1H), 3.15-3.12 (m, 1H), 3.23-3.20 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 9.03 (br, s, 1H), 9.44 (br, s, 1H)。

製備5

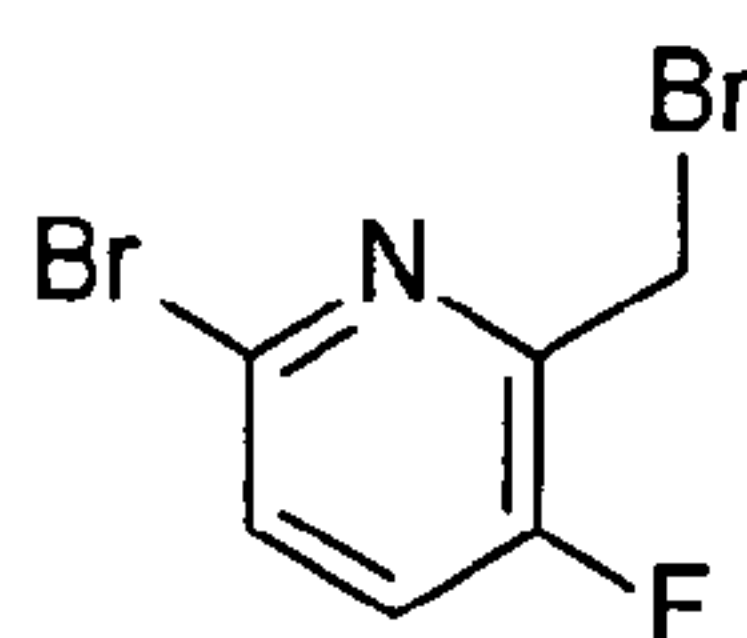
O4-甲基(2R,4R)-2-甲基六氫吡啶-1,4-二甲酸O1-第三丁酯



將(2R,4R)-2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯鹽酸鹽(136 g, 0.702 mol)及二氯甲烷(1500 ml)添加至配備有頂置式攪拌器之4 L三頸圓底燒瓶中。添加二異丙基乙胺(250 ml)並在室溫下攪拌幾分鐘。添加4-吡啶胺-N,N-二甲基(9.0 g, 0.74 mol)。在冰/水浴中冷卻。經約30分鐘緩慢添加二碳酸二-第三丁酯(192 g, 0.88 mol)存於二氯甲烷(300 ml)中之溶液，同時維持溫度介於5℃至10℃之間。使該混合物升溫至室溫並攪拌過夜。添加草酸溶液10% (2 L)並在室溫下攪拌45 min。分離各層。用5%草酸(1 L)洗滌有機物。用水、然後飽和NaCl洗滌有機物，經硫酸鈉乾燥，過濾並在真空下濃縮。溶解於二氯甲烷(250 ml)中。施加至經二氯甲烷潤濕之二氧化矽塞(250 g)。用二氯甲烷(3 L)溶析。在真空下濃縮濾液並在真空下保持幾個小時，以得到呈淺黃色油狀物之標題化合物(146 g, 80.8%產率)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (d, J= 6.8 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.99-1.94 (m, 3H), 2.55 (五重峰, J= 5.8 Hz, 1H), 3.10-3.02 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.85-3.78 (m, 1H), 4.18-4.10 (m, 1H)。

製備6

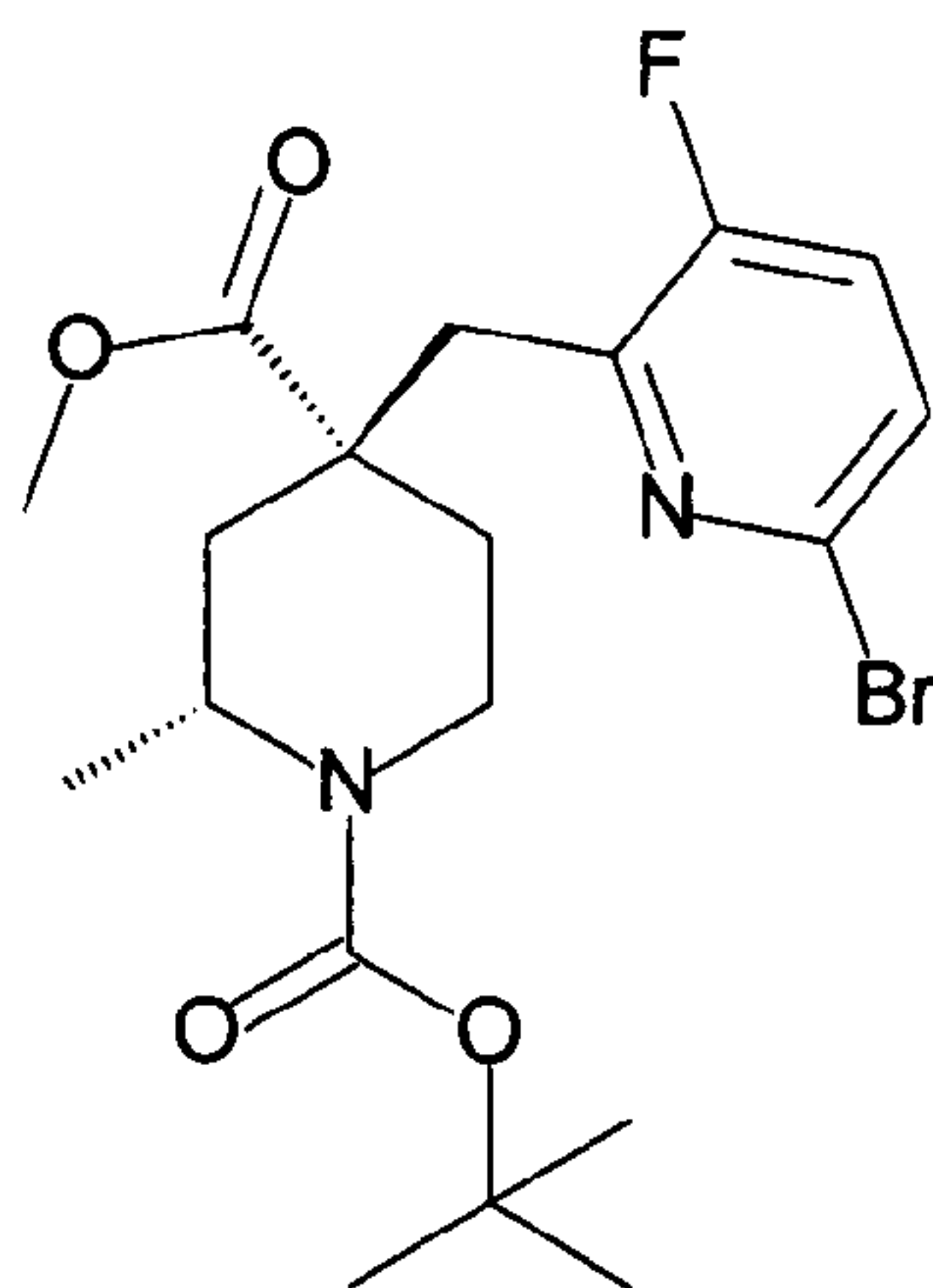
6-溴-2-(溴甲基)-3-氟-吡啶



將6-溴-3-氟-2-甲基-吡啶(50 g, 0.263 mol)、N-溴琥珀醯亞胺(100 g, 0.562 mol)及四氯化碳(500 ml)添加至配備有回流冷凝器及氮入口之1000 ml三頸圓底燒瓶中。在室溫下攪拌的同時，以份形式添加2,2'-偶氮雙(異丁腈)。在78°C下將反應攪拌72小時。使混合物冷卻至室溫並過濾掉固體。用甲苯(2×100 ml)洗滌固體。將濾液濃縮至約250 ml，用四氫呋喃(300 ml)稀釋並冷卻至0°C至5°C。在氮氛圍下，經30 min緩慢添加亞磷酸二乙酯(37 ml, 0.288 mol)及三乙胺(40 ml, 0.287 mol)存於四氫呋喃(100 ml)中之溶液。經1小時使該混合物緩慢升溫至室溫。在真空下濃縮。添加冰冷水並攪拌，直至混合物處在室溫下為止。收集固體並用水(2×200 ml)洗滌。在真空下乾燥固體。溶解於二氯甲烷(500 ml)中，並藉助二氧化矽塞過濾。用二氯甲烷(250 ml)沖洗塞。在真空下濃縮濾液，用己烷(500 ml)稀釋並在真空下濃縮至約100 ml。收集固體並用己烷(100 ml)洗滌，以獲得呈白色固體之標題化合物(48.0 g, 67.8%產率)。自母液收集固體並在真空下乾燥，以獲得呈白色固體之標題化合物(5.2 g, 7.35%產率)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): δ 4.51 (d, J= 2.1 Hz, 2H), 7.31-7.25 (m, 1H), 7.42 (dd, J= 3.5, 8.6 Hz, 1H)。

製備7

O1-第三丁基 O4-甲基(2R,4R)-4-[(6-溴-3-氟-2-吡啶基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-1,4-二甲酸酯

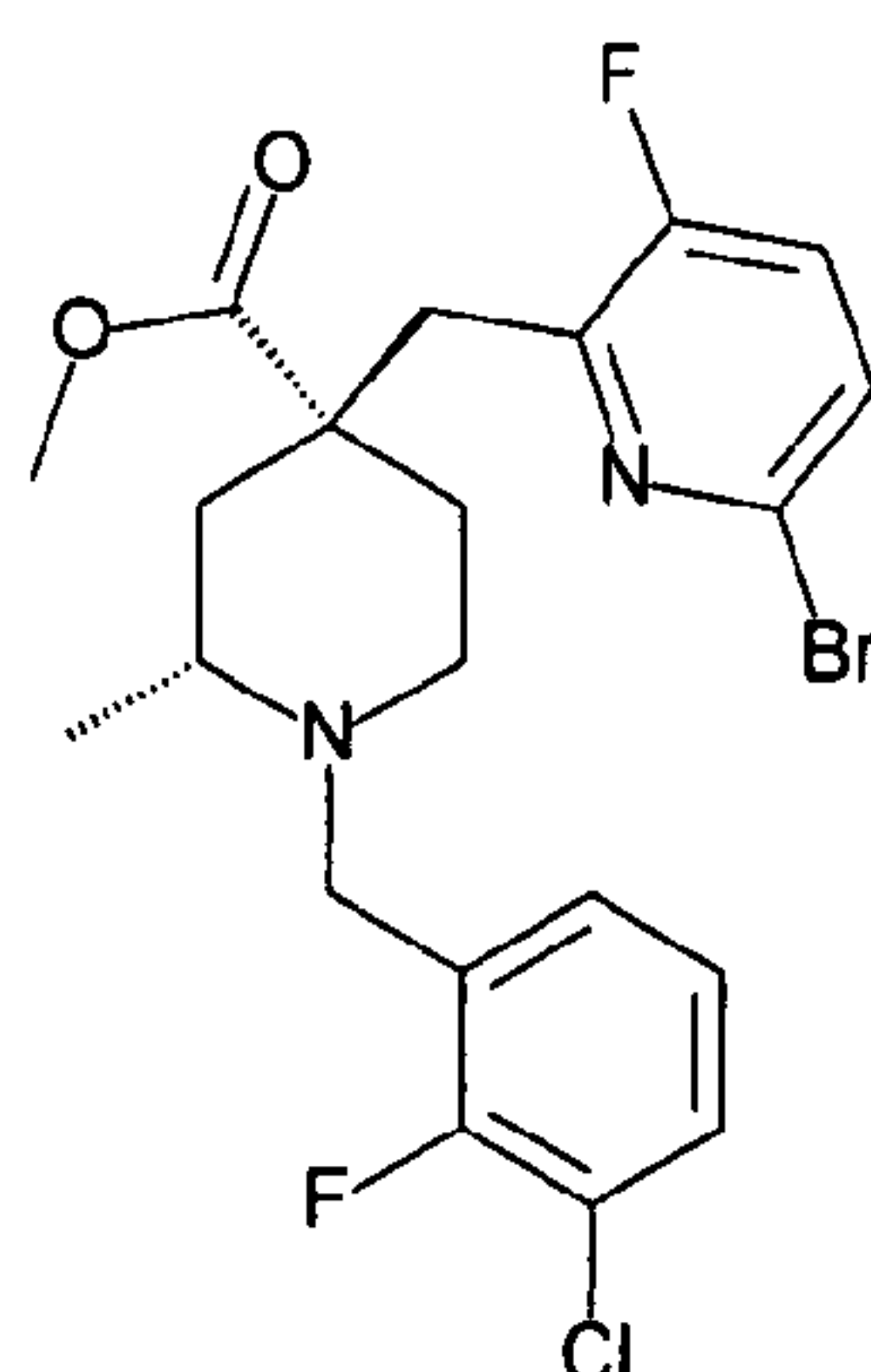


將存於四氫呋喃(470 ml)之O1-第三丁基-O4-甲基(2R, 4R)-2-甲基六氫吡啶-1,4-二甲酸酯(48.1 g, 0.187 mol)添加至3 L三頸圓底燒瓶中並將該混合物冷卻至-78℃。經30 min逐滴添加存於己烷(112.2 ml, 0.224 mol)中之二異丙基胺基鋰(10%質量)，同時維持內部溫度低於-71℃。在-78℃下攪拌1.5小時。逐滴添加6-溴-2-(溴甲基)-3-氟-吡啶(60.4 g, 0.225 mol)存於四氫呋喃(470 ml)中之溶液經1小時，同時維持內部溫度低於-71℃。在-78℃下攪拌1小時。藉由添加氯化銨飽和水溶液使該反應驟冷。收集所得固體，溶解於水(500 ml)中並用乙酸乙酯(1000 ml)萃取。合併萃取物，經硫酸鈉乾燥，過濾並在真空下濃縮。用57.22 g之O1-第三丁基-O4-甲基(2R, 4R)-2-甲基六氫吡啶-1,4-二甲酸酯在相同反應條件下重複此反應，並合併所獲得材料用於純化。藉由矽膠層析(5%至15%己烷/乙酸乙酯梯度)純化合併之材料，以獲得呈淺黃色油狀物之標題化合物(168.2 g)。¹H NMR (399.80 MHz, CDCl₃): δ 0.98 (d, J= 7.1 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.76 (dd, J= 6.0, 13.8 Hz, 1H), 2.02 (s, 2H), 2.23 (dt, J= 13.9, 2.1 Hz, 1H), 3.09-2.98 (m, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.90-3.87 (m, 1H), 4.40-4.37 (m, 1H), 7.19 (t, J= 8.5 Hz, 1H), 7.29 (dd, J= 3.4, 8.6 Hz, 1H)。

製備8

(2R,4R)-4-[(6-溴-3-氟-2-吡啶基)甲基]-1-[(3-氯-2-氟苯基)甲基]-2-甲基

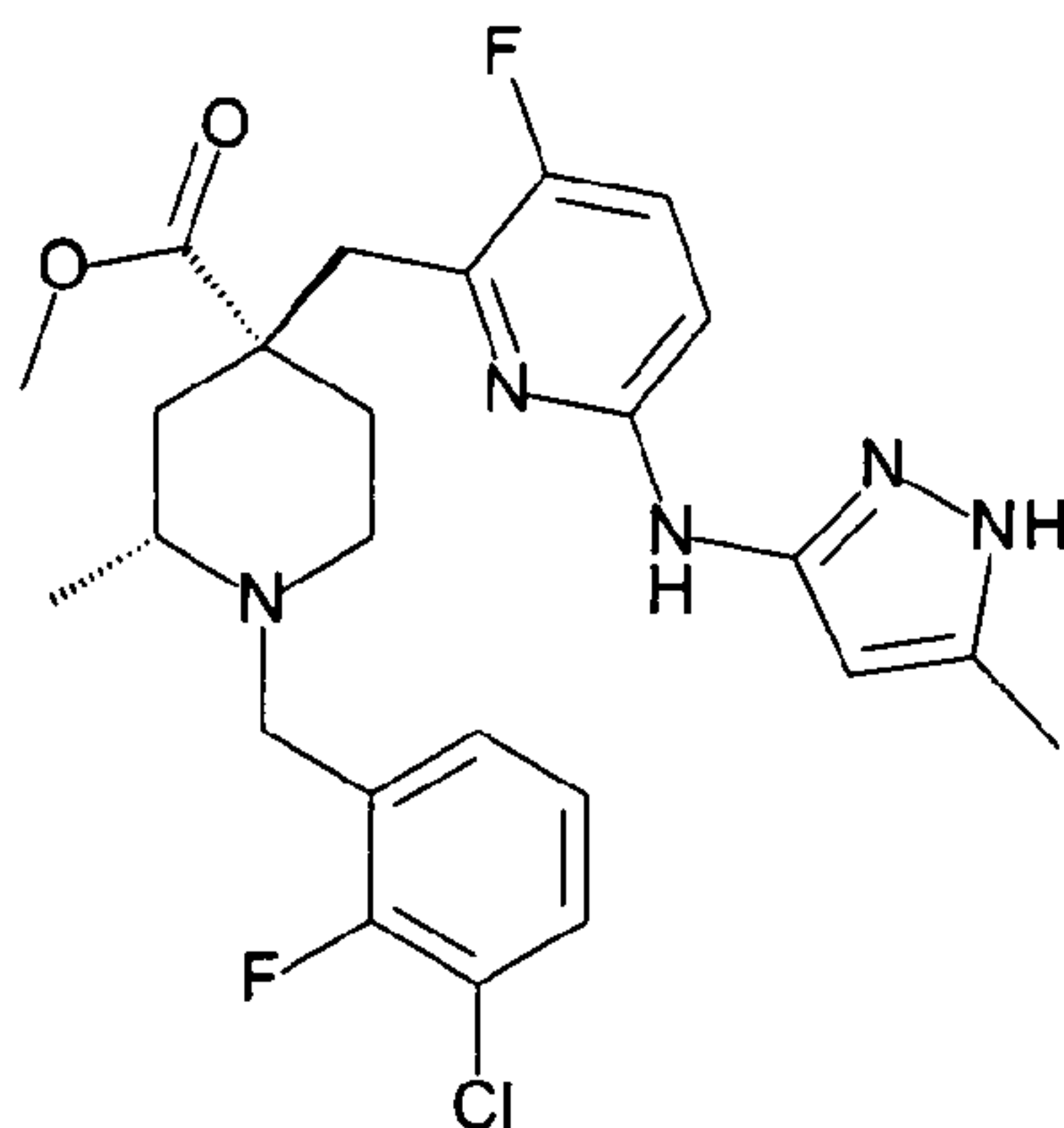
-六氫吡啶-4-甲酸甲酯



將存於1,4-二噁烷(945 ml)中之O1-第三丁基-O4-甲基(2R, 4R)-4-[(6-溴-3-氟-2-吡啶基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-1,4-二甲酸酯(168.2 g, 0.378 mol)添加至4 L三頸圓底燒瓶中。經20分鐘緩慢添加鹽酸(存於475 mL之1,4-二噁烷中之4 M, 1.9 mol)。在室溫下攪拌21小時，然後在50℃下攪拌4小時。收集固體並在真空下在45℃下乾燥1小時。將濾液濃縮至固體並完全乾燥。將合併之固體、碳酸鉀(105 g, 0.76 mol)及乙腈(1200 ml)添加至3 L三頸圓底燒瓶中。在室溫下攪拌20分鐘，然後添加3-氯-2-氟苄基溴(101.3 g, 0.453 mol)。在室溫下攪拌3天。藉助CELITE®過濾該混合物。將濾液濃縮至黃色油狀物。藉由矽膠層析(經70分鐘100%二氯甲烷至存於二氯甲烷中之7%甲基-第三丁基醚梯度)純化該油狀物，以得到呈黃色油狀物之標題化合物(153 g, 0.314 mol)。MS (m/z): 489 (M+1)。

製備9

(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[(3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基)甲基]-2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯



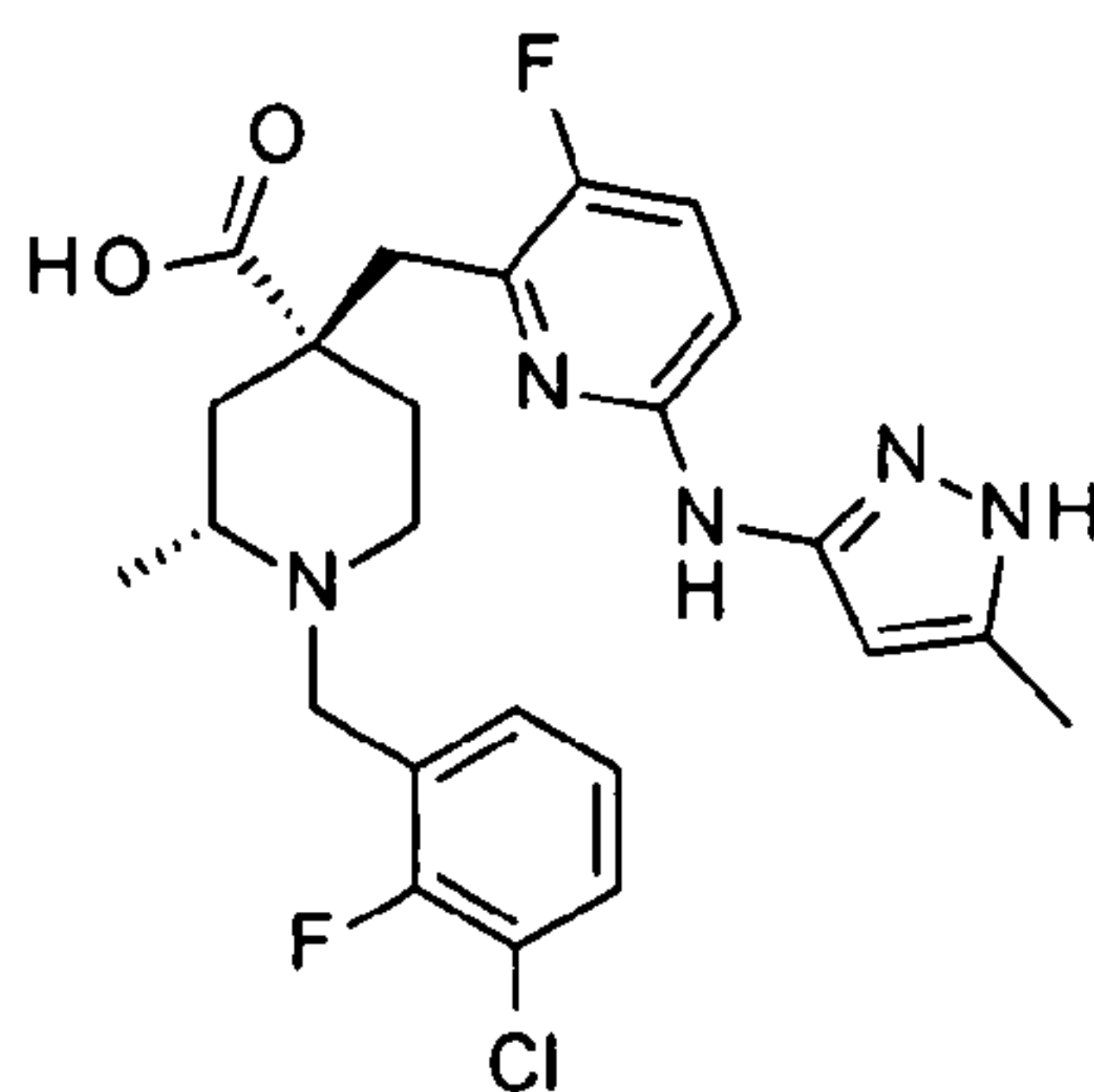
將第三丁醇(9.4 ml)添加至微波反應容器中並藉由氮鼓泡進行去氧並持續5分鐘。添加乙酸鈮(II) (0.044 g, 0.196 mmol)及2-二-第三丁基膦基-2',4',6'-三異丙基聯苯(0.251 g, 0.58 mol)。自該溶液表面下方添加水(0.014 ml)。使用Initiator微波爐將該混合物加熱至100℃並持續2分鐘。經由注射器將此觸媒溶液添加至以下混合物中。

將(2R,4R)-4-[(6-溴-3-氟-2-吡啶基)甲基]-1-[(3-氯-2-氟苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯(9.4 g, 0.019 mol)、5-甲基-1H-吡唑-3-胺(2.07 g, 0.021 mol)及第三丁醇(65 ml)添加至3 L三頸圓底燒瓶中。將該混合物加熱至40℃至45℃並用氮鼓泡10分鐘。將碳酸鉀(14.5 g, 0.045 mol)及上文所提供之觸媒溶液添加至該混合物中。在40℃至45℃下攪拌3.5小時。該反應不完全。製備乙酸鈮(II) (0.0088 g, 0.039 mmol)、2-二-第三丁基膦基-2',4',6'-三異丙基聯苯(0.050 g, 0.103 mmol)、水(2.8 µL)及第三丁醇(2 ml)之額外混合物。使用Initiator微波爐將此混合物加熱至100℃並持續2 min，且然後將其添加至以上不完全反應混合物中。在40℃至45℃下將該反應混合物攪拌2小時。用乙酸乙酯(100 mL)稀釋該混合物，藉助CELITE®塞過濾並用乙酸乙酯(100 mL)洗滌塞。在真空下濃縮。利用129.35 g之(2R,4R)-4-[(6-溴-3-氟-2-吡啶基)甲基]-1-[(3-氯-2-氟苯基)甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸甲酯在與上文所述相同之反應條件下重複該反應，並合併粗材料用於純化。

合併兩個粗反應產物。藉由矽膠層析存於1:1二氯甲烷/己烷中之30%乙酸乙酯至100% 乙酸乙酯純化材料，以獲得95 g之粉色固體。將固體添加至具有SILIAMETS® THIOL (120 g)及二氯甲烷(2 L)之4 L燒瓶中。在室溫下攪拌過夜。藉助CELITE®過濾該混合物。將濾液濃縮至乾燥，以得到呈白色泡狀物之標題化合物(93.3 g)。MS (m/z): 504 (M+1)。

實例1

(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸

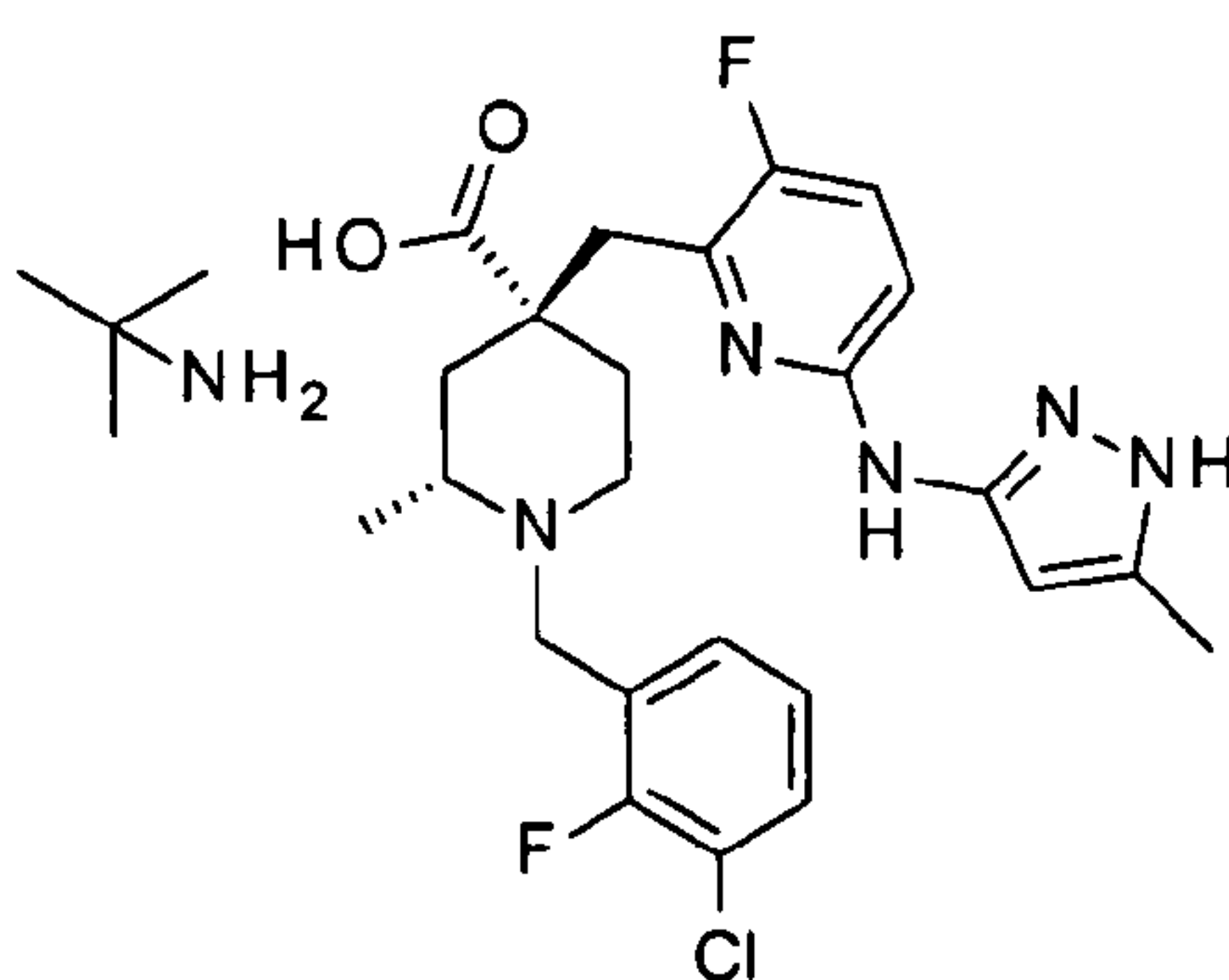


將(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[(3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯(19.95 g, 0.040 mol)、鹽酸(36.5%質量)及水(140 ml, 1.63 mol)添加至1 L三頸圓底燒瓶中。在93℃至96℃下攪拌17小時。冷卻至室溫，並在真空下濃縮。將殘餘物溶解於水(1000 ml)中並於冰浴中冷卻。用5 N氫氧化鈉將pH調整至6.5。收集所得固體並用水洗滌。用10%異丙醇/二氯甲烷(3×500 ml)萃取水濾液。乾燥並濃縮至固體。合併兩種固體並溶解於乙醇(200 ml)中。用乙酸乙酯(1500 ml)稀釋並在室溫下攪拌過夜。過濾並在真空下濃縮至固體。將固體溶解於5%甲醇/二氯甲烷中，用乙酸乙酯(500 ml)稀釋並濃縮至300 ml。過濾掉固體。利用61.9 g之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[(3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基六氫吡啶-4-甲酸甲酯在於上文所述相同

之反應條件重複該反應。合併來自兩個反應之濾液。將合併之濾液濃縮至約600 ml並用用己烷(600 ml)稀釋。收集固體並在真空下在50℃下乾燥過夜。在真空下將母液濃縮至乾燥並在真空下在50℃下將固體乾燥過夜。合併固體，以得到標題化合物(63.44 g)。MS (m/z): 490 (M+1)。[α]_D²⁰ + 17.3° (c 1.00, EtOH)。

實例 2

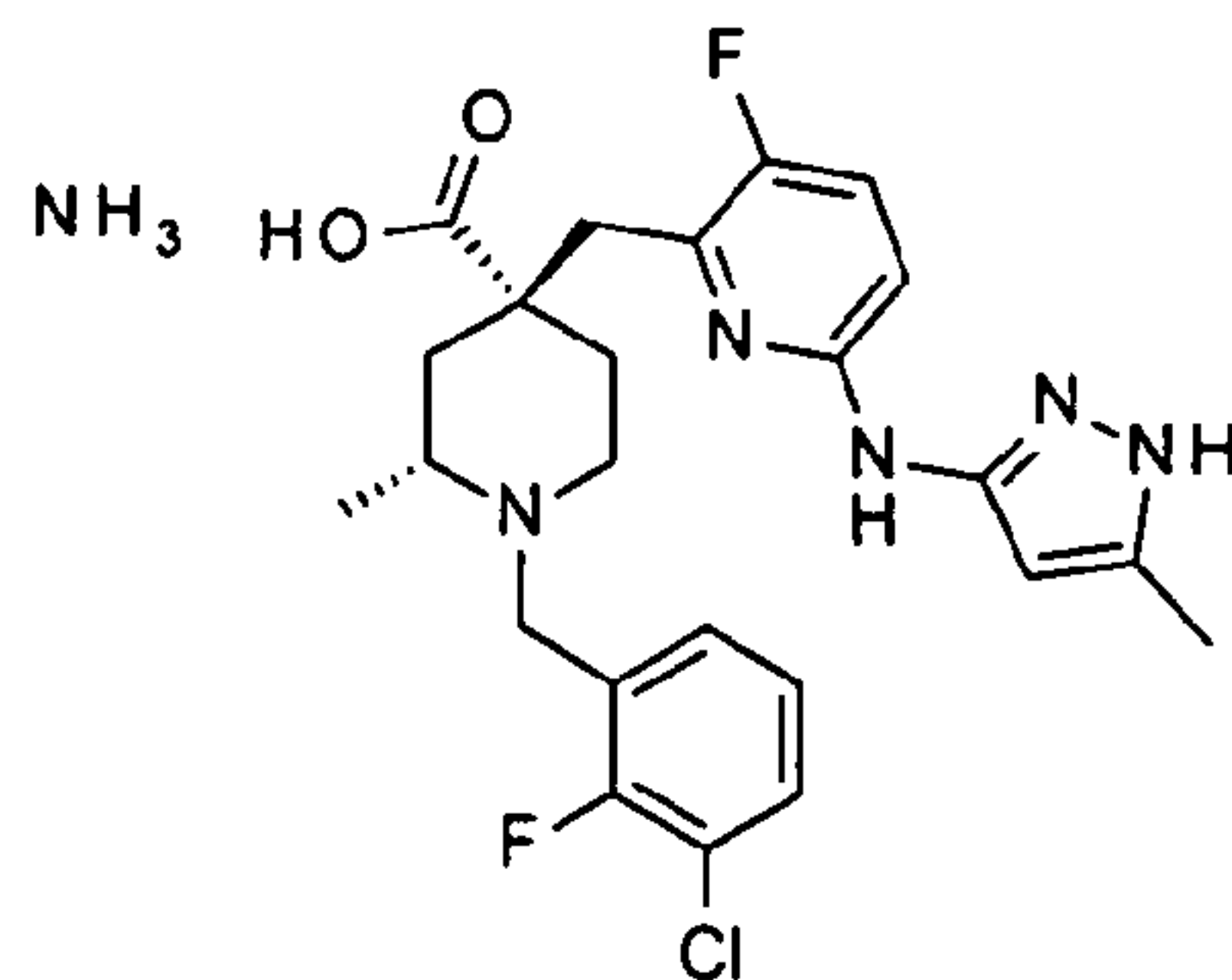
(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之第三丁胺鹽



添加存於 4 mL 之丙酮中之 (2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸 (580 mg)。固體溶解以形成澄清黃色溶液，同時以 60°C (板溫度)/1000 rpm 攪拌。將第三丁胺 (150 μ L, 1.20 當量, 99.5%) 添加至該溶液中並觀察到沈澱。在 60°C 下使該混合物再成漿 10 分鐘且然後使其冷卻至室溫。藉由真空過濾來過濾固體並在真空烘箱中在 60°C 下乾燥固體，以提供標題化合物 (635 mg, 95.26% 產率)。

實例3

(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)氨基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之銨鹽



添加存於2 mL之丙酮中之(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸(154 mg)。固體溶解至澄清黃色溶液，同時以60℃ (板溫度)/1000 rpm攪拌。將氫氧化銨(29.8%，50 μ L，1.22當量)添加至該溶液中並觀察到沈澱。在60℃下使該混合物再成漿兩個小時且然後使其冷卻至室溫。觀察到亮白色固體之濃漿液。藉由真空過濾來過濾固體並在真空烘箱中在60℃下乾燥固體，以提供標題化合物(145 mg，90.81%產率)。

實例2及3之X射線粉末繞射

在於35 kV及50 mA下操作之配備有CuK α 源(λ = 1.54060 Å)及Vantec檢測器之Bruker D4 Endeavor X射線粉末繞射計上獲得結晶固體之XRD圖案。在4°與40° 2 θ 之間掃描樣品，其中步長為0.009° 2 θ 且掃描速率為0.5秒/步，且使用0.6 mm發散狹縫、5.28固定防散射狹縫及9.5 mm檢測器狹縫。將乾粉末堆積於石英樣品固持器上並使用載玻片獲得光滑表面。在室溫及相對濕度下收集晶形繞射圖案。晶體學領域中已眾所周知，對於任一給定晶形而言，繞射峰之相對強度可由於由諸如晶體形態及習性等因素產生之較佳定向而變化。在存在較佳定向之影響之情形下，峰強度會改變，但多型之特徵峰位置不變。例如，參見The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18，第1843頁至第1844頁，1995。此外，晶體學領域中亦已眾所周知，對於任一給定晶形，角峰位置可略微變化。舉例而言，峰位置可

由於分析樣品時之溫度或濕度之變化、樣品位移或存在或不存在內標準而發生移位。在此情形下， $\pm 0.2^\circ 2\theta$ 之峰位置變化性將考慮到該等潛在變化，此並不妨礙所指示晶形之明確鑑別。晶形之證實可基於有區別之峰(通常為更突出之峰，以 $^\circ 2\theta$ 為單位)之任一獨特組合來實施。在 8.853° 及 $26.774^\circ 2\theta$ 下基於NIST 675標準峰調節於室溫及相對濕度下收集之晶形繞射圖案。

實例2之所製備樣品之特徵在於XRD圖案(使用CuK α 放射)具有如下表1中所述之繞射峰(2θ 值)，且特定而言具有 17.0° 處之峰與一或多個選自由 11.5° 、 23.2° 及 15.0° 組成之群之峰之組合；其中繞射角公差為 0.2° 。

表1：實例2之X射線粉末繞射峰

峰	角($^\circ 2\theta$) $\pm 0.2^\circ$	相對強度(最強峰之%)
1	8.0	24.6
2	11.5	57.1
3	14.0	26.4
4	15.0	42.3
5	17.0	100.0
6	19.3	24.9
7	21.0	37.1
8	23.2	45.1
9	24.0	30.9
10	26.1	23.7

實例3之所製備樣品之特徵在於XRD圖案(使用CuK α 放射)具有如下表2中所述之繞射峰(2θ 值)，且特定而言具有 4.6° 處之峰與一或多個選自由 13.8° 、 17.2° 及 15.9° 組成之群之峰之組合；其中繞射角公差為 0.2° 。

表2：實例3之X射線粉末繞射峰

峰	角(°2-θ) +/- 0.2°	相對強度(最強峰之%)
1	4.6	100.0
2	9.3	38.1
3	9.9	26.1
4	10.5	39.4
5	13.8	72.2
6	15.9	62.7
7	17.2	66.6
8	18.5	40.3
9	21.3	52.3
10	28.1	49.8

極光A激酶使用實例3之X射線晶體結構

在*Sf9*昆蟲細胞中表現具有TEV蛋白酶可裂解之N末端多組胺酸標籤之極光A激酶之催化結構域(序列NP_003591之殘基125至391)。藉由結合至鎳螯合管柱來分離所表現之蛋白質。在裂解組胺酸標籤後，藉由穿過於含有50 mM磷酸鈉pH 7.0、250 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM DTT及0.1 mM之緩衝液中平衡之粒徑排阻層析管柱(16/600 S200；GE Lifesciences)利用β,γ-醯亞胺腺苷5'-三磷酸(AMP-PNP)來進一步純化該蛋白質。向濃度為8.3 mg/ml之經純化極光A激酶蛋白補充額外AMP-PNP達2 mM之最終濃度，並在21℃下藉由蒸氣擴散來進行結晶。藉由混合0.8 μL蛋白質與0.8 μL含有100 mM MES pH 4.6、23% PEG 3350及150 mM硫酸銨之儲積溶液並在坐滴托盤中針對相同儲積溶液進行平衡來實施結晶。將極光A激酶與AMP-PNP複合之單晶體浸泡在含有2 mM之實例3之溶液中過夜，並轉移至含有20%聚乙二醇400之溶液中，並於液氮中急驟冷凍。在Advanced Photon Source, Argonne, IL之Lilly Research Laboratories Collaborative Access Team Beam-Line (LRL-CAT APS 31ID)自經冷凍晶體收集1.96 Å之X射線繞

射數據。使用波長0.9793 Å之X射線以1°振盪收集180幀，且檢測器距離為185 mm。藉由分子置換測定使用實例3之極光A激酶之結構，並細化為20.6%之R因子(R-factor)及25.6%之自由R因子(R-free)。結果係利用實例3的並提供立體化學。其亦提供實例1及2之立體化學，此乃因使用實例1作為用於製備實例2及3之起始材料。

表3：自利用實例3處理極光A晶體導致之配體複合物之原子座標

ATOM	X	Y	Z	B因子
C1	112.063	-22.352	4.479	42.62
C2	112.093	-21.548	5.620	40.92
C3	106.478	-13.876	6.709	30.97
C4	112.494	-21.851	3.250	39.63
C5	106.509	-14.173	5.352	32.26
C6	109.743	-16.303	3.016	23.86
C7	112.557	-20.234	5.530	49.20
C8	107.454	-14.403	7.543	30.71
C9	112.992	-19.735	4.307	46.02
C10	112.961	-20.539	3.170	49.13
C11	108.433	-15.216	6.985	29.52
C12	110.350	-16.658	1.793	21.45
C13	107.527	-15.000	4.893	27.64
C14	108.526	-15.780	2.647	22.41
C15	107.800	-17.220	8.960	40.44
C16	109.027	-18.128	6.966	34.87
C17	110.137	-17.883	9.201	32.43
C18	110.391	-18.481	6.358	28.24
C19	111.482	-18.224	8.537	32.71
C20	109.128	-17.256	8.229	32.98
C21	111.684	-17.267	1.564	24.45
C22	112.398	-18.885	9.578	37.45

C23	112.608	-19.345	6.737	32.82
C24	109.500	-15.812	7.858	33.06
N25	108.492	-15.529	5.670	28.42
N26	108.483	-15.845	1.290	23.85
N27	109.585	-16.379	0.739	22.58
N28	111.302	-19.083	7.346	32.56
N29	107.540	-15.286	3.509	30.18
O30	106.690	-17.266	8.449	39.38
O31	108.001	-17.113	10.295	42.47
F32	107.438	-14.126	8.849	36.03
F33	113.435	-18.468	4.239	56.09
CL34	113.500	-19.908	1.663	70.06

以下分析之結果證明本發明之實例1化合物係極光A抑制劑。另外，以下分析之結果證明實例1之化合物係可減少極光B或極光A/B雙重抑制之選擇性極光A抑制劑。而且，以下分析之結果證明實例1之化合物藉由抑制極光A激酶活性來誘導細胞週期有絲分裂停滯。另外，實例1之化合物利用異種移植物腫瘤樣品展示極光A（而非極光B）激酶標靶活體內抑制以及在小細胞肺癌NCI-H446裸小鼠模型中展示顯著抗腫瘤生長效力。

極光A激酶分析

此分析藉由TRANSCREENER®ADP-螢光極化量測在96孔黑板格式(CORNING® COSTAR® 3694)中量測測試化合物活體內抑制極光A激酶活性之能力。製備具有腺苷三磷酸(ATP)及極光A激酶活化環(ENOGEN®, #326861)之存於激酶緩衝液[50 mM 4-(2-羥乙基)-1-六氫吡嗪乙烷磺酸(HEPES) pH 7.4、4 mM MgCl₂、0.01% TRITON™ X-100及2 mM二硫蘇糖醇(DTT)]中之溶液，且最終濃度分別為20 μM ATP及150 μM極光A激酶活化環。將極光A酶添加至該溶液中且最終

濃度為 0.096 ng/ μ L。將測試化合物連續稀釋 1:3 於 20% 二甲亞砜 (DMSO) 中，以在 20 μ M 起始之最終濃度下建立 10 點劑量反應曲線。使用不含測試化合物之單獨 DMSO 緩衝液作為陽性對照(在不存在抑制劑之存在下完全為極光 A 活性)。陰性對照為完全反應混合物加上 100 nM 之乙二胺四乙酸 (EDTA)，以測定腺苷 5'-二磷酸 (ADP) 背景值。將所製備之極光 A 酶溶液添加至含有測試化合物及陽性及陰性對照之板中，並在 22°C 下將該混合物預培育 30 分鐘。藉由添加 ATP 及極光 A 激酶活化環溶液開始該反應並在 22°C 下持續 30 分鐘。然後藉由添加 25 μ L (1:1 v:v) 含有 ADP 遠紅外示蹤劑、ADP 抗體及停止及檢測緩衝液 (Bellbrook Labs 目錄編號 3003-10K) 之 ADP 檢測混合物來終止該反應。將該等板保持在黑暗中至少 2 小時以使得 ADP Alexa633 示蹤劑 (結合至 ADP2 抗體) 經激酶反應中產生之 ADP 置換，並測定螢光極化之降低 (Ultra384, Tecan)。使用 ADP/ATP 存於以上激酶緩衝液中之標準曲線測定測試化合物之 ADP 轉化。

將陽性及陰性對照之中位數值之間之差異視為 100% 活性。使用四參數邏輯曲線擬合並使用 ActivityBase™ 軟體 (IDBS, Alameda CA) 生成 IC₅₀ 值。該分析展示 ≤ 3 之最小顯著比率 (MSR)。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍之化合物。實例 1 之化合物經測定具有 1.12 ± 0.15 nM 之 IC₅₀ (n=4)。極光 A 生物化學分析達到分析檢測下限，從而使得所報告之 IC₅₀ 可能無法反映活體外絕對化合物抑制效能；然而，在統計上驗證該分析本身，從而使得該數據提供在此分析中該化合物所證明之 IC₅₀ 結果。因此，結果顯示實例 1 活體外抑制極光 A 激酶活性。

極光 B 激酶分析

此分析藉由 TRANSCREENER ADP-螢光極化量測在 96 孔黑板格式 (CORNING COSTAR 3694) 中量測測試化合物活體外抑制極光 B 激

酶活性之能力。製備具有極光B酶(0.39 ng/ μ L之最終濃度)、0.1 μ M INCEP肽(GenScript, #92480_1, 最終濃度0.1 μ M)、ATP (最終濃度10 μ M)及組蛋白H3 (Anaspec, #KLH08-4, 最終濃度5 μ M)之存於激酶緩衝液(37.5 mM HEPES pH 7.4、6.25 mM $MgCl_2$ 、0.0075% TRITON™ X-100及2.5 mM DTT)中之極光B酶溶液。將測試化合物連續稀釋1:3於20% DMSO中, 以在20 μ M起始之最終濃度下建立10點劑量反應曲線。使用不含化合物之單獨DMSO緩衝液作為陽性對照(在不存在抑制劑之情況下完全為極光B活性)。陰性對照為完全反應混合物加上100 nM EDTA, 以測定ADP背景值。將所製備之極光B酶溶液添加至含有測試化合物及陽性及陰性對照之板中。在22°C下將該混合物預培育30分鐘。添加以上ATP及組蛋白H3溶液以開始該反應, 並在22°C下將該板培育45分鐘。藉由添加25 μ L (1:1 v:v)含有ADP遠紅外示蹤劑、ADP抗體及停止及檢測緩衝液(Bellbrook Labs目錄編號3003-10K)之ADP檢測混合物來終止該反應。將該等板保持於黑暗中至少2小時以使得ADP Alexa633示蹤劑(結合至ADP2抗體)經激酶反應中所產生之ADP置換, 然後測定螢光極化(Ultra384, Tecan)。建立ADP/ATP存於上述激酶緩衝液中之標準曲線以測定測試化合物之ADP轉化。

將陽性及陰性對照之中位數值之間之差異視為100%活性。使用四參數邏輯曲線並使用ActivityBase™軟體(IDBS, Alameda CA)生成IC₅₀值。該分析展示 ≤ 3 之最小顯著比率(MSR)。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。實例1之化合物經測定以具有 1510 ± 668 nM之IC₅₀ (n=5)。該等結果顯示實例1活體外抑制極光B激酶活性之程度不如其活體外抑制極光A激酶活性之程度。

基於之組蛋白H3磷酸化Ser10及DNA含量細胞表現型多工分析

該分析量測極光A抑制誘導之有絲分裂停滯。利用24小時化合物

處理使用Acumen Explorer™ (雷射-掃描螢光微板細胞儀(TTP LabTech LTD, UK))並利用有絲分裂標記物組蛋白H3磷酸化Ser10增加、4N (G2/M) DNA含量增加及細胞增殖抑制表現型量測極光A抑制誘導之有絲分裂停滯。胞以5000個細胞/孔將來自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)之Hela細胞鋪於96孔BD BIOCOAT™ 聚-D-離胺酸板(Becton Dickinson, 目錄編號356640)中, 並在37°C下在5% CO₂下與具有10%胎牛血清(FBS) (例如Gibco, 目錄編號16000)、1%非必需胺基酸(例如Gibco, 目錄編號11140)、1%丙酮酸鈉(例如Gibco, 目錄編號11360)及1%青黴素-鏈黴素(例如Gibco, 目錄編號15140)一起於最小必須培養基(MEM) (例如Gibco, 目錄編號31095)中培育24小時。藉由將測試化合物添加至該培養基中來處理細胞, 在10個跨越20 μM至0.001 μM之範圍之1:3連續稀釋點處投予, 且最終DMSO濃度為0.25%。在暴露至化合物中24小時後, 在室溫下用PREFER™ (Anatech LTD., 目錄編號414)將細胞固定30分鐘, 用磷酸鹽在室溫下緩衝鹽水(PBS)洗滌一次並用存於PBS溶液中之0.1% TRITON® X100透化15分鐘。將細胞用PBS洗滌兩次並在室溫下用存於PBS中之1%牛血清白蛋白(BSA) (例如Sigma, 目錄編號A7030)阻斷30分鐘。將一級抗組蛋白H3磷酸化Ser10兔多株抗體(Millipore, 目錄編號06-570)以1:1000於具有1% BSA之PBS中添加至細胞中並在4°C下培育過夜。用PBS洗滌兩次後, 在室溫下將細胞與山羊抗兔IgG Alexa 488標記之二級抗體一起1:1000於PBS (Invitrogen目錄編號A11008)中培育1小時。用PBS再洗滌兩次後, 添加含有10 μg/mL碘化丙啶(Invitrogen目錄編號P3566)及50 μg/mL核糖核酸酶A (Sigma, 目錄編號R-6513)存於PBS中之溶液以對細胞核染色。用ACUMEN EXPLORER™ [雷射掃描螢光微板細胞儀(包含488 nm氬離子雷射激發及多重光電倍增管檢測, 由TTP LabTech有限公司製造)]掃描螢光板

以量測組蛋白H3磷酸化Ser10及DNA含量。影像分析係基於細胞螢光信號來鑑別不同亞族群中之細胞。分析輸出係細胞增殖抑制百分比、組蛋白H3磷酸化Ser10陽性細胞百分比、2N (G1細胞週期或二倍體DNA含量，其中N係指染色體之單一補體；單倍體DNA含量)百分比及DNA直方圖剖面之4N加上>4N (G2/M細胞週期及以後)之百分比。藉由使用ACTIVITY BASE™針對每一輸出曲線擬合至四參數邏輯來測定IC₅₀及EC₅₀值。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。實例1之化合物顯示，有絲分裂停滯分別地對於組蛋白H3 P-Ser10增加而言具有108±15 nM之EC₅₀ (n=4)，對於4N-DNA含量增加而言具有108±27 nM之EC₅₀ (n=4)，且對於細胞增殖抑制而言具有52.9±27 nM之IC₅₀ (n=4)。

基於極光B組蛋白H3磷酸化Ser10抑制細胞之分析

該分析利用一小時測試化合物處理量測極光B抑制誘導之組蛋白H3磷酸化Ser10降低。將來自美國菌種保存中心(ATCC)之NCI-H446細胞以12000個細胞/孔平鋪於96孔BD BIOCOAT™聚-D-離胺酸板(Becton Dickinson，目錄編號356640)中，並在37℃下在5% CO₂下於Roswell Park Memorial Institute (RPMI)培養基(例如Gibco，目錄編號52400)中在添加10% FBS (例如Gibco，目錄編號16000)及1%青黴素-鏈黴素(例如Gibco，目錄編號15140)之情況下培育24小時。藉由將測試化合物添加至該培養基中來處理細胞，在10個跨越40 μM至0.002 μM範圍之1:3連續稀釋點處投予，且DMSO濃度為0.2%。在暴露至測試化合物中一小時後，在室溫下用存於PBS中之16%甲醛(最終濃度4%，來自甲醛37%儲備溶液，Sigma，目錄編號F1635)將細胞固定45分鐘，用PBS洗滌一次並在室溫下用冷甲醇透化15分鐘。然後用存於PBS溶液中之0.1% TRITON® X100將細胞洗滌一次，用PBS洗滌兩次

並在室溫下用存於PBS中之3%脫脂乳(Difco，目錄編號232100)阻斷30分鐘。將一級抗組蛋白H3磷酸化Ser10兔多株抗體(Millipore，目錄編號06-570)以1:1000於存於PBS中之3%脫脂乳中添加至細胞中並在4℃下培育過夜。在用存於PBS溶液中之0.1% TRITON® X100洗滌一次並用PBS洗滌兩次後，在室溫下將細胞與山羊抗兔IgG Alexa 488標記之二級抗體1:1000於PBS (Invitrogen目錄編號A11008)中一起培育一小時。在用PBS再洗滌兩次後，添加含有10 µg/mL碘化丙啶(Invitrogen目錄編號P3566)及50 µg/mL核糖核酸酶A (Sigma，目錄編號R-6513)存於PBS中之溶液以對細胞核染色。用ACUMEN EXPLORER™ [雷射掃描螢光微板細胞儀(包含488 nm氬離子雷射激發及多重光電倍增管檢測，由TTP LABTECH有限公司製造)掃描螢光板以量測組蛋白H3蛋白之磷酸化及DNA含量。影像分析係基於細胞螢光信號來鑑別不同亞族群中之細胞。分析輸出係組蛋白H3磷酸化Ser10陽性細胞百分比。藉由使用Genedata Screener®針對每一輸出曲線擬合至四參數邏輯來測定IC₅₀值。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。實例1之化合物顯示以 1467 ± 456 nM (n=4)之IC₅₀抑制極光B。連同下文所提供之基於極光A磷酸化Thr288 MSD細胞之分析數據一起，實例1顯示對極光A之選擇性優於極光B。

細胞溶解物及組蛋白萃取製備

此係製備欲用於以下ELISA Meso Scale Discovery (MSD)極光A磷酸化抑制分析之細胞溶解物上清液之方案。根據MSD製造商說明書(http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288_WCL.pdf)使用溶解緩衝液(Tris 25 mM，pH 7.5；亮抑酶肽10 µg/mL；胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶10 µg/mL；甲苯磺酰基苯丙胺磺基氯甲基酮

(TPCK) 10 $\mu\text{g/mL}$ ；抑肽酶 10 $\mu\text{g/mL}$ ； β -甘油磷酸酯 60 mM；吐溫 (Triton) X-100 1%；焦磷酸鈉($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) 2.5 mM；NaCl 150 mM；EDTA 15 mM；乙二醇四乙酸(EGTA) 5 mM； Na -4-甲苯磺醯基-L-精胺酸甲酯鹽酸鹽(TAME) 2 mM；磷酸4-硝基苯基酯二鈉鹽六水合物(PNPP) 15 mM；苯甲脒 5 mM；鈣酸鈉 1 mM；氟化鈉 10 mM；苯基甲烷磺醯氟(PMSF) 50 $\mu\text{g/mL}$ ；DTT 1 mM；岡田酸 1 μM ；微囊藻毒(microcystine) 1 μM)製備小細胞肺癌(SCLC) H446細胞溶解物。藉由 Biorad DC-Protein分析(#500-0111, BioRad)量測上清液蛋白質濃度且使用25 μL 之1mg/mL細胞溶解物用於極光A磷酸化Thr288 MSD分析。

基於極光A磷酸化Thr288 MSD細胞之分析

該分析之目的係量測在細胞培養物中之極光A激酶抑制活性。使用96孔ELISA Meso Scale Discovery (MSD)板(#K150 JCD全細胞溶解物套組，Meso Scale Discovery，MD)實施該分析。

用150 μL /孔之阻斷溶液-A (最終濃度3% BSA)阻斷MULTI-SPOT®磷酸化極光A Singleple板。在室溫下將該板振盪1小時並用MSD Tris洗滌緩衝液洗滌三次。將25 μL 之1 mg/mL細胞溶解物分配至MULTI-SPOT®磷酸化極光MSD板中。在室溫下將該混合物再培育3小時並將該混合物用MSD Tris洗滌緩衝液洗滌三次。將檢測抗體(SULFO-TAG™抗AuroraA磷酸化T288)稀釋50 $\times$ 於1% BSA抗體稀釋緩衝液(1份之3% BSA與2份之MSD洗滌緩衝液；0.02%之阻斷劑D-R)中，並在室溫下將25 μL /孔添加至該板中，同時振盪1小時。用MSD Tris洗滌緩衝液將該板洗滌3次，然後將150 μL /孔2 $\times$ MSD讀數緩衝液T添加至該板中，並在MSD SECTOR™ Imager 6000儀器上對該等板進行讀數。抑制百分比係定義為 $[(100 - (\text{MSD 值} - \text{MSD 最大抑制值})) / (\text{MSD 最小抑制值} - \text{MSD 最大抑制值})] \times 100$ 。「最大值」及「最小值」係由單獨的2 μM 陽性對照化合物阿裡色替(alisertib)與DMSO陰性

對照界定。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。化合物實例1顯示在細胞中利用1小時化合物處理以 1.4 ± 1.1 nM (n=2)之IC₅₀抑制極光A。數據顯示，實例1在細胞培養物中展示極光A激酶抑制活性。

腫瘤蛋白溶解物及組蛋白萃取製備

此係製備用於以下活體內標靶抑制(IVTI)分析中之異種移植腫瘤溶解物及組蛋白萃取物之方案。將腫瘤樣品於液氮中進行冷凍並置於乾冰容器上之箔片及研鉢及研杵上。用研杵研磨腫瘤組織樣品並將磨碎之腫瘤組織轉移至含有Lysing Maxtrix D珠粒(#6913-500；Biomedicals MP Lysing Maxtrix D)及0.6 mL之溶解緩衝液(Tris 25 mM, pH 7.5；亮抑酶肽10 µg/mL；胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶10 µg/mL；TPCK 10 µg/mL；抑肽酶10 µg/mL；β-甘油磷酸酯60 mM；吐溫X-100 1%；焦磷酸鈉(Na₂H₂P₂O₇) 2.5 mM；NaCl 150 mM；EDTA 15 mM；EGTA 5 mM；Na-4-甲苯磺醯基-L-精氨酸甲酯鹽酸鹽(TAME) 2 mM；PNPP 15 mM；苯甲脒5 mM；釩酸鈉1 mM；氟化鈉10 mM；PMSF 50 µg/mL；DTT 1 mM；岡田酸1 µM；微囊藻毒1 µM)加上完全不含EDTA之錠劑(#1873580；Roche)之管中。將該等管於Bio101 fastPrep (#Bio 101；Thermo Seweant)中以速度6.0劇烈振盪30秒。根據MSD製造商說明書 (http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Phospho_Aurora_A_Thr288_WCL.pdf)製備腫瘤溶解物。藉由Biorad DC蛋白質分析(#500-0111)測定上清液蛋白質濃度。

依照製造商說明書 (<http://www.epigentek.com/docs/OP-0006.pdf>)使用總組蛋白萃取套組(#OP-0006；EpiQuik)自上一離心步驟中之腫瘤組織沈澱物萃取總組蛋白。藉由Biorad DC蛋白質分析(#500-0111；

BioRad)量測蛋白質濃度，並使用25 μ L之0.25 mg/mL組蛋白萃取物蛋白用於IVTI組蛋白H3磷酸化Ser10分析。

極光A活體內標靶抑制(IVTI)磷酸化Thr288 MSD分析

該分析之目的係利用異種移植物腫瘤樣品量測活體內極光A激酶抑制。用96孔ELISA Meso Scale Discovery (MSD)板格式實施該分析。向MULTI-SPOT®磷酸化極光A Singleplex板(K150 JCD全細胞溶解物套組；Meso Scale Discovery，MD)裝填150 μ L/孔之阻斷溶液-A(最終濃度3% BSA)。在室溫下將該板振盪1小時並用Tris洗滌緩衝液洗滌三次。自上文腫瘤溶解物方案製備腫瘤溶解物達1 mg/mL並將25 μ L/孔分配至MULTI-SPOT®磷酸化極光MSD板中。在室溫下將該混合物再培育3小時，並用Tris洗滌緩衝液洗滌洗滌3次。將存於1% BSA抗體稀釋緩衝液中之檢測SULFO-TAG™抗AuroraA磷酸化T288抗體(抗體稀釋50×至具有1份之3% BSA加上2份之洗滌緩衝液之緩衝液中；0.02%之阻斷劑D-R)以25 μ L/孔之量添加至該板中，並在室溫下將該板振盪1小時。用Tris洗滌緩衝液將該板洗滌3次，將150 μ L/孔2×讀數緩衝液T添加至該板中，且然後在MSD SECTOR™ Imager 6000儀器上立即讀數。抑制百分比係定義為 $[100 - (\text{化合物處理群組平均MSD讀數} / \text{媒劑群組平均MSD讀數})] * 100$ 。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。利用裸小鼠中之H446異種移植物模型(臨限有效劑量)在劑量反應研究中投予後3小時實例1之化合物顯示2.13 mg/kg之TED₅₀。數據顯示，利用異種移植物腫瘤樣品在指定TED下，實例1展示活體內極光A激酶抑制。

極光B活體內標靶抑制(IVTI)組蛋白H3磷酸化Ser10 MSD分析

該分析之目的係利用異種移植物腫瘤樣品藉由測定組蛋白H3磷酸化Ser10抑制來量測活體內極光B激酶抑制活性，此乃因其係極光B

之直接下游激酶受質。用96孔ELISA Meso Scale Discovery (MSD)板格式實施該分析。將阻斷溶液-A (最終濃度3% BSA)以150 μ L/孔添加至MULTI-SPOT® 組蛋白H3 4點滴板(目錄編號K150 EWD-3 JCD全細胞溶解物套組, Meso Scale Discovery, MD)中, 並將在室溫下該板振盪1小時。在用MSD Tris洗滌緩衝液洗滌3次後, 將用上文腫瘤溶解物方案製備達0.25mg/mL之組蛋白萃取物以25 μ L/孔分配至MSD板上。在室溫下將該混合物再培育3小時, 用MSD Tris洗滌緩衝液洗滌3次。將檢測SULFO-TAG抗組蛋白H3磷酸化Ser10抗體稀釋50 $\times$ 至3 mL 1% BSA 抗體稀釋緩衝液(1 ml 3% BSA與2 mL MSD洗滌緩衝液; 0.01%之阻斷劑D-M)中, 並將25 μ L/孔添加至該板中並在室溫下將該板振盪1小時。然後用MSD Tris洗滌緩衝液將板洗滌3次。將150 μ L/孔之2 $\times$ MSD讀數緩衝液T添加至該板中。立即用MSD SECTOR™ Imager 6000儀器對該板進行讀數。抑制百分比係定義為 $[100 - (\text{化合物處理群組平均MSD讀數} / \text{媒劑群組平均MSD讀數})] \times 100$ 。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。在該分析中在劑量反應研究中以30 mg/kg投予後3小時並在時間進程研究中以50 mg/kg投予後1小時, 實例1之化合物不提供50%以上組蛋白H3磷酸化Ser10抑制。結果表明, 利用異種移植物腫瘤樣品在指定劑量下, 實例1在活體內不抑制極光B。

利用SCLC NCI-H446裸小鼠異種移植物模型之抗腫瘤生長效力

該分析係在SCLC NCI-H446及SCLC NCI-H69裸小鼠異種移植物模型中量測活體內腫瘤生長抑制。根據實驗動物照護與使用方案實施所有活體內研究。對於異種移植物模型而言, 如供應商所推薦維持人類小細胞肺癌NCI-H446細胞及人類小細胞肺癌NCI-H69細胞。收穫該等細胞, 洗滌, 並再懸浮於無血清培養基及基質膠(354234, Becton Dickinson)之1:1混合物中。然後將細胞以 5×10^6 個細胞/小鼠皮下植入

無胸腺裸雌性小鼠(Harlan Laboratories)之後裔中。藉由使用公式估算腫瘤體積： $v=l \times w^2 \times 0.536$ ，其中 l = 較大量測直徑且 w = 較小垂直直徑。用SAS軟體(SAS Institutes公司，Cary，NC)分析數據。

當在裸小鼠中平均腫瘤體積達到150 mm³時，藉由腫瘤體積將動物隨機分組，並於使用20%羥丙基β環糊精(HPBCD)/25 mM磷酸鹽緩衝液pH 8之媒劑之調配物中投與測試化合物，其中用1 N NaOH將最終pH調節至pH 9。每個媒劑及處理群組使用十隻動物。對於所獲取之每一時間點，將處理群組與對照媒劑群組比較。每一處理群組之腫瘤體積係以平均值連同標準誤給出。

在此分析中實質上如上文所述測試屬本發明範圍內之化合物。在小細胞肺癌NCI-H446異種移植物裸小鼠模型及在小細胞肺癌NCI-H69異種移植物裸小鼠模型中，實例1之化合物展示顯著抗腫瘤生長效力。

表4：利用實例1處理之SCLC H446異種移植物腫瘤生長活體內抑制

投予時間表	腫瘤體積平均值(mm ³)	腫瘤體積SE (mm ³)	p值	ΔT/C (%)	退化 (%)
媒劑	698.61	319.434	NA	NA	NA
實例1 30 mg/kg； BID×21	106.19	22.729	<0.001*	NA	-45.8
實例1 50 mg/kg； BID×21	31.62	4.340	<0.001*	NA	-83.9

腫瘤體積之分析係基於Log 10及SpatialPower共變異數結構。

*：顯著性($p < 0.05$)；NA：不適用。

當經處理群組中之腫瘤體積係在基線腫瘤體積下或其以上(第16天)時，在第30天計算ΔT/C (%)。

公式為 $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$ ，其中T及C分別係經處理或對照群組

中之平均終點腫瘤體積。T0及C0係該等群組中之平均基線腫瘤體積。

當終點體積低於基線時，計算退化(%)。公式為 $100 \times (T - T_0) / T_0$ ，其中T0係經處理群組中之平均基線腫瘤體積。

表5：利用實例1處理之SCLC H69異種移植瘤生長活體內抑制

投予時間表	腫瘤體積平均值 (mm ³)	腫瘤體積SE (mm ³)	p值	ΔT/C (%)	退化 (%)
媒劑	687.61	95.175	NA	NA	NA
實例1 30 mg/kg ; BID×14	73.35	9.269	<0.001*	NA	-63.6
實例1 50 mg/kg ; BID×14	72.32	8.035	<0.001*	NA	-63.1

腫瘤體積之分析係基於Log 10及SpatialPower共變異數結構。

*：顯著性(p < 0.05)；NA：不適用。

當經處理群組中之腫瘤體積係在基線腫瘤體積下或其以上(第16天)時，在第30天計算ΔT/C (%)。

公式為 $100 \times (T - T_0) / (C - C_0)$ ，其中T及C分別係經處理或對照群組中之平均終點腫瘤體積。T0及C0係該等群組中之平均基線腫瘤體積。

當終點體積低於基線時，計算退化(%)。公式為 $100 \times (T - T_0) / T_0$ ，其中T0係經處理群組中之平均基線腫瘤體積。

【圖式簡單說明】

無

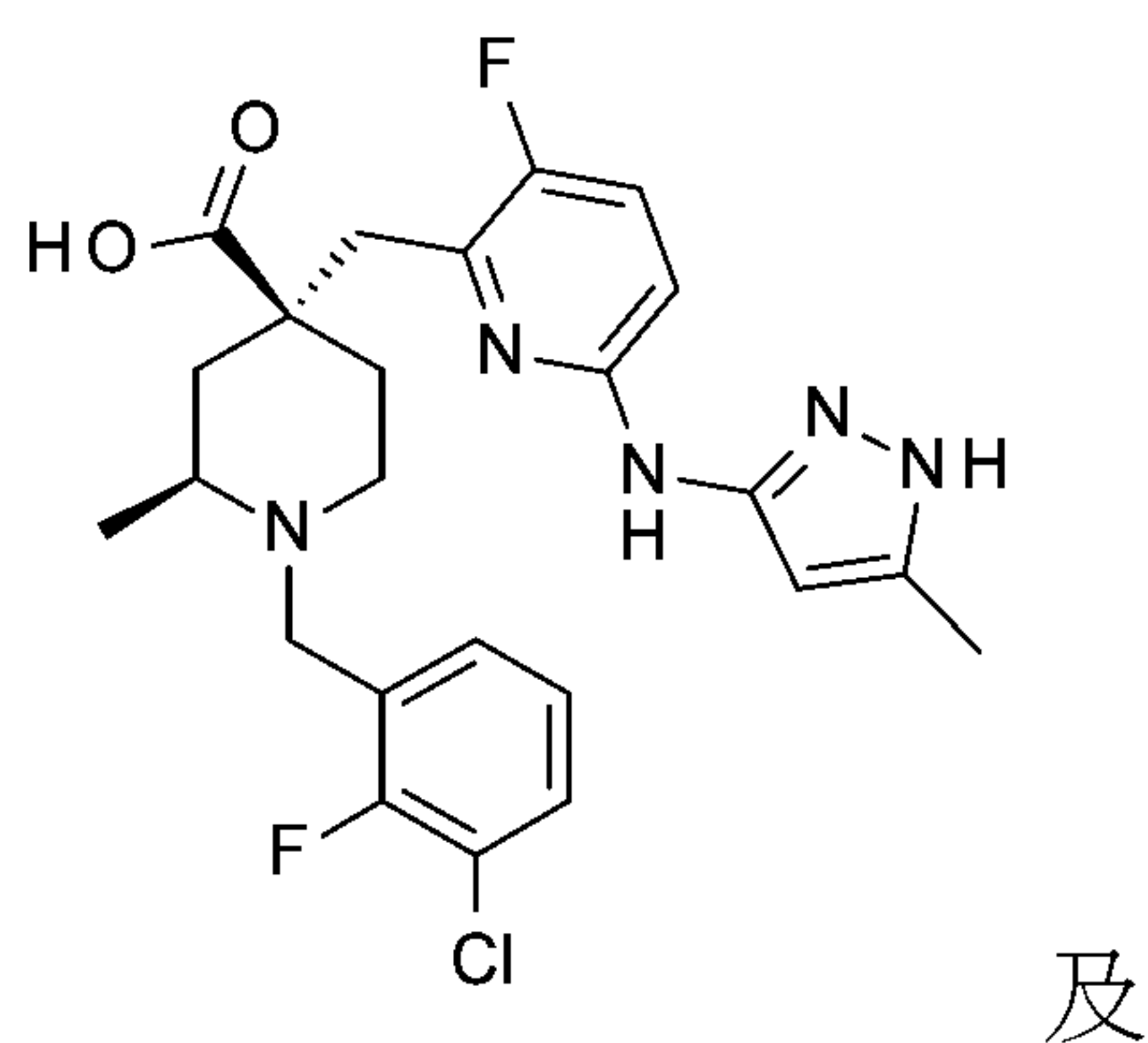
【符號說明】

無

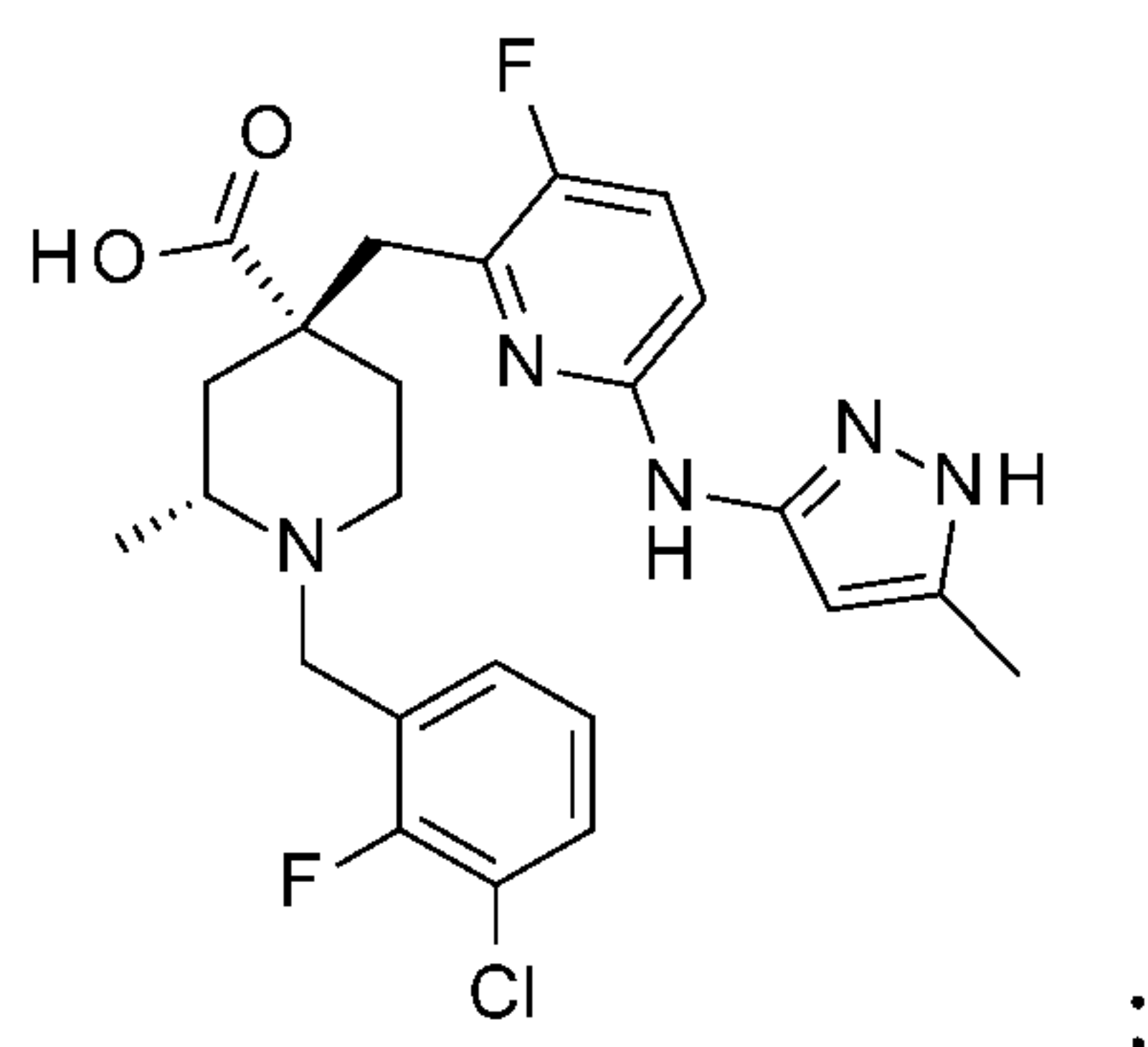
申請專利範圍

1. 一種化合物或鹽，其選自由以下組成之群：

(2S,4S)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸：

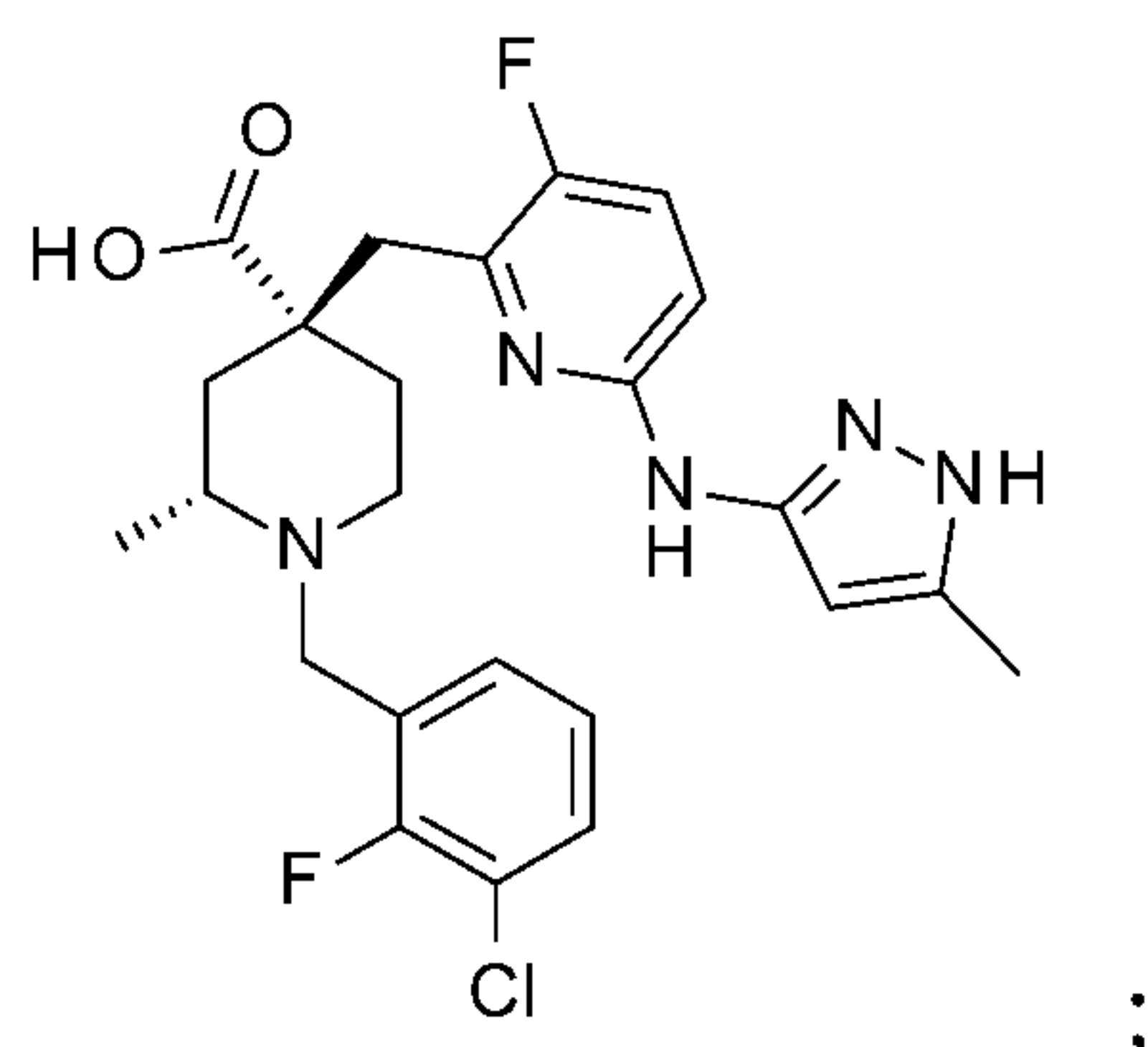


(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸：



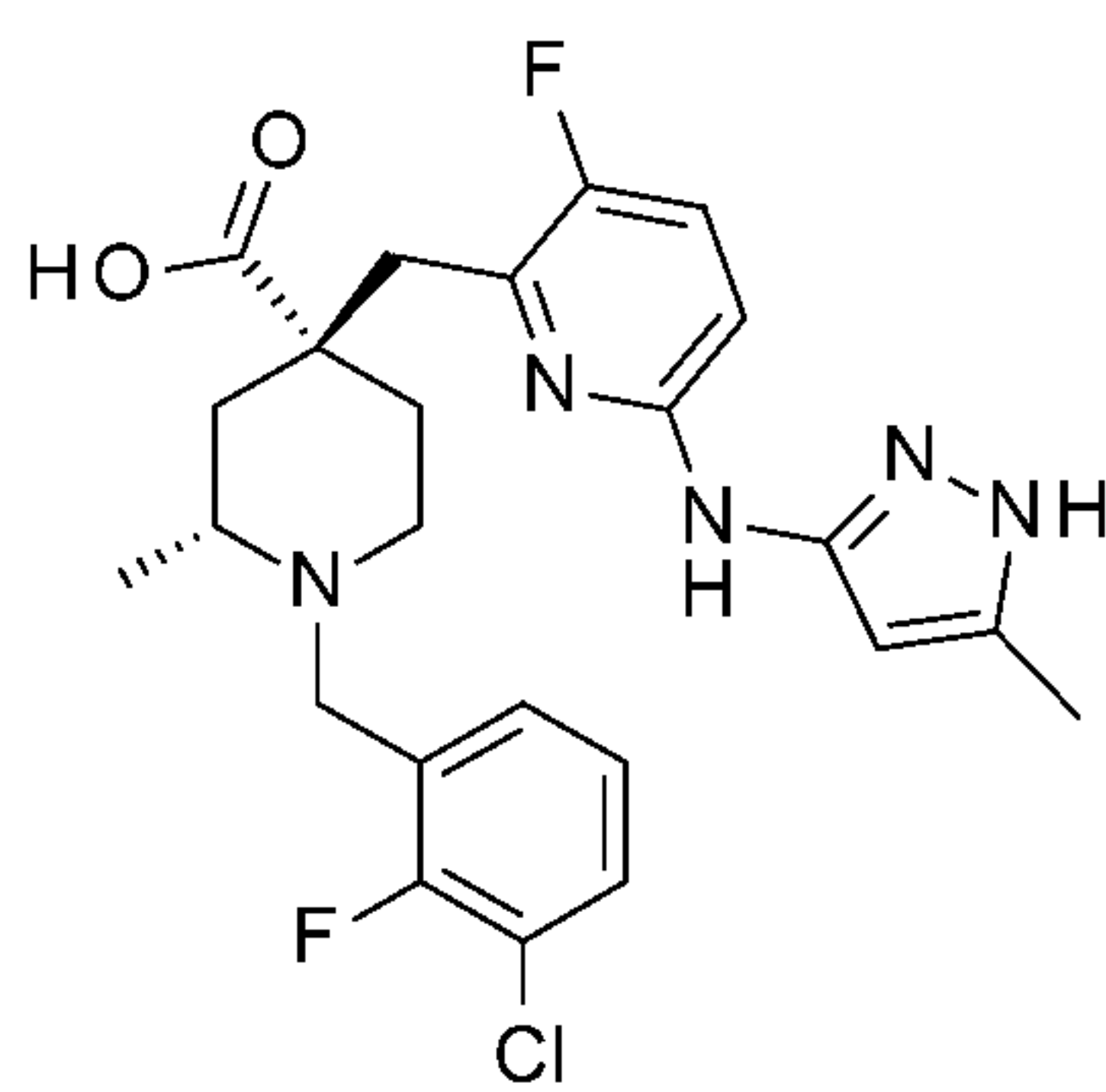
以及其醫藥上可接受之鹽。

2. 如請求項1之化合物或鹽，其係(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡唑-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸：



或其醫藥上可接受之鹽。

3. 如請求項2之化合物或鹽，其係(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸：



4. 如請求項2之化合物或鹽，其中該醫藥上可接受之鹽係(2R,4R)-1-[(3-氯-2-氟-苯基)甲基]-4-[[3-氟-6-[(5-甲基-1H-吡啶-3-基)胺基]-2-吡啶基]甲基]-2-甲基-六氫吡啶-4-甲酸之第三丁胺鹽。
5. 如請求項1至4中任一項之化合物或鹽，其用於療法。
6. 如請求項1至4中任一項之化合物或鹽，其用於治療癌症。
7. 如請求項6之化合物或鹽，其中該癌症選自由小細胞肺癌、結腸直腸癌、胃癌、前列腺癌、乳癌、子宮頸癌、頭頸癌、食道癌、卵巢癌、非小細胞肺癌及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)組成之群。
8. 如請求項7之化合物或鹽，其中該癌症係小細胞肺癌。
9. 如請求項7之化合物或鹽，其中該癌症係前列腺癌。
10. 如請求項7之化合物或鹽，其中該乳癌係三陰性乳癌。
11. 如請求項7之化合物或鹽，其中該癌症係子宮頸癌。
12. 如請求項7之化合物或鹽，其中該癌症係頭頸癌。
13. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之化合物或鹽及醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。
14. 一種如請求項1至4中任一項之化合物或鹽之用途，其用於製造

用以治療癌症之藥劑。

15. 如請求項14之用途，其中該癌症選自由小細胞肺癌、結腸直腸癌、胃癌、前列腺癌、乳癌、子宮頸癌、頭頸癌、食道癌、卵巢癌、非小細胞肺癌及非霍奇金氏淋巴瘤組成之群。
16. 如請求項15之用途，其中該癌症係小細胞肺癌。
17. 如請求項15之用途，其中該癌症係前列腺癌。
18. 如請求項15之用途，其中該乳癌係三陰性乳癌。
19. 如請求項15之用途，其中該癌症係子宮頸癌。
20. 如請求項15之用途，其中該癌症係頭頸癌。