



(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 I433846 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：098113265

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 04 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07D403/14 (2006.01)

C07D413/14 (2006.01)

A61K31/506 (2006.01)

A61K31/553 (2006.01)

A61K31/496 (2006.01)

A61P9/00 (2006.01)

A61P7/06 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2008/04/23 德國

10 2008 020 113.8

(71)申請人：拜耳智慧財產有限公司(德國)BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH (DE)
德國

(72)發明人：傑斯克 馬力歐 JESKE, MARIO (DE)；福雷 英格 FLAMME, INGO (DE)；史托爾 弗萊德克 STOLL, FRIEDERIKE (DE)；貝克 哈穆特 BECK, HARTMUT (DE)；阿克巴巴 麥汀 AKBABA, METIN (TR)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

WO 2006/114213A1

WO 2008/067871A1

審查人員：李淑禎

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 92 頁

(54)名稱

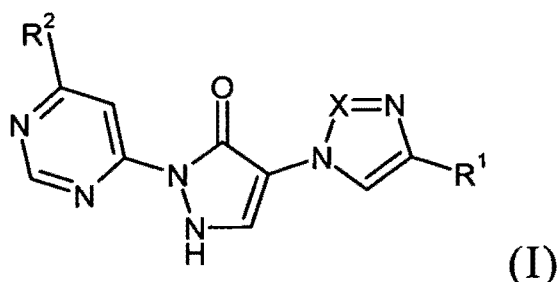
經取代之二氫吡唑酮及其用途

SUBSTITUTED DIHYDROPYRAZOLONES AND THEIR USE

(57)摘要

本申請案係有關一種新穎之經取代之二氫吡唑酮衍生物，其製法，其於治療與/或預防疾病上之用途，及其於製備用於治療與/或預防疾病(特定言之心血管與血液疾病及腎臟疾病)及用於促進傷口癒合之醫藥上之用途。

The present application relates to novel substituted dihydropyrazolone derivatives, processes for their preparation, their use for treatment and/or prophylaxis of diseases and their use for the preparation of medicaments for treatment and/or prophylaxis of diseases, in particular cardiovascular and haematological diseases and kidney diseases, and for promoting wound healing.



公告本

發明專利說明書

98年1月3日 修正 補充 第1-84頁

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98113265

C07D 403/14 (2006.01)

※申請日：98.4.22

※IPC 分類：

C07D 413/14 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 31/553 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經取代之二氫吡唑酮及其用途

A61K 31/496 (2006.01)

SUBSTITUTED DIHYDROPYRAZOLONES AND THEIR
USE

二、中文發明摘要：

本申請案係有關一種新穎之經取代之二氫吡唑酮衍生物，其製法，其於治療與/或預防疾病上之用途，及其於製備用於治療與/或預防疾病(特定言之心血管與血液疾病及腎臟疾病)及用於促進傷口癒合之醫藥上之用途。

三、英文發明摘要：

The present application relates to novel substituted dihydropyrazolone derivatives, processes for their preparation, their use for treatment and/or prophylaxis of diseases and their use for the preparation of medicaments for treatment and/or prophylaxis of diseases, in particular cardiovascular and haematological diseases and kidney diseases, and for promoting wound healing.

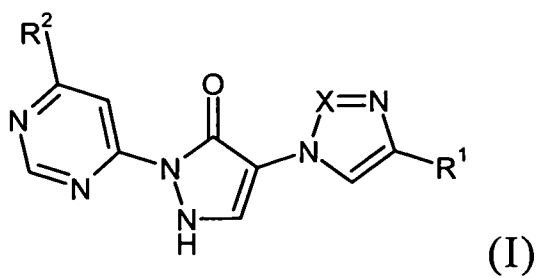
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

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】

本申請案係有關一種新穎之經取代之二氫吡唑酮衍生物，其製法，其於治療與/或預防疾病上之用途，及其於製備用於治療與/或預防疾病(特定言之心血管與血液疾病及腎臟疾病)及用於促進傷口癒合之醫藥上之用途。

【先前技術】

人體或其組成供氧不足時，會因其過程時間長短及/或程度而損壞人體或其組成之正常功能或導致其功能完全破壞，此現象稱為缺氧。缺氧可能因所吸入空氣中可利用之氧氣減少(例如：在高山)、體外呼吸失常(例如：因肺部功能異常或呼吸道阻塞所致)、心臟輸出量減少(例如：心臟功能不足、因肺栓塞所致之急性右心室負載過度)、血中氧運輸量太低(例如：因貧血或中毒，例如：一氧化碳中毒所致)、因血管阻塞以致血流減少造成之局部缺氧(例如：心臟、下肢或腦之典型絕血狀態、糖尿病性大血管-與微血管病變)或因組織需氧量增加(例如：因肌肉活動提高或局部發炎所致)而引起[Eder, Gedigk(編輯), *Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie*, 第 33 版，柏林 Springer 出版社，1990]。

人體在供氧量減少之狀態下急性及慢性適應之程度有限。除了立即反應外，還特別包括心臟輸出量與呼吸輸出量提高，並因靜止-緊張控制機轉而使血管局部舒張，缺氧導致許多基因之轉錄作用改變。此時之基因產物功能為補償氧不足。因此，糖原酵解與葡萄糖轉運子 1 之數種酵素之表現會

加強，結果提高無氧 ATP 生產，並可在氧不足下存活 [Schmidt, Thews(編輯), *Physiologie des Menschen*, 第 27 版，柏林 Springer 出版社，1997；Löffler, Petrides(編輯), *Biochemie und Pathobiochemie*, 第 7 版，柏林 Springer 出版社，2003]。

缺氧進一步加強血管內皮細胞生長因子 VEGF 之表現，因此缺氧組織中刺激血管再生(血管新生作用)。通過絕血組織之血流可因此而長期改善。此種逆勢調節作用對各種不同心血管疾病與血管阻塞疾病顯然極不適當[參見：Simons 與 Ware 之 *Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease*, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2(11), 863-71(2003)]。

此外，在全身性缺氧上，則加強主要在腎臟之間質性纖維母細胞中形成之肽激素促紅血球生成素之表現。藉以刺激骨髓中紅血球形成，因而增加血液之輸送氧氣能力。這種效應已運用在高表現能力之運動員身上，稱為高山訓練法(high altitude training)。因例如：出血後貧血而致之血液輸送氧氣能力下降通常會使腎臟增加產生促紅血球生成素。某些型式之貧血可能干擾這種調節機轉或可能將其正常數值向下調降。因此例如：罹患腎功能不足之患者雖然仍在腎臟實質中生產促紅血球生成素，但受到氧運送能力之影響而顯著減少，造成所謂腎貧血。特定言之，腎貧血及腫瘤與 HIV 感染引起之貧血之治療法通常經腹膜內投與重組人類促紅血球生成素(rhEPO)。目前仍無其他可經口服用之醫藥可以替代這種高成本之療法[參見：Eckardt 之 *The potential of erythropoietin and related strategies to stimulate erythropoiesis*, *Curr. Opin.*

Investig. Drugs 2(8), 1081-5(2001) ; Berns 之 *Should the target hemoglobin for patients with chronic kidney disease treated with erythropoietic replacement therapy be changed?*, Semin. Dial. 18(1), 22-9(2005)]。近來之研究證實，除了其增加促紅血球生成之作用外，促紅血球生成素亦對缺氧組織(特定言之，心臟與腦)具有獨立之保護(抗細胞凋亡)作用。此外，依據最近之研究，採用促紅血球生成素之療法可降低心臟功能不足患者之平均嚴重罹病率[參見：Caiola 與 Cheng 之 *Use of erythropoietin in heart failure management*, Ann. Pharmacother. 38(12), 2145-9(2004) ; Katz, *Mechanisms and treatment of anemia in chronic heart failure*, Congest. Heart. Fail. 10(5), 243-7(2004)]。

上述可因缺氧而誘發之基因之共同特色在於其在缺氧下所提高之表現係由所謂之“缺氧所誘發轉錄因子(HIF)”所引起。HIF 為一種雜二聚體轉錄因子，係由 α 與 β 亞單位組成。已說明有三種 HIF α 同型，其中 HIF-1 α 與 HIF-2 α 具高度同質性，對缺氧所誘發基因表現具有重要性。雖然 β 亞單位(已說明其中 2 種同型)(亦稱為 ARNT(芳基烴受體核移位子)持續表現，而 α 亞單位之表現則依細胞中氧含量而定。在正常含氧量下，HIF α 蛋白質係普遍存在，然後被蛋白降解體降解。在缺氧下，此降解作用受到抑制，因此 HIF α 會與 ARNT 形成二聚體，進而活化其目標基因。該 HIF 二聚體與其目標基因之調節序列中所謂之缺氧負責元素(hypoxia-responsible elements(HRE))結合。HRE 之定義為一種同義序列。已在許多缺氧所誘發基因之調節元素中檢測到功能性

HRE[參見：Semenza 之 *Hypoxia-inducible factor 1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology*, Trends Mol. Med. 7(8), 345-50(2001)；Wenger 與 Gassmann, *Oxygen(es)and the hypoxia-inducible factor-1*, Biol. Chem. 378(7), 609-16(1997)]。

這種 HIF α 之調節作用之分子機轉基礎已由幾組獨立之研究者發現。該機轉隨物種而異：HIF α 被兩個特定之脯胺醯基(人類 HIF-1 α 亞單位之 P402 與 P564)上依賴氧之脯胺醯基 4-羥化酶之子群(稱為 PHD 或 EGLN)進行羥基化。HIF 脯胺醯基 4-羥化酶為依賴鐵之轉化 2-側氧基戊二酸酯之二氧化酶 [Epstein 等人之 *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*, Cell 107(1), 43-54(2001)；Bruick 與 McKnight 之 *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*, Science 294(5545), 1337-40(2001)；Ivan 等人之 *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(21), 13459-64(2002)]。該等酵素首次於 2001 年解讀為脯胺醯基羥化酶 [Aravind 與 Koonin 之 *The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases*, Genome Biol. 2(3), research0007.1-0007.8, Epub 2001 Feb 19]。

pVHL 腫瘤抑制子蛋白質，其與延伸蛋白(elongin)B 與 C 共同形成所謂之 VBC 複合體，使 HIF α 亞單位得以配合

E3 泛素黏接酶，與脯胺醯基經羥化之 HIF α 亞單位結合。由於 HIF α 亞單位之脯胺醯基 4-羥化作用及其接續之降解作用係隨細胞內氧濃度變化，因此 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶亦稱為細胞氧感受器。已判別這類酵素之三種同型：EGLN1/PHD2、EGLN2/PHD1 與 EGLN3/PHD3。其中兩種酵素(EGLN2/PHD1 與 EGLN3/PHD3)即使在缺氧下仍經轉錄作用誘發，且可能與慢性缺氧下所觀察到之 HIF α 濃度下降有關[參見：Schofield 與 Ratcliffe 之 *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 5(5), 343-54(2004)]。

以選擇性醫藥抑制 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶可以提高依賴 HIF 之目標基因之基因表現，因此有利於醫療許多種疾病症候群。特別針對心血管系統疾病，應可由誘發新血管及在絕血器官之代謝狀態下，由有氧 ATP 生產改變成無氧 ATP 生長，而改善疾病過程。尤其當潰瘍病灶處及其他慢性皮膚傷口很難癒合時，改善慢性傷口之血管化作用會促進癒合過程。在某些疾病型式，特定言之，罹患腎貧血患者中誘發內因性促紅血球生成素時，同樣可達到醫療目的。

迄今科學文獻所說明之 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶抑制劑尚無法符合醫藥上之要求。其係競爭性側氧基戊二酸酯類似物(如，例如：N-草醯基甘胺酸)，其特徵在於其作用效力極低，因此仍無法在活體內模式具有誘發 HIF 目標基因之作用。或其為鐵-複合劑(螯合劑)，如：去鐵胺(desferroxamine)，其係作為含鐵之二氧化酶之非專一性抑制劑，且雖然其於活體內誘發目標基因，如，例如：促紅血球

生成素，但顯然因與可利用之鐵複合，所以與紅血球生成作用出現抗衡現象。

具有殺細菌與/或殺真菌作用之 2-雜芳基-4-芳基-1,2-二氫吡唑酮類已揭示於 EP 165 448 與 EP 212 281。作為治療呼吸道、心血管與炎症之脂氧化酶抑制劑之 2-雜芳基-4-芳基-1,2-二氫吡唑酮類已於 EP 183 159 中申請專利權。具有除草活性之 2,4-二苯基-1,2-二氫吡唑酮類說明於 DE 2 651 008。某些 2-吡啶基-1,2-二氫吡唑酮類之製法與醫藥性質已說明於 *Helv. Chim. Acta* 49(1), 272-280(1966)。WO 96/12706、WO 00/51989 與 WO 03/074550 主張用於治療各種不同疾病之具有二氫吡唑酮部份結構之化合物之專利權，且用於治療神經精神疾病之經羥基-或烷氧基取代之聯吡唑類已揭示於 WO 2006/101903。用於治療疼痛與各種不同 CNS 疾病之經雜芳基取代之吡唑衍生物已進一步說明於 WO 03/051833 與 WO 2004/089303。WO 2006/114213 同時揭示 2,4-二吡啶基-1,2-二氫吡唑酮類作為 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶之抑制劑。

化合物 3-甲基-1-(吡啶-2-基)-4-(1-吡啶-2-基-3-甲基-1*H*-吡唑-5-基)-2*H*-3-吡唑啉-5(1*H*)-酮(別名：5,5'-二甲基-2,2'-二吡啶-2-基-1',2'-二氫-2*H*,3'*H*-3,4'-聯吡唑-3'-酮)之 X-射線結晶結構已說明於 *Acta Crystallogr., Section E : Structure Reports Online* E57(11), o1126-o1127(2001)[*Chem. Abstr.* 2001 : 796190]。某些 3',5'-二甲基-2-苯基-1'-(1,3-噻唑-2-基)-1'*H*,2*H*-3,4'-聯吡唑-5'-醇衍生物之合成法已說明於 *Indian J. Heterocyclic Chem.* 3(1), 5-8(1993)[*Chem. Abstr.* 1994 :

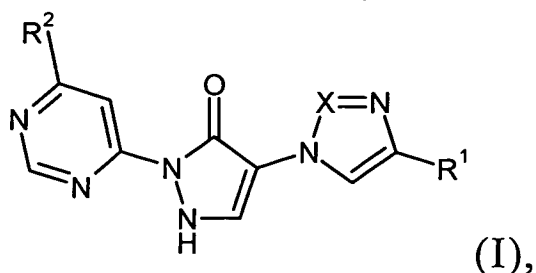
323362]。個別之 4-(吡唑-5-基)吡唑啉-5-酮衍生物之製法與互變異構作用已說明於 *J. Heterocyclic Chem.* 27(4), 865-870(1990)[*Chem. Abstr.* 1991:428557]。此等文獻中所述及化合物之醫療用途則迄今尚無人說明。化合物 2-第三丁基-1'-[4-(4-氯苯基)-1,3-噁唑-2-基]-3',5-二甲基-1'*H*,2*H*-3,4'-聯吡唑-5'-醇則列為 WO 2007/008541 之試驗實例。

【發明內容】

本發明之主題在於提供一種供治療疾病，特定言之心血管與血液疾病之新穎化合物。

本發明內容中，現在說明之化合物可作為 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶之專一性抑制劑，且依據此專一性作用機轉，可於活體內，在非經腸式或經口投藥後誘發 HIF 目標基因，如，例如：促紅血球生成素，及其所引起之生物過程，如：促紅血球生成作用。

本發明提供如下式化合物



其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表飽和之 4-至 7-員雜環基，其利用一個氮原子附接，

其中雜環基可經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羥基、羥基羰基、C₁-C₃-烷基、C₁-C₃-烷

基胺基與 C₃-C₆-環烷基，

或

其中雜環基可經 1 至 4 個氟取代基取代，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

根據本發明化合物為式(I)化合物與其鹽、溶劑合物及其鹽之溶劑合物，及式(I)中所包括之化合物與下列具體實施例所述及之化合物，與其鹽、溶劑合物及其鹽之溶劑合物，其中式(I)中所包括之化合物與下列所述及之化合物不一定已形成鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

根據本發明化合物依其結構而定，可呈立體異構型(對映異構物、非對映異構物)。因此本發明包括對映異構物或非對映異構物與其特定混合物。立體化學性均一之組成物可依已知方式自對映異構物與/或非對映異構物之此等混合物中單離。

若根據本發明化合物出現互變異構型時，本發明包括所有此等互變異構型。

本發明內容中，較佳鹽類為根據本發明化合物之生理上可接受之鹽類。亦包括其本身不一定適用於醫藥，但可用於例如：單離或純化根據本發明化合物之鹽類。

根據本發明化合物之生理上可接受之鹽類包括礦物酸、羧酸與磺酸之酸加成鹽，例如：鹽酸、氫溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、萘二磺酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、乳酸、酒石酸、蘋果酸、檸檬酸、富馬酸、馬來酸與苯甲酸之鹽類。

根據本發明化合物之生理上可接受之鹽類亦包括一般鹼

類之鹽類，如，例如且較佳為鹼金屬鹽類(例如：鈉與鉀鹽)、鹼土金屬鹽類(例如：鈣與鎂鹽)與衍生自氮或具有 1 至 16 個碳原子之有機胺之銨鹽，如，例如且較佳為乙基胺、二乙基胺、三乙基胺、乙基二異丙基胺、單乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二環己胺、二甲基胺基乙醇、普魯卡因(procaine)、二苯甲基胺、*N*-甲基嗎啉、精胺酸、離胺酸、乙二胺與 *N*-甲基哌啶。

本發明內容中之溶劑合物係指彼等根據本發明化合物與溶劑分子配位形成固態或液態之複合物。若與水發生配位時，水合物即為一種特定之溶劑合物型式。本發明內容中以水合物為較佳溶劑合物。

本發明亦包括根據本發明化合物之前藥。"前藥"包括本身有或沒有生物活性之化合物，但可以在體內停留期間轉化(例如：代謝或水解)成根據本發明化合物。

本發明內容中，取代基之定義如下，除非另有說明：

烷基本身與烷基胺基中之"烷基"代表具有 1 至 3 個碳原子之直鏈或分支烷基，例如：較佳為甲基、乙基、正丙基、異丙基。

烷基胺基代表具有 1 或 2 個(分別獨立選出之)烷基取代基之烷基胺基，例如：較佳為甲基胺基、乙基胺基、正丙基胺基、異丙基胺基、*N,N*-二甲基胺基、*N,N*-二乙基胺基、*N*-乙基-*N*-甲基胺基、*N*-甲基-*N*-正丙基胺基與 *N*-異丙基-*N*-正丙基胺基。例如： C_1 - C_3 -烷基胺基代表具有 1 至 3 個碳原子之單烷基胺基或代表每個烷基取代基具有 1 至 3 個碳原子之二烷基胺基。

環烷基代表一般具有 3 至 6 個碳原子之單環狀環烷基；可述及之環烷基實例較佳為環丙基、環丁基、環戊基與環己基。

可利用一個氮原子附接之飽和 4-至 7-員雜環基代表具有 4 至 7 個環原子之單環飽和雜環基，其中包括一個所附接之氮原子與另包含至多 2 個，較佳為至多一個雜原子與/或選自 N、O、S、SO、SO₂ 所組成群中之雜基團，其中氮原子亦可形成 N-氧化物。較佳為另具有至多一個選自由 O、N 與 S 所組成群中雜原子之 4-至 7-員單環狀飽和雜環基，例如：較佳為氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基、哌啶-1-基、嗎啉-4-基、硫嗎啉-4-基、哌啶-1-基、1,2-氧氮雜環己烷-2-基、1,4-氧氮雜環庚烷-4-基、1,4-硫雜環庚烷-4-基。

較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表飽和之 4-至 7-員雜環基，其利用一個氮原子附接，其中雜環基經 1 至 4 個氟取代基取代，
或

R² 代表哌啶-1-基，

其中哌啶-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自 C₃-C₆-環烷基所組成群中，

或

R² 代表氮雜環丁烷-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羥基羰基、C₁-C₃-烷基、C₁-C₃-烷

基胺基與 C_3 - C_6 -環烷基，

或

R^2 代表 1,2-氧氮雜環己烷-2-基或 1,4-氧氮雜環庚烷-4-基，
及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基或哌啶-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基與哌啶-1-基經 1 至 4
個氟取代基取代，

或

R^2 代表哌啶-1-基，

其中哌啶-1-基之 4-位置經一個取代基取代，其中該取代
基係選自 C_3 - C_6 -環烷基所組成群中，

或

R^2 代表氮雜環丁烷-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基之 3-位置經一個取代基取代，其中
該取代基係選自下列所組成群中：羥基羰基、甲基與二甲基
胺基，

或

R^2 代表 1,2-氧氮雜環己烷-2-基或 1,4-氧氮雜環庚烷-4-基，
及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表飽和之 4-至 7-員雜環基，其利用一個氮原子附接，
其中雜環基經 1 至 4 個氟取代基取代，
及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基或哌啶-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基與哌啶-1-基經 1 至 4
個氟取代基取代，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基或哌啶-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基、吡咯啉-1-基與哌啶-1-基經 2 個
氟取代基取代，其中此等取代基附接在同一個碳原子上。

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表哌啶-1-基，

其中哌啶-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自
 C_3 - C_6 -環烷基所組成群中，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表哌啶-1-基，

其中哌啶-1-基之 4-位置經一個取代基取代，其中該取代基係選自 C₃-C₆-環烷基所組成群中，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表氮雜環丁烷-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羧基、C₁-C₃-烷基、C₁-C₃-烷基胺基與 C₃-C₆-環烷基，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表氮雜環丁烷-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羧基、甲基與二甲基胺基，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表氮雜環丁烷-1-基，

其中氮雜環丁烷-1-基之 3-位置經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羥基羰基、甲基與二甲基胺基，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表 1,2-氧氮雜環己烷-2-基或 1,4-氧氮雜環庚烷-4-基。

亦較佳為式(I)化合物，其中 X 代表 N。

亦較佳為式(I)化合物，其中 R¹ 代表氫。

亦較佳為式(I)化合物，其中 R¹ 代表氰基。

亦較佳為式(I)化合物，其中 R² 代表 4-環丁基-哌啶-1-基。

亦較佳為式(I)化合物，其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氰基，

R² 代表飽和之 4-至 7-員雜環基，其利用一個氮原子附接，

其中雜環基經一個取代基取代，其中該取代基係選自下列所組成群中：羥基、羥基羰基、C₁-C₃-烷基、C₁-C₃-烷基胺基與 C₃-C₆-環烷基，

或

其中雜環基經 1 至 4 個氟取代基取代，

及其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物。

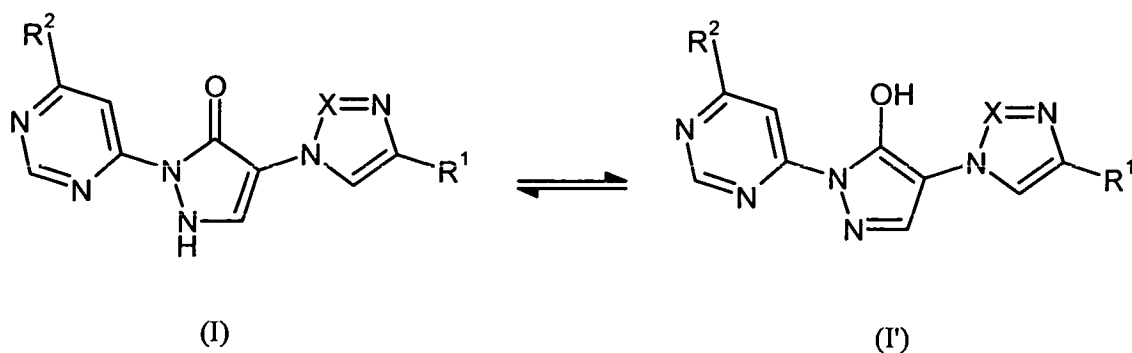
基團之特定組合或較佳組合中詳細說明之基團定義亦可依需要被其他組合之基團定義置換，不受所指定特定基團組

合之影響。

以上述兩種或多種較佳範圍之組合極特別佳。

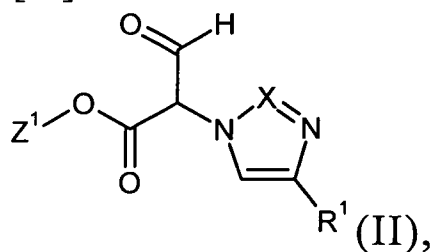
根據本發明式(I)1,2-二氫吡唑-3-酮衍生物亦可呈互變異構性 1*H*-吡唑-5-醇型(I')(參見下列反應圖 1)；這兩種互變異構型當然亦包括在本發明中。

反應圖 1



本發明亦提供一種製備式(I)化合物或其鹽、溶劑合物與其鹽之溶劑合物之方法，其中根據下列製法

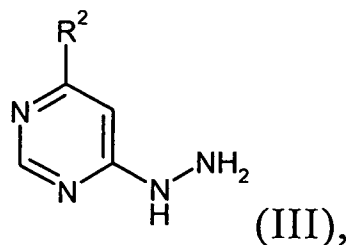
[A] 由如下式化合物



其中 R^1 如上述定義，及

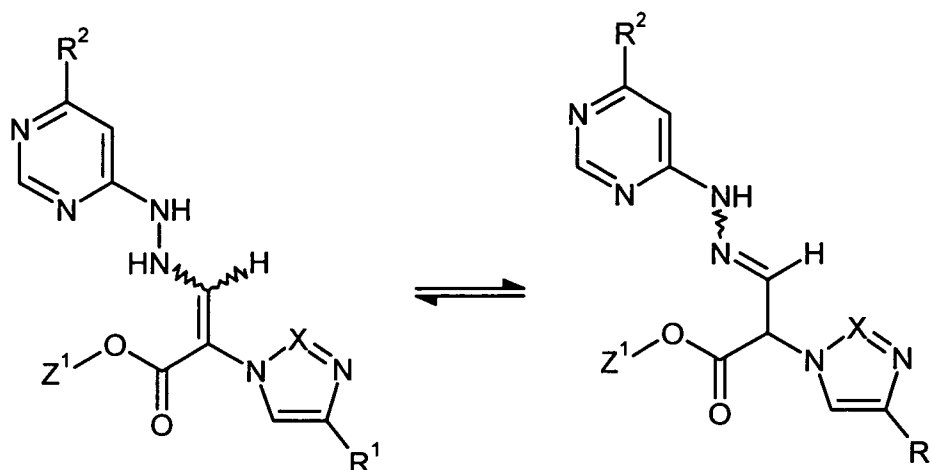
Z^1 代表甲基或乙基，

於惰性溶劑中，若適當時，於酸之存在下，與如下式化合物反應



其中 R^2 如上述定義，

產生如下式化合物



(IV)，

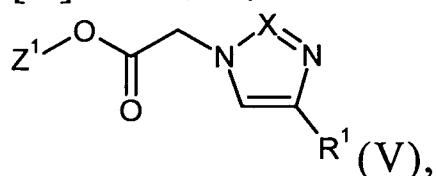
其中 Z^1 、 R^1 與 R^2 如上述定義，

其在此等反應條件下或於接續反應步驟中，於鹼之影響下，環化產生式(I)化合物，

且式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其鹽、其溶劑合物或其鹽之溶劑合物，

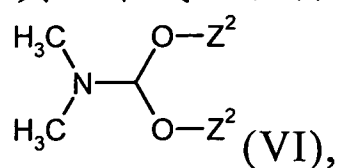
或

[B]由如下式化合物



其中 Z^1 與 R^1 如上述定義，

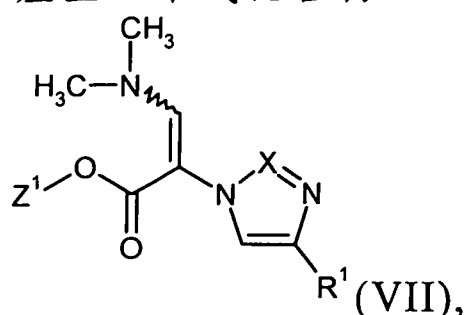
與如下式化合物縮合



其中

Z^2 代表甲基或乙基，

產生如下式化合物



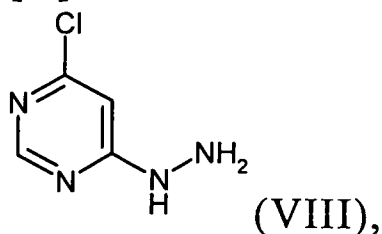
其中 Z^1 與 R^1 如上述定義，

然後於酸之存在下，與式(III)化合物反應，產生式(IV)化合物，其在此等反應條件下或於接續反應步驟中，於鹼之影響下，環化產生式(I)化合物

且式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其鹽、其溶劑合物或其鹽之溶劑合物，

或

[C]由如下式化合物



以水作為溶劑，於同爐反應中，先與如下式化合物反應 R^2-H (IX),

其中 R^2 如上述定義，

然後與式(VII)化合物反應，產生式(I)化合物，

該式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其鹽、其溶劑合物或其鹽之溶劑合物。

該鹽類之游離鹼可由化合物之鹽類或該化合物之鹽之溶劑合物與鹼反應製得。

合適鹼類為鹼金屬氫氧化物，如，例如：氫氧化鈉或氫氧化鉀，鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽，如：碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣或碳酸銨，或氨水溶液。

另一種製法中，鹽類之游離鹼可由例如：逆相管柱層析法，使用添加鹼之乙腈/水梯度，特定言之使用 RP18 Phenomenex Luna C18(2)管柱與作為鹼之二乙基胺製得。

本發明進一步提供一種製備式(I)化合物或其溶劑合物之方法，其中由化合物之鹽類或其鹽之溶劑合物與鹼反應或經添加鹼之層析法，轉化成該化合物。

其他根據本發明化合物亦可以上述製法得到之式(I)化合物為起始物，視需要由個別取代基(特定言之彼等列於 R^1 與 R^2 之取代基)之官能基轉化得到。此等轉化法係依習此相關技藝之人士已知之傳統方式進行，且包括例如，如：親核性或親電子性取代反應、氧化反應、還原反應、氫化反應、過渡金屬催化之偶合反應、烷化反應、醯化反應、胺化反應、酯化反應、酯裂解反應、醚化反應、醚裂解反應、形成羧醯胺、磺醯胺、胺甲酸酯與脲類之反應，並引入及排除暫時性之保護基。

適合製法步驟 (II)+(III)→(IV)、(VII)+(III)→(IV) 與 (IV)→(I)之惰性溶劑特定言之為醚類，如：乙醚、甲基第三丁基醚、1,2-二甲氧乙烷、四氫呋喃與二噁烷，或醇類，如：甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇、正丁醇與第三丁醇，或水或溶劑之混合物或溶劑與水之混合物。較佳為甲醇、乙醇、四氫呋喃或水。

製法步驟(V)+(VI)→(VII)較佳係在二甲基甲醯胺溶劑中

或在過量(VI)之存在下，不使用其他溶劑下進行。若適當時，該反應亦可依有利方式，在微波照射下進行。該反應通常在 $+20^{\circ}\text{C}$ 至 $+150^{\circ}\text{C}$ 之溫度範圍進行，以 $+80^{\circ}\text{C}$ 至 $+120^{\circ}\text{C}$ 較佳[亦參見 J.P. Bazureau 等人之 *Synthesis* 1998, 967；如上述文獻，2001(4), 581]。

若適當時，製法步驟(II)+(III) $\rightarrow$ (IV)與(VII)+(III) $\rightarrow$ (IV)可依有利方式，在添加酸下進行。適合此目的之酸為無機或有機酸類，如，例如：鹽酸、乙酸、三氟乙酸、甲磺酸、對甲苯磺酸或樟腦-10-磺酸。較佳為使用乙酸，特定言之三氟乙酸或對甲苯磺酸。

反應(II)+(III) $\rightarrow$ (IV)通常在 0°C 至 $+100^{\circ}\text{C}$ 之溫度範圍內進行，較佳為 $+10^{\circ}\text{C}$ 至 $+50^{\circ}\text{C}$ 。反應(VII)+(III) $\rightarrow$ (IV)通常在 $+20^{\circ}\text{C}$ 至 $+120^{\circ}\text{C}$ 之溫度範圍內進行，較佳為 $+50^{\circ}\text{C}$ 至 $+100^{\circ}\text{C}$ 。

製法順序(II)+(III) $\rightarrow$ (IV) $\rightarrow$ (I)與(VII)+(III) $\rightarrow$ (IV) $\rightarrow$ (I)可依兩步驟反應或在同爐反應中進行，不需單離出中間物(IV)。尤其適合後者係由反應成份於微波照射下反應；此時該反應通常在 $+50^{\circ}\text{C}$ 至 $+200^{\circ}\text{C}$ 之溫度範圍內進行，較佳為 $+100^{\circ}\text{C}$ 至 $+180^{\circ}\text{C}$ 。

即使在製備(IV)期間，仍可能有部份環封合形成(I)；此時，若需要時，可於原位以鹼處理反應混合物，使其完全封合。

適合此等分開之環化步驟(IV) $\rightarrow$ (I)之鹼為常見之無機或有機鹼。特定言之，其包括鹼金屬氫氧化物，如，例如：氫氧化鈉或氫氧化鉀，鹼金屬碳酸鹽或鹼土金屬碳酸鹽，如：

碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鈣或碳酸銨，鹼金屬烷醇鹽，如：甲醇鈉或甲醇鉀、乙醇鈉或乙醇鉀或第三丁醇鈉或第三丁醇鉀，或鹼金屬氫化物，如：氫化鈉。較佳為使用甲醇鈉或乙醇鈉。

鹼誘發之反應(IV)→(I)通常在 0°C 至+60°C 之溫度範圍內，較佳在 0°C 至+30°C 下進行。

反應(VIII)+(IX)+(VII)→(I)通常每當量(VIII)使用 1.1 至 2.0 當量(IX)，若適當時，於 1.1 至 2.0 當量鹼之存在下進行。較佳為與 1.1 至 1.5 當量(IX)反應。

適合反應(VIII)+(IX)+(VII)→(I)之鹼為常見之無機或有機鹼。特定言之，其包括鹼金屬氫氧化物，如，例如：氫氧化鈉或氫氧化鉀，或胺鹼類，如，例如：*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺。較佳為 *N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺。

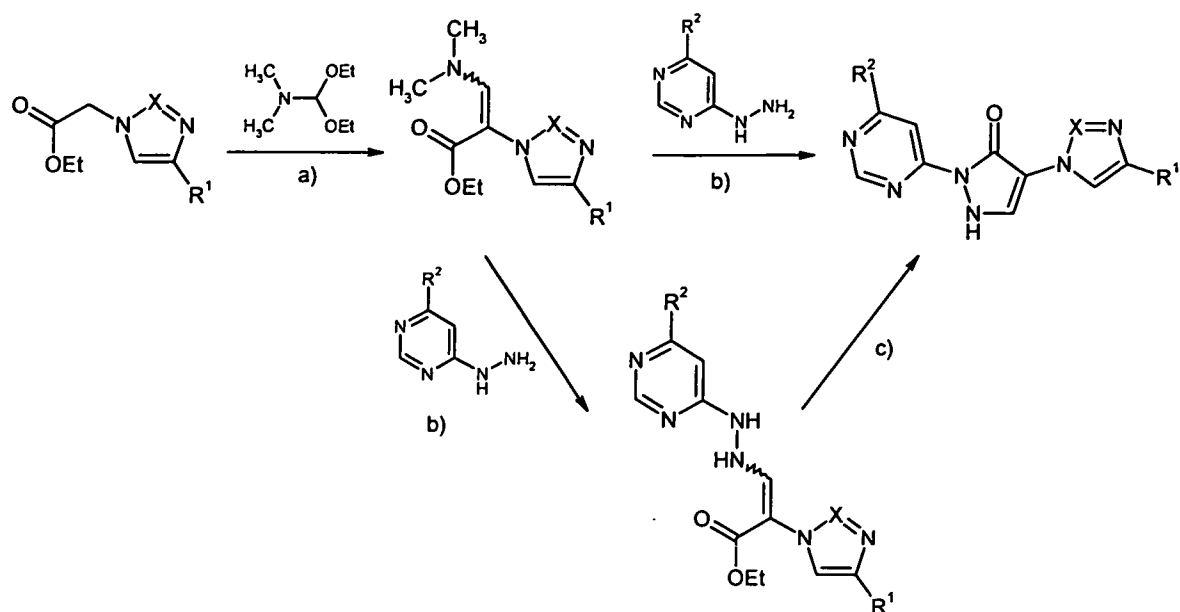
反應(VIII)+(IX)+(VII)→(I)通常在+20°C 至+100°C 之溫度範圍內，較佳在+70°C 至+100°C 下進行。

所有製法步驟均可在常壓、加壓或減壓(例如：0.5 至 5 巴)下進行。通常，該反應係在常壓下進行。

式(II)化合物可由式(V)化合物依文獻中常用於羧酸之 C-醯化反應之方法製備。式(III)、(V)、(VI)、(VIII)與(IX)化合物可自商品取得、自文獻中已知或可類似文獻中說明之方法製備。

根據本發明化合物製法說明於下列反應圖 2：

反應圖 2



[a) : DMF , 16 h , +100°C ; b) : 乙醇 , 三氟乙酸 , +78°C ; c) : NaOEt , 乙醇 , 1 h , RT] 。

根據本發明化合物展現未預期之有價值之醫藥作用範圍。

其因此適用為治療與/或預防人類及哺乳動物疾病之醫藥。

根據本發明化合物之特徵在於其為 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶之專一性抑制劑。

依據其藥理性質，根據本發明化合物可用於治療與/或預防心血管疾病，特定言之心臟功能不足、冠狀動脈疾病、狹心症、心肌梗塞、中風、動脈粥樣硬化、本態性、肺部與惡性高血壓及周邊動脈阻塞疾病。

根據本發明化合物亦適用於治療與/或預防血液形成病變，如，例如：自發性貧血、腎貧血及伴隨腫瘤疾病(特定言之因化療引起之貧血)、感染(特定言之 HIV 感染)或另一種炎

症，如，例如：類風濕關節炎出現之貧血。根據本發明化合物亦適合作為因失血、缺鐵性貧血、缺乏維生素性貧血(例如：因缺乏維生素 B12 或因缺乏葉酸所致)、發育不全性與成形不全性貧血或溶血性貧血所致貧血之支持療法，或作為因鐵利用性病變(鐵利用不能性貧血)所致貧血或因其他內分泌病變(例如：甲狀腺功能不足)所致貧血之支持療法。

該等化合物亦適合提高血球容積，以便在手術前得到可供自體輸血之血液。

根據本發明化合物亦可用於治療與/或預防與手術相關之絕血狀態及手術干預後之後遺症，特定言之採用心肺機之心臟干預手術(例如：繞道手術、心瓣膜植入)、頸動脈之干預手術、主動脈之干預手術及使用儀器打開或侵入頭蓋骨之干預手術。該等化合物亦適用在手術干預過程中之一般治療與/或預防，以加速傷口癒合及縮短康復時間。

該等化合物亦適用於治療與預防腦部之急性與延長時間絕血狀態(例如：中風、生產窒息)之後遺症。

該等化合物亦可用於治療與/或預防癌症，及治療與/或預防癌症治療過程中，特定言之在細胞抑制劑、抗生素與放射法治療之後所發生之健康受損狀態。

該等化合物亦適用於治療與/或預防風濕性疾病及與其他自體免疫疾病，特定言之治療與/或預防此等疾病之醫藥處理過程中所發生之健康受損狀態。

根據本發明化合物亦可用於治療與/或預防眼睛疾病(例如：青光眼)、腦部疾病(例如：巴金森氏症、阿茲海默氏症、癡呆症、慢性疼痛感知)、慢性腎臟疾病、腎臟功能不足

與急性腎臟衰竭，及供促進傷口癒合。

該等化合物亦適用於治療與/或預防全身虛弱至惡性病，特定言之常發生在較大年紀之老年人。

該等化合物亦適用於治療與/或預防性功能障礙。

該等化合物亦適用於治療與/或預防糖尿病與其後遺症，如，例如：糖尿病性大血管病變與微血管病變、糖尿病性腎病變與神經病變。

根據本發明化合物亦適用於治療與/或預防例如：心臟、肺與肝臟之纖維變性疾病。

特定言之，根據本發明化合物亦適用於預防與治療早產兒之視網膜病變(早產兒視網膜病變)。

本發明亦提供一種以根據本發明化合物於治療與/或預防疾病，特定言之上述疾病上之用途。

本發明亦提供一種以根據本發明化合物於製備醫藥，供治療與/或預防疾病，特定言之上述疾病上之用途。

本發明亦提供一種使用活性量之至少一種根據本發明化合物治療與/或預防疾病，特定言之上述疾病之方法。

根據本發明化合物本身即可使用，或若需要時，可與其他活性化合物組合使用。本發明亦提供一種醫藥，其包含至少一種根據本發明化合物與一種或多種其他活性化合物，特定言之治療與/或預防上述疾病之活性化合物。用於組合之合適活性化合物較佳可述及例如：ACE 抑制劑、血管收縮素 II 受體拮抗劑、 β 受體阻斷劑、鈣拮抗劑、PDE 抑制劑、礦物皮質激素受體拮抗劑、利尿劑、阿斯匹靈、鐵補充劑、維生素 B12 與葉酸補充劑、斯塔汀抑制素(statins)、毛地黃(毛地

黃毒苷)衍生物，腫瘤化療劑與抗生素。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與 ACE 抑制劑組合投藥，如，例如：較佳為依拉普利(enalapril)、卡托普利(captopril)、賴諾普利(lisinopril)、雷米普利(ramipril)、地拉普利(delapril)、福辛普利(fosinopril)、奎諾普利(quinopril)、培哚普利拉(perindopril)或泉多普利(trandopril)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與血管收縮素 AII 拮抗劑組合投藥，如，例如：較佳為樂斯坦(losartan)、甘斯坦(candesartan)、凡斯坦(valsartan)、特斯坦(telmisartan)或安斯坦(embusartan)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與 β 受體阻斷劑組合投藥，如，例如：較佳為普萘洛爾(propranolol)、阿替洛爾(atenolol)、添慕寧(timolol)、頻脈樂(pindolol)、阿普洛爾(alprenolol)、氧烯洛爾(oxprenolol)、戊丁特洛(penbutolol)、布拉洛爾(bupranolol)、美替洛爾(metipranolol)、奈丁樂(nadolol)、甲哌洛爾(mepindolol)、卡拉洛爾(carazalol)、索他洛爾(sotalol)、美托洛爾(metoprolol)、倍他洛爾(betaxolol)、噻利洛爾(celiprolol)、比索洛爾(bisoprolol)、卡替洛爾(carteolol)、艾司洛爾(esmolol)、拉貝洛爾(labetalol)、卡維地洛(carvedilol)、阿達洛爾(adaprolol)、蘭地洛爾(landiolol)、奈必洛爾(nebivolol)、益派洛爾(epanolol)或布新洛爾(bucindolol)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與鈣拮

抗劑組合投藥，如，例如：較佳為硝苯地平(nifedipine)、安莫地平(amlopidine)、維拉帕米(verapamil)或地爾硫卓(diltiazem)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與磷酸二酯酶(PDE)抑制劑組合投藥，如，例如：較佳為米力農(milrinone)、氨利酮(amrinone)、匹莫苯丹(pimobendan)、西洛他唑(cilostazol)、昔多芬(sildenafil)、伐地那非(vardenafil)或他達那非(tadalafil)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與礦物皮質激素受體拮抗劑組合投藥，如，例如：較佳為螺內酯(spironolactone)、依普利酮(eplerenone)、坎利酮(canrenone)或坎利酮鉀鹽。

本發明具體實施例中，根據本發明化合物係與利尿劑組合投藥，如，例如：較佳為樂泄錠(furosemide)、布美他尼(bumetanide)、托拉塞米(torsemide)、苄氟噻嗪(bendroflumethiazide)、氯磺噻(chlorthiazide)、氫氯噻嗪(hydrochlorthiazide)、氫氟噻嗪(hydroflumethiazide)、甲氯噻嗪(methyclothiazide)、泊利噻嗪(polythiazide)、三氯噻嗪(trichlormethiazide)、氯噻酮(chlorthalidone)、吲達帕胺(indapamide)、美托拉肫(metolazone)、喹乙松(quinethazone)、乙醯唑胺(acetazolamide)、二氯苯磺(dichlorphenamide)、甲醋唑胺(methazolamide)、甘油、異山梨醇(isosorbide)、甘露糖醇、阿米洛利(amiloride)或氮苯蝶啶(triamterene)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與選自

斯塔汀抑制素類之 HMG-CoA 還原酶抑制劑組合投藥，如，例如：較佳為洛伐他汀(lovastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、普伐他汀(pravastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、阿伐他汀(atorvastatin)、羅蘇伐他汀(rosuvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)或匹伐他汀(pitavastatin)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與腫瘤化療劑組合投藥，例如：較佳為選自下列各物組成之群中：鉑錯合物如，例如：順鉑 (cisplatin)與卡鉑(carboplatin)，烷化劑如，例如：環磷醯胺與氯氮芥(chlorambucil)、抗代謝物如，例如：5-氟尿嘧啶與胺甲蝶呤，拓撲異構酶抑制劑，如，例如：依托泊苷(etoposide)與喜樹鹼(camptothecin)，抗生素如，例如：阿黴素(oxorubicin)與柔紅霉素(daunorubicin)，或激酶抑制劑，如，例如：蕾莎瓦(sorafenib)與舒尼替尼(sunitinib)。

本發明較佳具體實施例中，根據本發明化合物係與抗生素組合投藥，例如：較佳為選自下列各物組成之群中：盤尼西靈、頭孢素或喹啉酮類，如，例如：環丙沙星(ciprofloxacin)與莫西沙星(moxifloxacin)。

本發明亦提供一種醫藥，其包含至少一種根據本發明化合物，通常共同使用一種或多種惰性無毒之醫藥上適合之輔劑物質，並提供其於上述目的上之用途。

根據本發明化合物具有全身性與/或局部性作用。其可依適合此等目的之方式投藥，如，例如：經口、非經腸式、經肺、鼻、舌下、舌、頰、直腸、皮膚、穿皮式、結膜、耳或作為植入物或人工支架。

根據本發明化合物可呈適合此等投藥途徑之投藥型式投藥。

具有根據先前技藝功能，可快速釋放及/或以經過修飾之方式釋放根據本發明化合物且包含根據本發明化合物之結晶與/或非晶型與/或溶解型之投藥型式適合經口投藥，如，例如：錠劑(未包衣或包衣錠劑，例如：抗拒胃液或以延緩方式溶解或不溶解且控制釋放根據本發明化合物之包衣)、可於口腔中快速崩解之錠劑或膜衣/扁圓錠(oblates)、膜衣/冷凍乾燥物或膠囊(例如：硬式或軟式明膠囊)、糖衣錠、粒劑、丸劑、粉劑、乳液、懸浮液、氣霧劑或溶液。

非經腸式投藥法可繞過吸收步驟進行(例如：經靜脈內、經動脈內、經心臟、經脊柱或經腰內)或包括吸收過程進行(例如：經肌內、皮下、皮內、經皮膚或腹膜內)，適合非經腸式投藥型式特別呈溶液、懸浮液、乳液、冷凍乾燥物或無菌粉末之注射與輸液調配物。

其他適合之投藥途徑為例如：吸入性醫藥型式(特別指吸入性粉劑、噴霧劑)、鼻滴液、溶液或噴灑液、供舌、舌下或頰內投藥用之錠劑、膜衣/扁圓錠或膠囊、栓劑、耳或眼用製劑、陰道用膠囊、水性懸浮液(洗液、搖溶混合物)、親脂性懸浮液、油膏、乳霜、穿皮式醫療系統(例如：貼布)、乳劑、糊劑、發泡劑、起泡性粉劑、植入物或人工支架。

以經口與非經腸式投藥法較佳。特定言之經口與經靜脈內投藥法。

根據本發明化合物可轉化成上述投藥型式。其可依本身已知方式，與惰性無毒之醫藥上合適之輔劑物質混合。此等

輔劑物質特別包括載劑物質(例如：微晶纖維素、乳糖、甘露糖醇)、溶劑(例如：液態聚乙二醇)、乳化劑與勻散劑或濕化劑(例如：十二烷基硫酸鈉、聚氧山梨糖醇酐油酸酯)、結合劑(例如：聚乙烯吡咯烷酮)、合成性與天然聚合物(例如：白蛋白)、安定劑(例如：抗氧化劑，如，例如：抗壞血酸)、染料(例如：無機色素，如，例如：氧化鐵)與香料與/或矯味劑。

通常，已證明有利之非經腸式投藥劑量為約 0.001 至 1 mg/kg，較佳為約 0.01 至 0.5 mg/kg 體重即可達到有效結果。若經口投藥時，其劑量為約 0.01 至 100 mg/kg，較佳為約 0.01 至 20 mg/kg 與極特別佳為 0.1 至 10 mg/kg 體重。

但可能有必要偏離上述劑量，特定言之需隨體重、投藥途徑、個體對活性化合物之反應、調配物之性質及投藥之時間點或間隔而定。有時候低於上述劑量可能即已足夠，而其他時候可能需要超過上述最高限值。若投與相當大量時，建議在一天內分成幾個小劑量投藥。

【實施方式】

下列具體實施例說明本發明。本發明不受此等實例限制。

下列試驗與實例中之百分比係重量百分比，除非另有說明；份量數為重量份數。液體/液體溶液之溶劑比例、稀釋比例與濃度數據分別以體積計。

A. 實例

縮寫：

aq.	水溶液
cat.	催化性
d	天數
DCI	直接化學離子化(用於 MS)
DMF	二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞砜
EI	電子撞擊離子化(用於 MS)
ESI	電噴灑離子化(用於 MS)
Et	乙基
GC-MS	氣相層析法偶聯質譜儀
h	小時
HPLC	高壓高效液相層析法
conc.	濃縮
LC-MS	液相層析法偶聯質譜儀
Meth.	方法
min	分鐘
MS	質譜
NMR	核磁共振光譜
R _t	滯留時間(用於 HPLC)
RT	室溫
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃

LC-MS、GC-MS 與 HPLC 方法：

方法 1(LC-MS)：儀器：附 HPLC Agilent 系列 1100 之 Micromass Platform LCZ；管柱：Thermo Hypersil GOLD 3 μ ，20 mm x 4 mm；移動相 A：1 升水 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸，移動相 B：1 升乙腈 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸；梯度：0.0 min 100% A $\rightarrow$ 0.2 min 100% A $\rightarrow$ 2.9 min 30% A $\rightarrow$ 3.1 min 10% A $\rightarrow$ 5.5 min 10% A；烘箱：50°C；流速：0.8 ml/min；UV 檢測：210 nm。

方法 2(LC-MS)：MS 型儀器：Micromass ZQ；儀器機型 HPLC：Waters Alliance 2795；管柱：Phenomenex Synergi 2 μ Hydro-RP Mercury 20 mm x 4 mm；移動相 A：1 升水 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸，移動相 B：1 升乙腈 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸；梯度：0.0 min 90% A $\rightarrow$ 2.5 min 30% A $\rightarrow$ 3.0 min 5% A $\rightarrow$ 4.5 min 5% A；流速：0.0 min 1 ml/min $\rightarrow$ 2.5 min/3.0 min/4.5 min 2 ml/min；烘箱：50°C；UV 檢測：210 nm。

方法	3(LC-MS)：儀器機型	MS：Micromass
ZQ；儀器機型	HPLC：Waters	Alliance
2795；管柱：Phenomenex	Synergi 2.5 μ	MAX-RP 100A
Mercury 20 mm x 4 mm；移動相 A：1 升水 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸，移動相 B：1 升乙腈 + 0.5 毫升濃度 50% 之甲酸；梯度：0.0 min 90% A $\rightarrow$ 0.1 min 90% A $\rightarrow$ 3.0 min 5% A $\rightarrow$ 4.0 min 5% A $\rightarrow$ 4.01 min 90% A；流速：2 ml/min；烘箱：50°C；UV 檢測：210 nm。		

方法 4(LC-MS)：儀器：附 HPLC Agilent 系列 1100 之

Micromass Quattro Micro MS ; 管柱 : Thermo Hypersil GOLD 3 μ 20 mm x 4 mm ; 移動相 A : 1 升水 + 0.5 毫升濃度 50%之甲酸 , 移動相 B : 1 升 乙腈 + 0.5 毫升濃度 50%之甲酸 ; 梯度 : 0.0 min 100% A $\rightarrow$ 3.0 min 10% A $\rightarrow$ 4.0 min 10% A $\rightarrow$ 4.01 min 100% A(流速 2.5 ml/min) $\rightarrow$ 5.00 min 100% A ; 烘箱 : 50°C ; 流速 : 2 ml/min ; UV 檢測 : 210 nm 。

方法 5(LC-MS) : 儀器 : 附 Waters UPLC Acquity 之 Micromass QuattroPremier ; 管柱 : Thermo Hypersil GOLD 1.9 μ 50 mm x 1 mm ; 移動相 A : 1 升水 + 0.5 毫升濃度 50%之甲酸 , 移動相 B : 1 升 乙腈 + 0.5 毫升濃度 50%之甲酸 ; 梯度 : 0.0 min 90% A $\rightarrow$ 0.1 min 90% A $\rightarrow$ 1.5 min 10% A $\rightarrow$ 2.2 min 10% A ; 流速 : 0.33 ml/min ; 烘箱 : 50°C ; UV 檢測 : 210 nm 。

方法 6(HPLC) : 儀器 : 附 DAD 檢測之 HP 1100 ; 管柱 : Kromasil 100 RP-18 , 60 mm x 2.1 mm , 3.5 μ m ; 移動相 A : 5 毫升過氯酸(濃度 70%)/升水 , 移動相 B : 乙腈 ; 梯度 : 0 min 2% B $\rightarrow$ 0.5 min 2% B $\rightarrow$ 4.5 min 90% B $\rightarrow$ 6.5 min 90% B $\rightarrow$ 6.7 min 2% B $\rightarrow$ 7.5 min 2% B ; 流速 : 0.75 ml/min ; 管柱溫度 : 30°C ; UV 檢測 : 210 nm 。

方法 7(GC-MS) : 儀器 : Micromass GCT , GC6890 ; 管柱 : Restek RTX-35 , 15 m x 200 μ m x 0.33 μ m ; 恆定氦氣流 : 0.88 ml/min ; 烘箱 : 70°C ; 入口 : 250°C ; 梯度 : 70°C , 30°C/min $\rightarrow$ 310°C(保持 3 min) 。

方法 8(製備性 HPLC) : 管柱 : Kromasil 100 C18 5

μm ，250 mm x 20 mm；移動相 A：Milli-Q 水，移動相 B：濃度 0.1%之三氟乙酸水溶液，移動相 C：乙腈；梯度：0.0 min 76% A，5% B，19% C $\rightarrow$ 15 min 4% A，95% B，1% C $\rightarrow$ 15.1 min 76% A，5% B，19% C $\rightarrow$ 20 min 76% A，5% B，19% C；烘箱：40°C；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

方法 9(製備性 HPLC)：管柱：Sunfire C18 5 μm ，19 mm x 150 mm；移動相 A：濃度 0.2%之三氟乙酸水溶液，移動相 B：乙腈；梯度：0.0 min 95% A $\rightarrow$ 8 min 50% A $\rightarrow$ 8.01 min 95% A $\rightarrow$ 12 min 95% A；RT；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

方法 10(製備性 HPLC)：管柱：Sunfire C18 5 μm ，19 mm x 150 mm；移動相 A：濃度 0.2%之三氟乙酸水溶液，移動相 B：乙腈；0 min 90% A $\rightarrow$ 13 min 90% A；烘箱：40°C；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

方法 11(製備性 HPLC)：管柱：XBridge C18 5 μm ，19 mm x 150 mm；移動相 A：濃度 0.2%之甲酸水溶液，移動相 B：乙腈；0 min 75% A $\rightarrow$ 6 min 75% A；RT；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

方法 12(製備性 HPLC)：管柱：XBridge C18 5 μm ，19 mm x 150 mm；移動相 A：濃度 0.2%之甲酸水溶液，移動相 B：乙腈；0 min 93% A $\rightarrow$ 4 min 93% A；RT；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

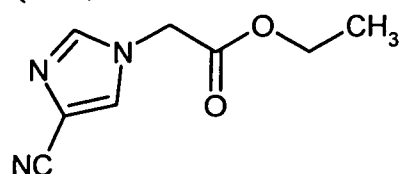
方法 13(製備性 HPLC)：管柱：XBridge C18 5 μm ，19 mm x 150 mm；移動相 A：濃度 0.2%之三氟乙酸水溶液，移

動相 B：乙腈；0 min 90% A → 12 min 90% A；烘箱：40°C；流速：25 ml/min；UV 檢測：210 nm。

起始物

實例 1A

(4-氰基-1*H*-咪唑-1-基)乙酸乙酯



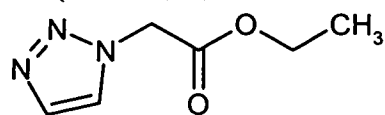
先添加 3.3 g (35.3 mmol) 1*H*-咪唑-4-甲腈 [Matthews 等人之 *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3228-3231] 至 13.2 ml (11.5 g, 35.3 mmol) 濃度 21% 乙醇鈉之乙醇溶液中，添加 4.3 ml (6.5 g, 38.9 mmol) 溴乙酸乙酯。於室溫下攪拌反應混合物 16 小時。操作時，濾出沉澱固體，濾出之殘質經乙醇洗滌，濾液減壓濃縮。添加二異丙基醚至殘質中，再次過濾混合物，濾液再次於旋轉蒸發器中濃縮，殘質減壓乾燥。產量：3.8 g (理論值之 60%)

LC-MS (方法 1)： $R_t = 1.17$ min；MS (ESIpos)： $m/z = 180$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.12$ (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.18 (q, 2H), 1.22 (t, 3H)。

實例 2A

2-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)乙酸乙酯



慢慢添加 129.2 g (5.6 mmol) 鈉至 4.0 升乙醇中。添加

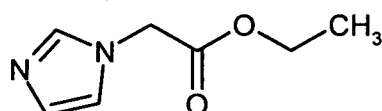
400.0 g(5.6 mol)1,2,3-*1H*-三唑，於內溫 20-25°C 下滴加 623 ml(938.2 g, 5.6 mol)溴乙酸乙酯。於室溫下攪拌混合物 48 小時。濾出沉澱固體，減壓排除乙醇，再次過濾混合物。殘質溶於乙酸乙酯，過濾，再次減壓濃縮，經 30 cm 管柱蒸餾純化。於槽溫 140°C，塔頂溫度 60-115°C 與壓力 1 毫巴下得到產物。產量：440.0 g(理論值之 50%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 1.58$ min；

LC-MS(方法 1)： $R_t = 0.71$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 156$ $[M+H]^+$ 。

實例 3A

1*H*-咪唑-1-基乙酸乙酯

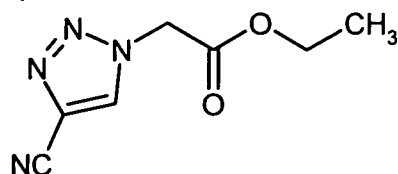


慢慢添加 118.2 g(5.1 mmol)鈉至 2.5 升乙醇中。於內溫 20-25°C 下滴加 350.0 g(5.1 mol)咪唑與 570 ml(858.6 g, 5.1 mol)溴乙酸乙酯。於室溫下攪拌混合物 24 小時。濾出沉澱固體，減壓排除乙醇，再次過濾混合物。殘質經矽膠管柱層析法純化(移動相：乙酸乙酯)。產量：639.0 g(理論值之 81%)

GC-MS(方法 7)： $R_t = 4.55$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 155$ $[M+H]^+$ 。

實例 4A

(4-氰基-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)乙酸乙酯



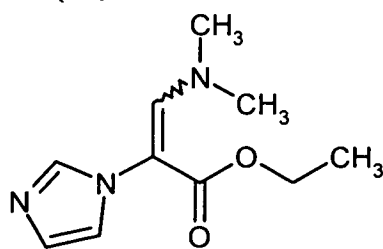
取 4.1 g(31.9 mmol) 疊氮基乙酸乙酯與 2.8 g(31.9 mmol) 2-氯丙醯腈於 32 ml 水中，於槽溫 80°C 下攪拌 16 小時。冷卻至室溫後，溶液經 1 N 鹽酸酸化，以乙酸乙酯萃取。有機相經硫酸鈉脫水，過濾與減壓濃縮。添加 50 ml 乙醇與 10 滴濃硫酸至殘質中，於回流下攪拌混合物 16 小時。操作時，反應混合物減壓濃縮，添加乙酸乙酯至殘質中，懸浮液經半濃縮之碳酸氫鈉溶液洗滌，有機相經硫酸鈉脫水。於旋轉蒸發器上完全排除溶劑，固體減壓乾燥。產量：1.5 g(理論值之 25%)

LC-MS(方法 3)： $R_t = 0.96$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 181$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.06$ (s, 1H), 5.57(s, 2H), 4.19(q, 2H), 1.22(t, 3H)。

實例 5A

3-(*N,N*-二甲基胺基)-2-(1*H*-咪唑-1-基)丙烯酸乙酯



取 38.0 g(244.9 mmol)來自實例 3A 之化合物於 126 ml(108.1 g, 734.7 mmol) *N,N*-二甲基甲醯胺二乙基縮醛中，於槽溫 90°C 下攪拌 16 小時。冷卻後，混合物減壓濃縮，殘質與二異丙基醚攪拌，濾出固體，最後以二異丙基醚洗滌。產量：49.0 g(理論值之 95%)

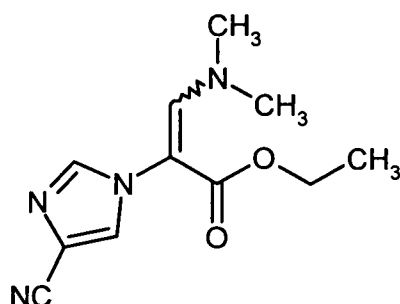
LC-MS(方法 2)： $R_t = 2.42$ min；MS(ESIpos)： $m/z =$

211 $[M+H]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : δ = 7.52(s, 1H), 7.49(s, 1H), 7.05(s, 1H), 6.91(s, 1H), 4.02(q, 2H), 2.63(br. s, 6H), 1.12(t, 3H)。

實例 6A

3-(*N,N*-二甲基胺基)-2-(4-氰基-1*H*-咪唑-1-基)丙烯酸乙酯



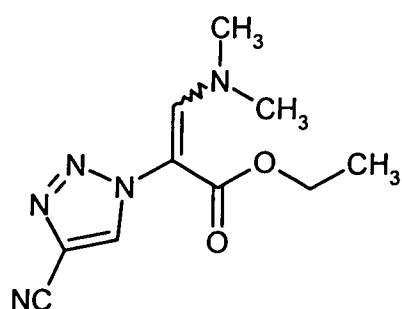
取 3.8 g(21.4 mmol)來自實例 1A 之化合物與 7.4 ml(6.3 g, 42.8 mmol)*N,N*-二甲基甲醯胺二乙基縮醛於槽溫 100°C 下攪拌 16 小時。操作時，冷卻之反應溶液於旋轉蒸發器中濃縮，殘質減壓乾燥。產量：5.0 g(純度 73%，理論值之 73%)

LC-MS(方法 1) : R_t = 2.69 min ; MS(ESIpos) : m/z = 235 $[M+H]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : δ = 8.13(s, 1H), 7.85(s, 1H), 7.58(s, 1H), 4.03(q, 2H), 2.69(br. s, 6H), 1.12(t, 3H)。

實例 7A

3-(二甲基胺基)-2-(4-氰基-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)丙烯酸乙酯



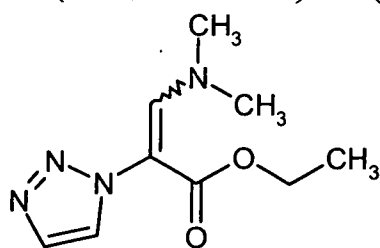
取 1.3 g(7.5 mmol)來自實例 4A 之化合物與 1.4 ml(1.2 g, 8.2 mmol)*N,N*-二甲基甲醯胺二乙基縮醛於槽溫 100°C 下攪拌 16 小時。操作時，冷卻之反應溶液於旋轉蒸發器中濃縮，殘質減壓乾燥。產量：1.5 g(理論值之 86%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.55$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 236$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.14$ (s, 1H), 7.75(s, 1H), 4.04(q, 2H), 3.15(br. s, 3H), 2.18(br. s, 3H), 1.13(t, 3H)。

實例 8A

3-(二甲基胺基)-2-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)丙烯酸乙酯



添加 44.2 ml(38.0 g, 257.8 mmol)*N,N*-二甲基甲醯胺二乙基縮醛至 20.0 g(128.9 mmol)來自實例 2A 之化合物中，混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。冷卻至室溫後，反應混合物減壓濃縮。殘質與乙醚磨製，濾出，以乙醚洗滌。產量：18.0 g(理論值之 67%)

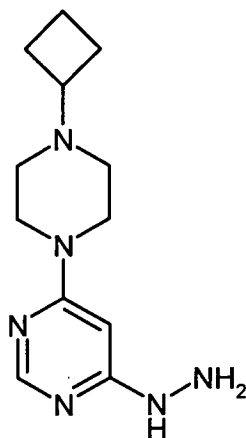
LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.20$ min；MS(ESIpos)： $m/z =$

211 $[M+H]^+$ 。

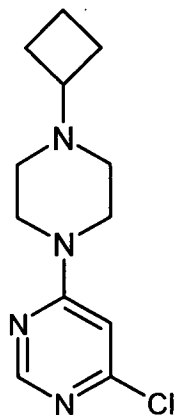
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : δ = 8.10(d, 1H), 7.78(d, 1H), 7.65(s, 1H), 4.03(q, 2H), 3.06(br. s, 3H), 2.10(br. s, 3H), 1.12(t, 3H)。

實例 9A

4-(4-環丁基哌啶-1-基)-6-胍基嘧啶



步驟 a) : 4-氯-6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶



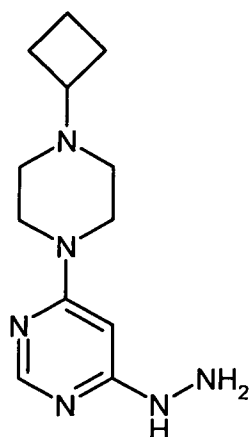
先添加 1.8 g(8.4 mmol)1-環丁基哌啶二鹽酸鹽(Zaragoza 等人之 *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2833)至 18 ml 水中，添加 2.9 ml(2.1 g, 16.9 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺。於室溫下攪拌混合物 30 min，添加 1.3 g(8.4 mmol)4,6-二氯嘧啶。反應混合物於 115°C 下攪拌 1 小時，冷卻至室溫，添加 25 毫升乙酸乙酯，以 25 毫升飽和碳酸氫鈉水溶液萃取混合

物。分離有機相，經硫酸鈉脫水，過濾與減壓濃縮。粗產物經矽膠管柱層析法純化(移動相：二氯甲烷/甲醇 100/3)。產量：1.9 g(理論值之 89%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 2.79$ min；MS(DCI)： $m/z = 254$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)： $\delta = 8.32(\text{s}, 1\text{H})$, $6.95(\text{s}, 1\text{H})$, $3.65\text{--}3.58(\text{m}, 4\text{H})$, $2.70(\text{quintet}, 1\text{H})$, $2.27(\text{t}, 4\text{H})$, $2.00\text{--}1.93(\text{m}, 2\text{H})$, $1.87\text{--}1.75(\text{m}, 2\text{H})$, $1.67\text{--}1.55(\text{m}, 2\text{H})$ 。

步驟 b)：4-(4-環丁基哌啶-1-基)-6-胥基嘧啶



於室溫下，攪拌滴加 4.4 ml(4.5 g, 89.7 mmol)胥水合物至含 1.9 g(7.5 mmol)4-氯-6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶之 28 ml 乙醇溶液中。反應溶液於 80°C 下攪拌 16 小時，操作時，混合物減壓濃縮。殘質與乙醚重覆磨製，濾出沉澱固體，減壓乾燥。殘質再經矽膠管柱層析法純化(移動相二氯甲烷/甲醇 10/2)。產量：1.5 g(理論值之 80%)

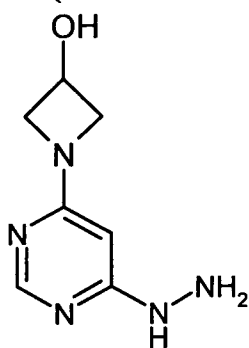
LC-MS(方法 6)： $R_t = 1.36$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 249$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)： $\delta = 7.92(\text{s}, 1\text{H})$, $7.63(\text{s},$

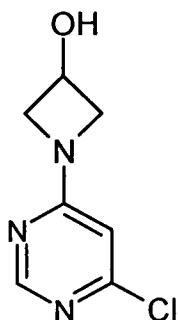
1H), 5.90(NH), 4.09(s, NH₂), 3.45(t, 4H), 2.69(quintet, 1H), 2.26(t, 4H), 2.00-1.93(m, 2H), 1.82-1.75(m, 2H), 1.67-1.60(m, 2H)。

實例 10A

1-(6-胍基嘧啶-4-基)氮雜環丁烷-3-醇



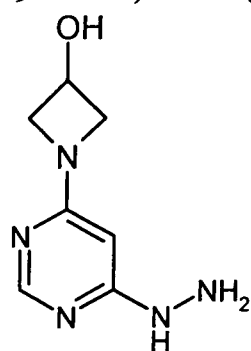
步驟 a) : 1-(6-氯嘧啶-4-基)氮雜環丁烷-3-醇



取 7.3 g(48.7 mmol)4,6-二氯嘧啶懸浮於 140 ml 水中，添加 47 ml 1 N 氫氧化鈉水溶液。添加 5.3 g(48.7 mmol)3-羥基氮雜環丁烷，反應混合物於 90°C 下攪拌 3 天。冷卻至室溫後，反應混合物減壓濃縮，其未再純化即繼續反應。

LC-MS(方法 5) : R_t = 0.36 min ; MS(ESIpos) : m/z = 1.87 [M+H]⁺。

步驟 b) : 1-(6-胍基嘧啶-4-基)氮雜環丁烷-3-醇

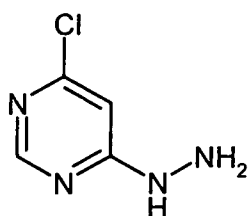


於室溫下，攪拌滴加 27.2 ml(27.9 g, 279.1 mmol)胍水合物至含 10.4 g(55.8 mmol)1-(6-氯嘧啶-4-基)氮雜環丁烷-3-醇之 100 ml 乙醇溶液中。反應溶液於 80°C 下攪拌 16 小時，操作時，混合物減壓濃縮，濾出沉澱，以各 10 ml 乙醇洗滌 2 次。產量：2.0 g(理論值之 19%)

LC-MS(方法 1)： $R_t = 2.06$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 194$ $[M+H]^+$ 。

實例 11A

4-氯-6-胍基嘧啶



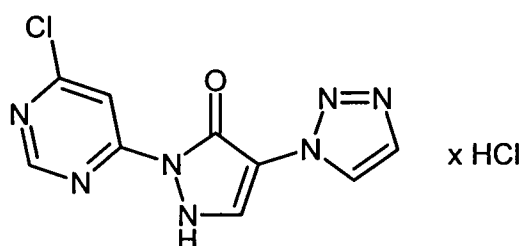
於室溫下，攪拌滴加 11.8 ml(12.1 g, 241.6 mmol)胍水合物至含 20.0 g(134.3 mmol)4,6-二氯嘧啶之 300 ml 乙醇溶液中。若在定量添加胍水合物期間溶液轉呈渾濁時，則再添加乙醇(約 400 ml)。於室溫下攪拌反應溶液 12 小時，操作時，濾出沉澱固體，濾出之殘質經各 150 ml 水洗滌 2 次，經各 100 毫升乙醚洗滌 2 次，產物減壓乾燥。由濃縮之母液進一步得到結晶產物。產量：16.8 g(理論值之 87%)

LC-MS(方法 1) : $R_t = 1.17$ min ; MS(ESIpos) : $m/z = 145$ $[M+H]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : $\delta = 8.81(\text{s}, 1\text{H})$, $8.17(\text{br. s}, 1\text{H})$, $6.75(\text{s}, 1\text{H})$, $4.48(\text{br. s}, 2\text{H})$ 。

實例 12A

2-(6-氯嘧啶-4-基)-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮鹽酸鹽



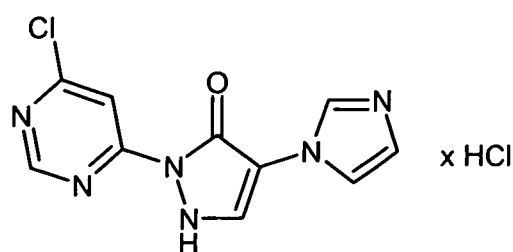
先添加 10.0 g(47.7 mmol)來自實例 8A 之化合物與 8.3 g(57.1 mmol)來自實例 11A 之化合物至 100 ml 乙醇中，添加 1.5 ml(2.2 g, 19.0 mmol)三氟乙酸。於回流下攪拌混合物 12 小時。然後添加過量 4 M 鹽酸之二噁烷溶液至冷卻之反應混合物中，攪拌混合物約 1 小時，濾出沉澱固體，濾出之殘質經二噁烷與乙醇洗滌。取依此方式得到之中間物溶於 150 ml 乙醇中，添加 50 ml 濃度 25%之甲醇鈉之甲醇溶液，於室溫下攪拌混合物 2 小時。使用 1 N 鹽酸調整反應混合物至 $\text{pH} = 5$ ，再於室溫下攪拌 2 小時，濾出固體，濾出之殘質經乙醇洗滌，產物減壓乾燥。產量：7.0 g(理論值之 49%)

LC-MS(方法 5) : $R_t = 1.20$ min ; MS(ESIpos) : $m/z = 264$ $[M+H]^+$ 。

實例 13A

2-(6-氯嘧啶-4-基)-4-(1*H*-咪唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-

3-酮鹽酸鹽



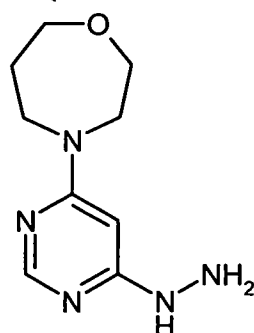
先添加 10.0 g(47.8 mmol)來自實例 5A 之化合物與 8.3 g(57.3 mmol)來自實例 11A 之化合物至 100 ml 乙醇中，添加 1.5 ml(2.2 g, 19.0 mmol)三氟乙酸。於回流下攪拌混合物 12 小時。濾出沉澱之結晶，濾出之殘質經乙醇洗滌，取中間物減壓乾燥一夜。取中間物懸浮於 20 ml 甲醇中，添加 100 ml 4 M 鹽酸之二噁烷溶液，於室溫下攪拌混合物反應 1 小時。濾出固體，濾出之殘質經二噁烷、乙酸乙酯與二異丙醚洗滌，產物減壓乾燥。產量：4.6 g(理論值之 32%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 2.81$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 263$ $[M+H]^+$ ；

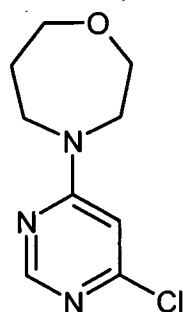
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)： $\delta = 9.46(\text{s}, 1\text{H})$, $8.96(\text{s}, 1\text{H})$, $8.56(\text{s}, 1\text{H})$, $8.51(\text{d}, 1\text{H})$, $8.07\text{-}8.04(\text{m}, 1\text{H})$, $7.85\text{-}7.82(\text{m}, 1\text{H})$ 。

實例 14A

4-(6-胍基嘧啶-4-基)-1,4-氧氮雜環庚烷



步驟 a) : 4-(6-氯嘧啶-4-基)-1,4-氧氮雜環庚烷

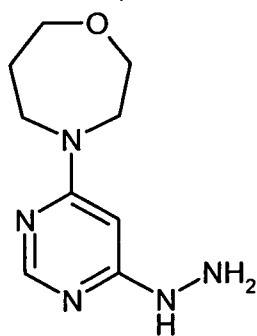


取含 3.0 g(20.1 mmol)4,6-二氯嘧啶、2.8 g(20.1 mmol)1,4-氧氮雜環庚烷鹽酸鹽與 6.4 g(60.4 mmol)碳酸鈉之 45 ml 水之混合物於回流下攪拌 16 小時。冷卻至室溫後，以乙酸乙酯萃取反應混合物。有機相經飽和氯化鈉溶液洗滌，經硫酸鈉脫水與過濾。濾液於減壓下濃縮至乾。得到油狀產物。產量：3.9 g(理論值之 86%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.32$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 214$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.33$ (s, 1H), 6.86(s, 1H), 3.99-3.52(m, 8H), 1.84(m, 2H)。

步驟 b) : 4-(6-胍基嘧啶-4-基)-1,4-氧氮雜環庚烷



於室溫下，攪拌滴加 8.8 ml(9.0 g, 180.2 mmol)胍水合物至含 3.9 g(18.0 mmol)4-(6-氯嘧啶-4-基)-1,4-氧氮雜環庚烷之 25 ml 乙醇溶液中。於 80°C 下攪拌 16 小時後，反應溶液減壓濃縮。殘質與冷乙醇磨製，濾出沉澱固體，濾出之殘質經

25 ml 乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：1.4 g(理論值之 36%)

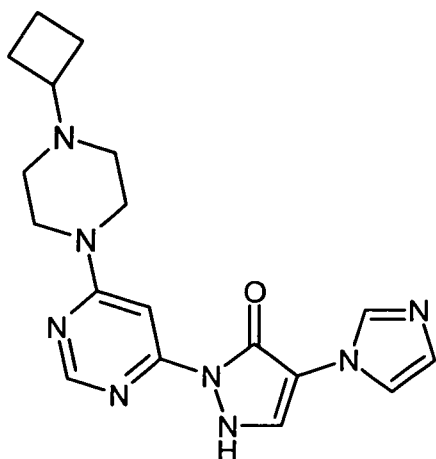
HPLC(方法 11)： $R_t = 2.48$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 210$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 7.91(\text{s}, 1\text{H})$, $7.56(\text{br. s}, 1\text{H})$, $5.81(\text{s}, 1\text{H})$, $4.12(\text{br. s}, 2\text{H})$, $3.75\text{--}3.55(\text{m}, 8\text{H})$, $1.85(\text{quintet}, 2\text{H})$ 。

操作實例

實例 1

2-[6-(4-環丁基哌咻-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-咪唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



添加 16 μl (23 mg, 0.2 mmol)三氟乙酸至含 211 mg(1.0 mmol)來自實例 5A 之化合物與 250 mg(1.0 mmol)來自實例 9A 之化合物之 4 ml 乙酸乙酯之混合物中，於 100°C 下攪拌混合物 20 小時。反應混合物減壓濃縮，再加乙酸乙酯與三氟乙酸(與上述同量)，於 100°C 下攪拌混合物 20 小時。反應混合物冷卻至室溫，濾出沉澱固體，以乙醚洗滌。殘質先經矽膠管柱層析法預純化(移動相二氯甲烷/甲醇/氨 10/2/0.2)，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產

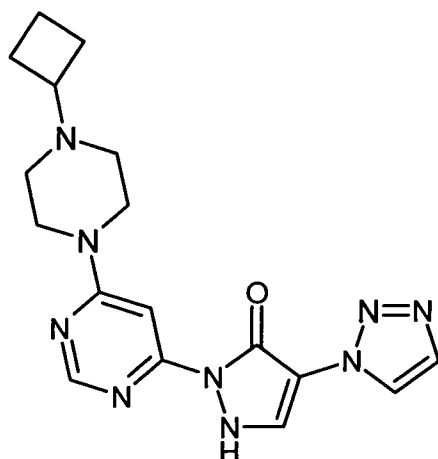
量：137 mg(理論值之 36%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 2.73$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 367$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)： $\delta = 8.40$ (s, 1H), 8.12(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.74(s, 1H), 7.50(s, 1H), 7.07(s, 1H), 3.65-3.58(m, 4H), 2.77(quintet, 1H), 2.38-2.35(m, 4H), 2.01-1.96(m, 2H), 1.89-1.79(m, 2H), 1.67-1.62(m, 2H)。

實例 2

2-[6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



添加 16 μ l(23 mg, 0.2 mmol)三氟乙酸至含 211 mg(1.0 mmol)來自實例 8A 之化合物與 250 mg(1.0 mmol)來自實例 9A 之化合物之 4 ml 乙酸乙酯之混合物中，於 100°C 下攪拌混合物 20 小時。反應混合物減壓濃縮，再加乙酸乙酯與三氟乙酸(與上述同量)，於 100°C 下攪拌混合物 3 天。反應混合物冷卻至室溫，濾出沉澱固體，以乙醚洗滌。殘質懸浮於 2 ml 水中，添加 1 N 氫氧化鈉水溶液(pH = 9-10)使其溶解，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。

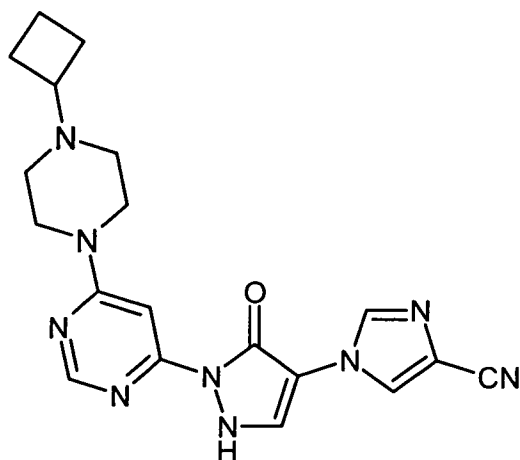
產量：195 mg(理論值之 51%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 2.90$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 368$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)： $\delta = 8.41$ (s, 1H), 8.40(s, 1H), 7.88(s, 1H), 7.82(s, 1H), 7.75(s, 1H), 3.70-3.65(m, 4H), 3.03-2.97(m, 1H), 2.60-2.57(m, 4H), 2.06-2.02(m, 2H), 1.98-1.90(m, 2H), 1.70-1.64(m, 2H)。

實例 3

1-{2-[6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1H-吡唑-4-基}-1H-咪唑-4-甲腈



添加 16 μ l(23 mg, 0.2 mmol)三氟乙酸至含 236 mg(1.0 mmol)來自實例 6A 之化合物與 250 mg(1.0 mmol)來自實例 9A 之化合物之 4 毫升乙酸乙酯混合物中，混合物於 100°C 下攪拌 20 小時。反應混合物減壓濃縮，再加乙酸乙酯與三氟乙酸(與上述同量)。於 100°C 下攪拌混合物 3 天。反應混合物冷卻至室溫，濾出沉澱固體，以乙醚洗滌。殘質懸浮於 2 ml 水中，添加 1 N 氫氧化鈉水溶液(pH = 9-10)使其溶解，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產

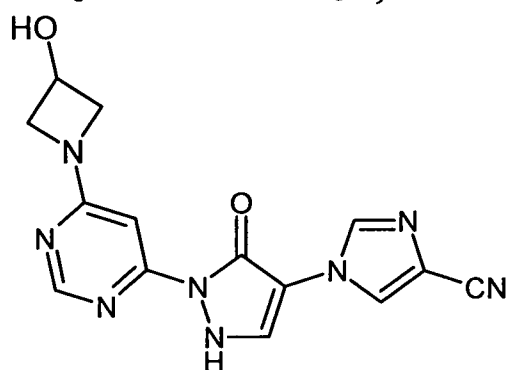
量：219 mg(理論值之 56%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.10$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 392$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6)： $\delta = 8.38(\text{d}, 1\text{H})$, $8.37(\text{d}, 1\text{H})$, $8.17(\text{d}, 1\text{H})$, $7.82(\text{s}, 1\text{H})$, $7.80(\text{s}, 1\text{H})$, $3.68\text{--}3.62(\text{m}, 4\text{H})$, $3.38\text{--}3.30(\text{m}, 4\text{H})$, $2.96\text{--}2.91(\text{m}, 1\text{H})$, $2.06\text{--}2.00(\text{m}, 2\text{H})$, $1.95\text{--}1.85(\text{m}, 2\text{H})$, $1.70\text{--}1.63(\text{m}, 2\text{H})$ 。

實例 4

1-{2-[6-(3-羥基氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈



添加 46 μl (68 mg, 0.6 mmol)三氟乙酸至含 700 mg(3.0 mmol)來自實例 6A 之化合物與 541 mg(3.0 mmol)來自實例 10A 之化合物之 10 毫升乙酸乙酯之混合物中，於 100°C 下攪拌混合物 10 小時。反應混合物減壓濃縮，溶於 5 ml 乙醇中，濾出沉澱。取固體懸浮於 10 ml 水中，添加 1 N 氫氧化鈉水溶液($\text{pH} = 9$)至固體溶解。然後使用 1 N 鹽酸調整 pH 至 7，混合物濃縮至體積約 5 ml，濾出所形成之沉澱。殘質經水與二異丙基醚洗滌，經製備性 HPLC 層析(方法 8)。取固體懸浮於 10 ml 水中，添加 1 N 氫氧化鈉水溶液($\text{pH} = 9$)至

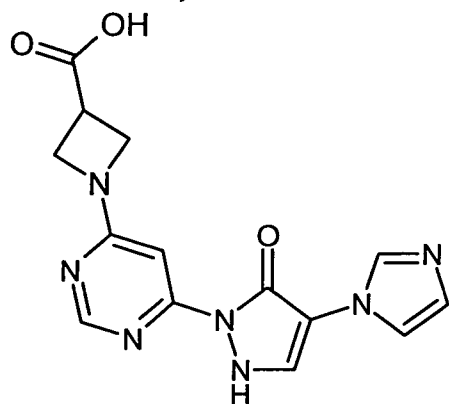
固體溶解。然後使用 1 N 鹽酸調整 pH 至 7，濃縮混合物至體積約 2.5 ml，濾出所形成之沉澱。濃縮濾液至約 2 ml，再次過濾。合併兩份殘質，以水與乙酸乙酯洗滌，減壓乾燥。產量：78 mg(理論值之 8%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 2.90$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 325$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.35$ (s, 1H), 8.29(s, 1H), 8.17(s, 1H), 7.66(s, 1H), 7.34(s, 1H), 5.80-5.75(m, 1H), 4.63-4.58(m, 1H), 4.24-4.20(m, 2H), 3.75-3.73(m, 2H)。

實例 5

1-{6-[4-(1*H*-咪唑-1-基)-5-側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡唑-1-基]嘧啶-4-基}氮雜環丁烷-3-羧酸



先添加 46 mg(0.3 mmol)氮雜環丁烷-3-羧酸鹽酸鹽至含 1 ml 水與 0.3 ml 乙醇之混合物中。添加 100 mg(0.3 mmol)來自實例 13A 之化合物，於 100°C 下攪拌混合物 1 小時。反應混合物再使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整至 pH = 7，於 100°C 下攪拌 16 小時。再此使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整混合物至 pH = 7，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 150°C 下反應 1 小時。反應混合物減壓濃縮，經製備性

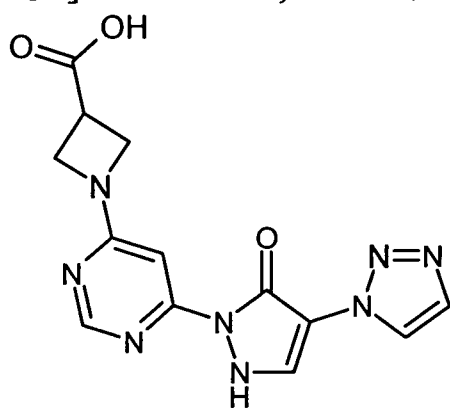
HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：23 mg(理論值之 21%)

LC-MS(方法 8)： $R_t = 0.86$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 328$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.41(\text{s}, 1\text{H})$, $7.79(\text{s}, 1\text{H})$, $7.47(\text{s}, 1\text{H})$, $7.36(\text{s}, 1\text{H})$, $7.31(\text{s}, 1\text{H})$, $6.89(\text{s}, 1\text{H})$, $4.09(\text{t}, 2\text{H})$, $3.99(\text{t}, 2\text{H})$ 。

實例 6

1-{6-[5-側氧基-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-2,5-二氫-1*H*-吡唑-1-基]嘧啶-4-基}氮雜環丁烷-3-羧酸



先添加 55 mg(0.4 mmol)氮雜環丁烷-3-羧酸鹽酸鹽至 2 ml 水中。添加 100 mg(0.3 mmol)來自實例 12A 之化合物，使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整 pH 至 7。混合物於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 150°C 下反應 1 小時。反應混合物減壓濃縮，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：15 mg(理論值之 13%)

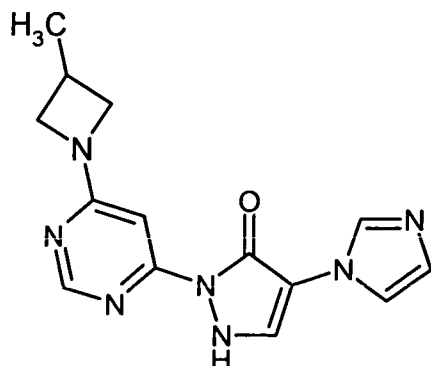
HPLC(方法 6)： $R_t = 2.81$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 329$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.42(\text{s}, 1\text{H})$, $8.26(\text{s},$

1H), 7.70(s, 1H), 7.67(s, 1H), 7.34(s, 1H), 4.05-3.96(m, 2H 與 2H), 3.13-3.07(m, 1H)。

實例 7

4-(1*H*-咪唑-1-基)-2-[6-(3-甲基氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



取 43 mg(0.4 mmol)3-甲基氮雜環丁烷鹽酸鹽、100 mg(0.3 mmol)來自實例 13A 之化合物與 174 μ l(130 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺懸浮於 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 4.5 小時。反應混合物減壓濃縮，溶於添加 1 N 氫氧化鈉水溶液之水(pH = 9-10)中，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：30 mg(理論值之 30%)

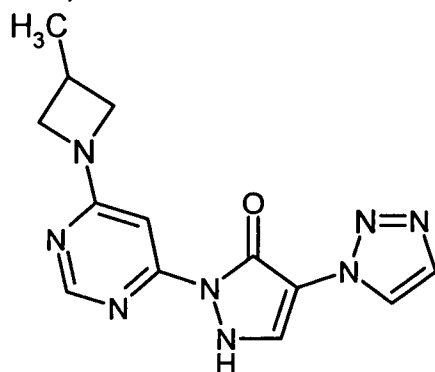
HPLC(方法 6)： $R_t = 3.07$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 298$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.25$ (s, 1H), 7.81(s, 1H), 7.46(s, 1H), 7.39(s, 1H), 7.31(s, 1H), 6.88(s, 1H), 4.10(t, 2H), 3.54(dd, 2H), 2.86-2.75(m, 1H), 1.25(d, 3H)。

實例 8

2-[6-(3-甲基氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三

唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



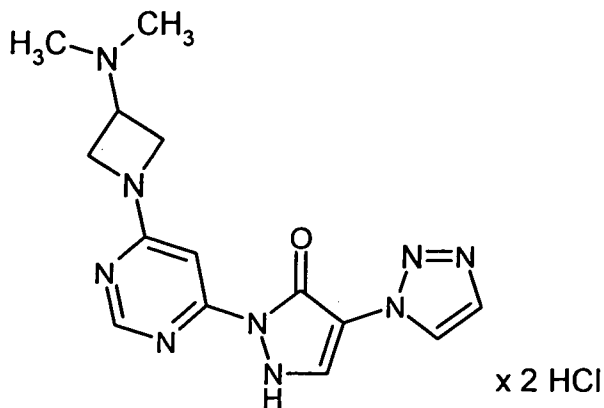
取 43 mg(0.4 mmol)3-甲基氮雜環丁烷鹽酸鹽、100 mg(0.3 mmol)來自實例 12A 之化合物與 174 μ l(130 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺懸浮於 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 1.5 小時。反應混合物減壓濃縮，溶於添加 1 N 氫氧化鈉水溶液之水(pH = 9-10)中，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：25 mg(理論值之 25%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.00$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 299$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)： $\delta = 8.41$ (s, 1H), 8.27(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.67(s, 1H), 7.41(s, 1H), 4.11(t, 2H), 3.56(dd, 2H), 2.86-2.78(m, 1H), 1.25(d, 3H)。

實例 9

2-{6-[3-(二甲基胺基)氮雜環丁烷-1-基]嘧啶-4-基}-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮二鹽酸鹽



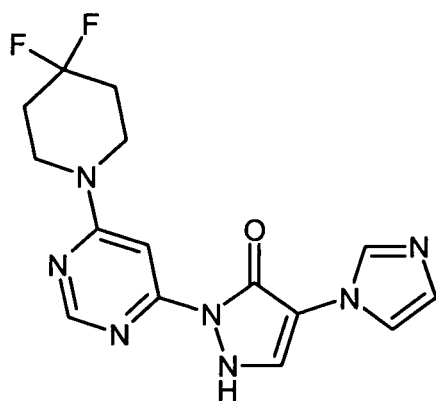
取 271 mg(1.5 mmol)*N,N*-二甲基氮雜環丁烷-3-胺二鹽酸鹽、400 mg(1.5 mmol)來自實例 12A 之化合物與 847 mg(6.1 mmol)碳酸鉀懸浮於 8 毫升 *N,N*-二甲基甲醯胺中，於 100°C 下攪拌 16 小時。反應混合物減壓濃縮，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：添加濃度 0.1%三氟乙酸之乙腈/水梯度)。進一步利用製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：添加濃度 0.1%甲酸之乙腈/水梯度)。添加 2 毫升 1 N 鹽酸至含產物之溶離份，於室溫下攪拌混合物 1 小時。濾出固體，於高度真空下乾燥。產量：62 mg(理論值之 17%)

LC-MS(方法 5) : $R_t = 0.19$ min ; MS(ESIpos) : $m/z = 328 [M+H]^+$;

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) : δ = 8.42(s, 1H), 8.28(s, 1H), 7.69(s, 1H), 7.66(s, 1H), 7.52(s, 1H), 4.02(t, 2H), 3.76(dd, 2H), 3.24-3.18(m, 1H), 2.12(s, 6H) .

實例 10

2-[6-(4,4-二氟吡啶-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-咪唑-1-基)-
1,2-二氟-3*H*-吡唑-3-酮



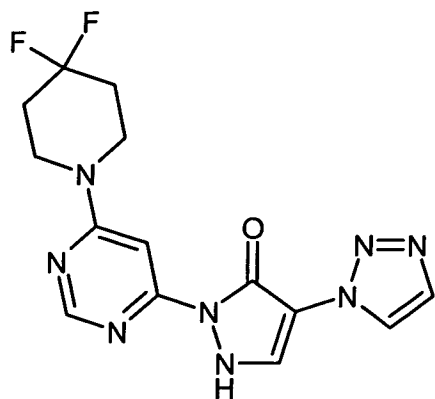
先添加 100 mg(0.3 mmol)來自實例 13A 之化合物、63 mg(0.4 mmol)4,4-二氟哌啶鹽酸鹽與 116 μ l(86 mg, 0.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺至 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 2.5 小時。減壓濃縮後，殘質溶於乙腈/水，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：82 mg(理論值之 71%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.37$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 348$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.49$ (s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.15(s, 1H), 7.76(s, 1H), 7.64(s, 1H), 7.22(s, 1H), 3.80(t, 4H), 2.06(heptet, 4H)。

實例 11

2-[6-(4,4-二氟哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



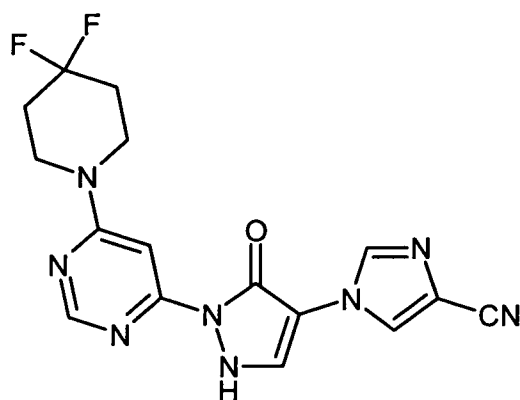
先添加 250 mg(0.8 mmol)來自實例 12A 之化合物、158 mg(1.0 mmol)4,4-二氟哌啶鹽酸鹽與 435 μ l(323 mg, 2.5 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺至 5 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 30 min。經製備性 HPLC 預純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)後，產物再經矽膠管柱層析法純化(移動相二氯甲烷/甲醇，10/1)。產量：29 mg(理論值之 10%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.49$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 349$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)： $\delta = 8.56$ (s, 1H), 8.39(s, 1H), 8.30(s, 1H), 7.87(s, 1H), 7.57(s, 1H), 3.91-3.81(m, 4H), 2.09(heptet, 4H)。

實例 12

1-{2-[6-(4,4-二氟哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈



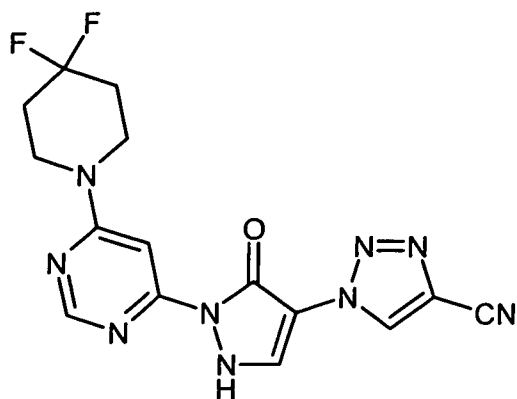
取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、262 mg(1.7 mmol)4,4-二氟哌啶鹽酸鹽與 289 μ l(215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 53 μ l(79 mg, 0.7 mmol)三氟乙酸與 324 mg(1.4 mmol)來自實例 6A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：111 mg(理論值之 21%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.69$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 373$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.55$ (s, 1H), 8.44(d, 1H), 8.33(s, 1H), 8.22(d, 1H), 7.60(br. s, 1H), 3.84(br. s, 4H), 2.09(heptet, 4H)。

實例 13

1-{2-[6-(4,4-二氟哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-1,2,3-三唑-4-甲腈



取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、262 mg(1.7 mmol)4,4-二氟哌啶鹽酸鹽與 289 μ l(215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 53 μ l(79 mg, 0.7 mmol)三氟乙酸與 325 mg(1.4 mmol)來自實例 7A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：34 mg(理論值之 7%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.77$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 374$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.24$ (s, 1H), 8.59(s, 1H), 8.27(s, 1H), 7.54(s, 1H), 3.90(br. s, 4H), 2.12(heptet, 4H)。

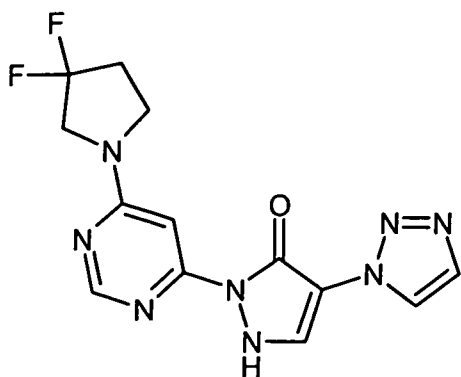
實例 14

2-[6-(3,3-二氟吡咯啶-1-基)嘓啶-4-基]-4-(1*H*-咪唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡啶-3-酮

HPLC(方法 6) : $R_t = 3.18$ min ; MS(ESIpos) : $m/z = 334$
 $[M+H]^+$;

¹H-NMR(400 MHz, 甲醇-d₄) : δ = 8.41(s, 1H), 7.85(s, 1H), 7.62(s, 1H), 7.56(s, 1H), 7.29(s, 1H), 7.03(s, 1H), 3.91(t, 2H), 3.76(t, 2H), 2.55(heptet, 2H)。

2-[6-(3,3-二氟吡咯啉-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氟-3*H*-吡唑-3-酮



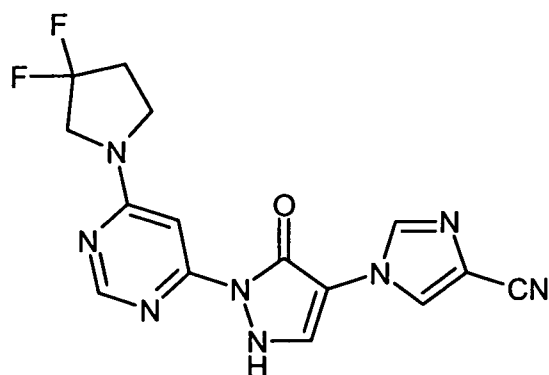
先添加 100 mg(0.8 mmol)來自實例 12A 之化合物、57 mg(0.4 mmol)3,3-二氟吡咯啉鹽酸鹽與 174 μ l(129 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺至 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 30 min。減壓濃縮後，殘質溶於乙腈/水，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：13 mg(理論值之 12%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.33$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 335$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.42$ (s, 1H), 8.35(s, 1H), 7.72-7.66(m, 3H), 3.87(t, 2H), 3.65(t, 2H), 2.64-2.50(m, 部份低於 DMSO 訊號, 2H)。

實例 16

1-{2-[6-(3,3-二氟吡咯啉-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈



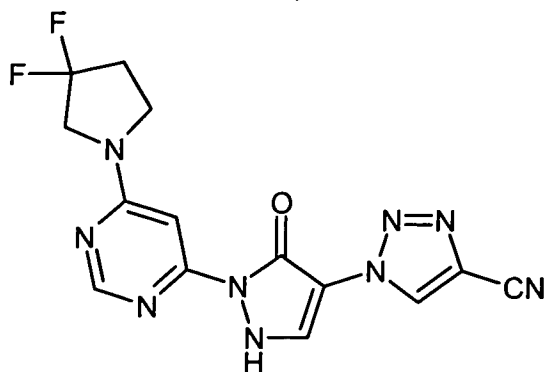
取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、238 mg(1.7 mmol)3,3-二氟吡咯啉鹽酸鹽與 289 μ l(215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 53 μ l(79 mg, 0.7 mmol)三氟乙酸與 324 mg(1.4 mmol)來自實例 6A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。添加 1 毫升 1 N 鹽酸至反應混合物中。濾出所得鹽酸鹽粗產物之沉澱，以乙醚洗滌及乾燥。粗產物仍含有未反應之起始物(實例 11A 之化合物)。因此，由粗產物與 108 μ l(80 mg, 0.6 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺、10 mg(0.1 mmol)3,3-二氟吡咯啉鹽酸鹽與 2 ml 水，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 170°C 下反應 15 min。反應溶液經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：30 mg(理論值之 6%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.58$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 359$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.55$ (s, 1H), 8.44(d, 1H), 8.33(s, 1H), 8.21(d, 1H), 7.26(br. s, 1H), 3.99(t, 2H), 3.75(br. s, 2H), 2.66-2.54(m, 部份低於 DMSO 訊號, 2H)。

實例 17

1-{2-[6-(3,3-二氟吡咯啉-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-1,2,3-三唑-4-甲腈



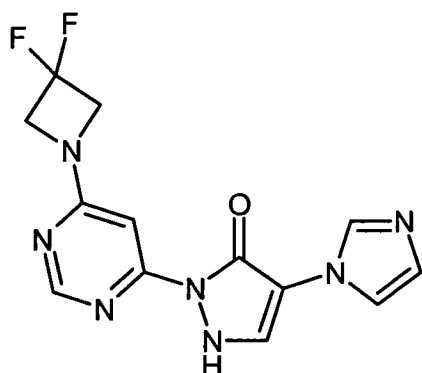
取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、238 mg(1.7 mmol)3,3-二氟吡咯啉鹽酸鹽與 289 μ l(215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 53 μ l(79 mg, 0.7 mmol)三氟乙酸與 325 mg(1.4 mmol)來自實例 7A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：137 mg(理論值之 27%)

LC-MS(方法 4)： R_t = 1.66 min；MS(ESIpos)： m/z = 360 $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： δ = 9.25(s, 1H), 8.61(s, 1H), 8.29(s, 1H), 7.21(br. s, 1H), 4.06(t, 2H), 3.82(br. s, 2H), 2.69-2.55(m, 部份低於 DMSO 訊號, 2H)。

實例 18

2-[6-(3,3-二氟氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-咪唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



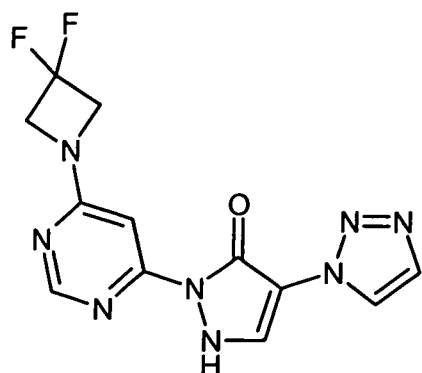
先添加 100 mg(0.3 mmol)來自實例 13A 之化合物、52 mg(0.4 mmol)3,3-二氟氮雜環丁烷鹽酸鹽與 175 μ l(130 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺至 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 3 小時。濾出沉澱固體，濾液減壓濃縮。殘質溶於乙腈/水，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：36 mg(理論值之 32%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.00$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 320$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆)： $\delta = 8.42$ (s, 1H), 8.16(s, 1H), 7.79(s, 1H), 7.56(s, 1H), 7.50(s, 1H), 7.07(s, 1H), 4.49(t, 4H)。

實例 19

2-[6-(3,3-二氟氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡啶-3-酮



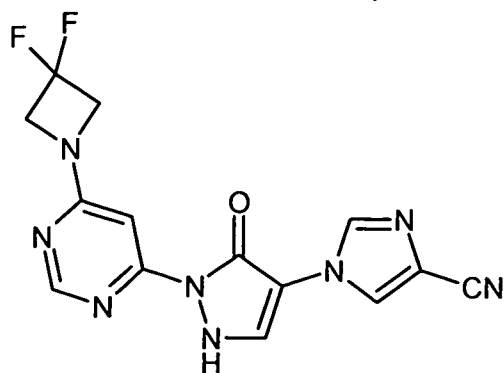
先添加 100 mg(0.3 mmol)來自實例 12A 之化合物、52 mg(0.4 mmol)3,3-二氟氮雜環丁烷鹽酸鹽與 174 μ l(130 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺至 2 ml 四氫呋喃中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 120°C 下反應 30 min。減壓濃縮後，殘質溶於乙腈/水，經製備性 HPLC 純化(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)。產量：36 mg(理論值之 34%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.20$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 321$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.42$ (s, 1H), 8.39(s, 1H), 7.71(s, 2H), 7.62(s, 1H), 4.46(t, 4H)。

實例 20

1-{2-[6-(3,3-二氟氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈



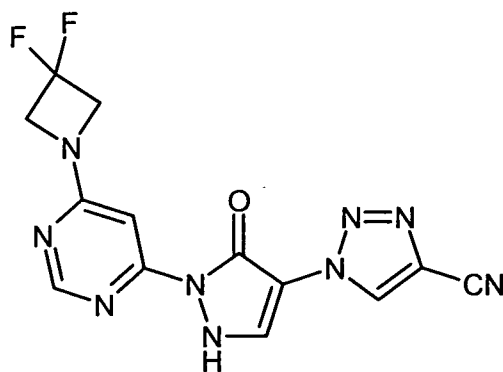
取含 120 mg(0.8 mmol)來自實例 11A 之化合物、129 mg(1.0 mmol)3,3-二氟氮雜環丁烷鹽酸鹽與 174 μ l(129 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 32 μ l(47 mg, 0.4 mmol)三氟乙酸與 194 mg(0.8 mmol)來自實例 6A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：32 mg(理論值之 11%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.48$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 345$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.80$ - 8.08 (m, 4H), 7.25(s, 1H), 4.61(br. s, 4H)。

實例 21

1-{2-[6-(3,3-二氟氮雜環丁烷-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-1,2,3-三唑-4-甲腈



取含 120 mg(0.8 mmol)來自實例 11A 之化合物、129 mg(1.0 mmol)3,3-二氟氮雜環丁烷鹽酸鹽與 174 μ l(129 mg, 1.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。添加 32 μ l(47 mg, 0.4 mmol)三氟乙酸與 194 mg(0.8 mmol)來自實例 7A 之化合物後，於 100°C

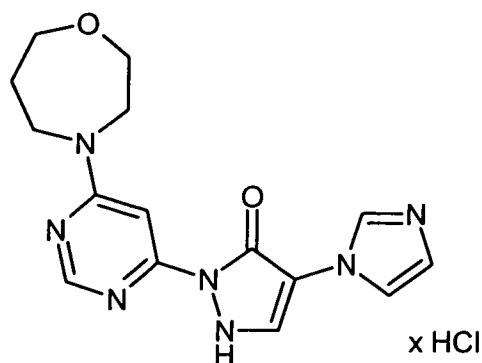
下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：51 mg(理論值之 18%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.56$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 346$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.26(\text{s}, 1\text{H})$, $8.60(\text{s}, 1\text{H})$, $8.36(\text{s}, 1\text{H})$, $7.18(\text{s}, 1\text{H})$, $4.69(\text{t}, 4\text{H})$ 。

實例 22

4-(1*H*-咪唑-1-基)-2-[6-(1,4-氧氮雜環庚烷-4-基)嘧啶-4-基]-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮鹽酸鹽



取含 200 mg(1.0 mmol)來自實例 5A 之化合物、200 mg(1.0 mmol)來自實例 14A 之化合物與 37 μl (54 mg, 0.5 mmol)三氟乙酸之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。經製備性 HPLC(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)預純化後，粗產物與 1 毫升 1 N 鹽酸攪拌，濾出，以乙醚洗滌產物，減壓乾燥。產量：21 mg(理論值之 6%)

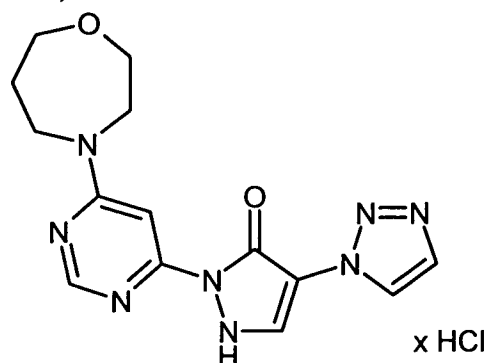
LC-MS(方法 4)： $R_t = 0.95$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 364$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.46(\text{s}, 1\text{H})$, $8.56(\text{s}, 1\text{H})$, $8.30(\text{s}, 1\text{H})$, $8.06(\text{t}, 1\text{H})$, $7.83(\text{t}, 1\text{H})$, $7.50\text{--}7.33(\text{m}, 1\text{H})$, $4.05(\text{br. s}, 2\text{H})$, $3.91\text{--}3.70(\text{m}, 4\text{H})$, $3.68(\text{t}, 2\text{H})$, $2.04\text{--}1.73(\text{m},$

2H)。

實例 23

2-[6-(1,4-氧氮雜環庚烷-4-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮鹽酸鹽



取含 400 mg(1.3 mmol)來自實例 12A 之化合物與 220 mg(1.6 mmol)1,4-氧氮雜環庚烷鹽酸鹽之 4 毫升丙烷-2-醇混合物，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 115°C 下反應 30 min。添加 232 μ l(172 mg, 1.3 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺，反應混合物於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 115°C 下反應 20 min。減壓濃縮後，殘質溶於乙腈/水/三氟乙酸，經製備性 HPLC 層析(方法 9)。取得自 HPLC 分離法之三氟乙酸鹽冷凍乾燥，使用 2 毫升 1 N 鹽酸轉化成鹽酸鹽。產量：7 mg(理論值之 1%)

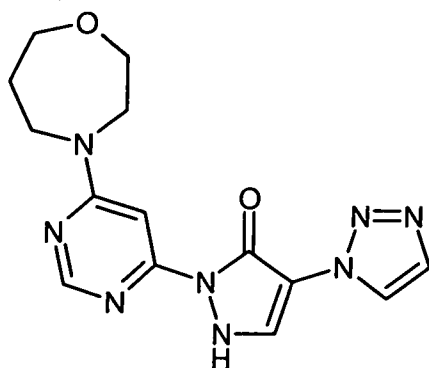
LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.20$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 329$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.54$ (s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.25(s, 1H), 7.86(d, 1H), 7.35(br. s, 1H), 4.14-3.69(m, 6H), 3.67(t, 2H), 2.03-1.77(m, 2H)。

實例 24

2-[6-(1,4-氧氮雜環庚烷-4-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三

唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



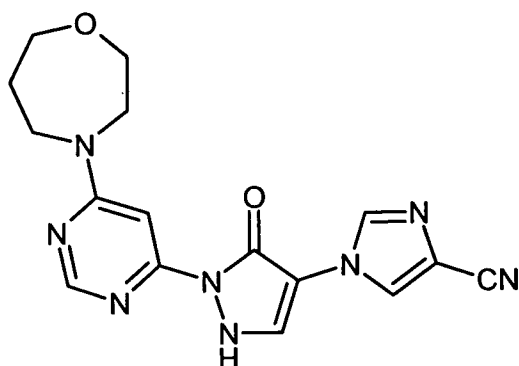
取含 500 mg(1.7 mmol)來自實例 12A 之化合物、688 mg(5.0 mmol)1,4-氧氮雜環庚烷鹽酸鹽與 1.4 ml(1077 mg, 8.3 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之混合物於 10 ml 四氫呋喃/乙醇(1/1)中，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 140°C 下反應 30 min。經製備性 HPLC(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)預純化後，粗產物溶於乙腈/三氟乙酸，經製備性 HPLC 層析(方法 10)。取得自 HPLC 分離法之三氟乙酸鹽冷凍乾燥，使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整至 pH = 7-8。經製備性 HPLC(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)單離產物。產量：176 mg(理論值之 31%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.19$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 329$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.41$ (d, 1H), 8.33(d, 1H), 7.78(br. s, 1H), 7.72-7.70(m, 2H), 3.91-3.65(m, 6H), 3.62(t, 2H), 1.95-1.83(m, 2H)。

實例 25

1-{2-[6-(1,4-氧氮雜環庚烷-4-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈



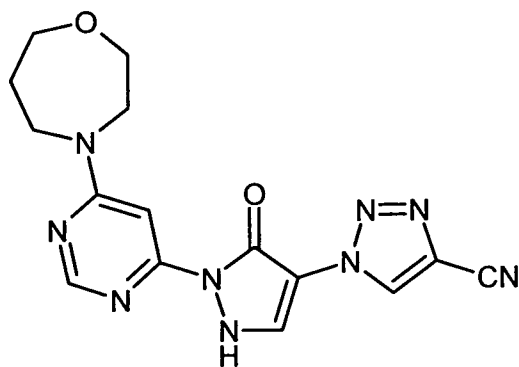
取含 200 mg(0.9 mmol)來自實例 6A 之化合物、178 mg(0.9 mmol)來自實例 14A 之化合物與 33 μ l(49 mg, 0.4 mmol)三氟乙酸之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：120 mg(理論值之 40%)

HPLC(方法 6)： $R_t = 3.27$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 353$ [M+H]⁺；

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆)： $\delta = 8.52$ (s, 1H), 8.42(d, 1H), 8.25(s, 1H), 8.19(d, 1H), 7.39(br. s, 1H), 4.14-3.70(m, 6H), 3.66(t, 2H), 2.05-1.68(m, 2H)。

實例 26

1-{2-[6-(1,4-氧氮雜環庚烷-4-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1H-吡唑-4-基}-1H-1,2,3-三唑-4-甲腈



取含 200 mg(0.9 mmol)來自實例 7A 之化合物、178 mg(0.9 mmol)來自實例 14A 之化合物與 33 μ l(49 mg, 0.4

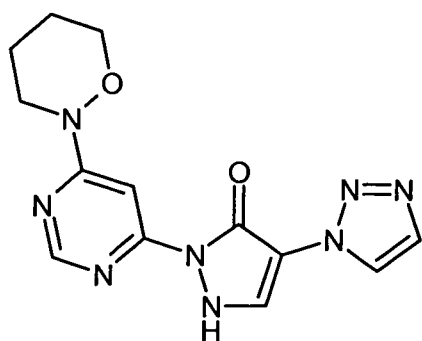
mmol)三氟乙酸之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：80 mg(理論值之 27%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.40$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 354$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 9.22$ (s, 1H), 8.56(s, 1H), 8.21(s, 1H), 7.45-7.26(m, 1H), 4.06(br. s, 2H), 3.92-3.71(m, 4H), 3.68(t, 2H), 2.06-1.74(m, 2H)。

實例 27

2-[6-(1,2-氧氮雜環己烷-2-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮



取含 200 mg(0.7 mmol)來自實例 12A 之化合物、99 mg(0.8 mmol)1,2-氧氮雜環己烷鹽酸鹽[Bhat 等人之 *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 7, 1435-1446]與 348 μl (258 mg, 2.0 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 4 ml 四氫呋喃混合物，於單一模式微波爐(Emrys Optimizer)中，於 140°C 下反應 30 min。經製備性 HPLC(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)預純化後，粗產物溶於乙腈/水/甲醇，經製備性 HPLC 層析(方法 11)。取得自 HPLC 分離法之甲酸鹽冷凍乾燥，使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整至 pH = 7-8。經製備性

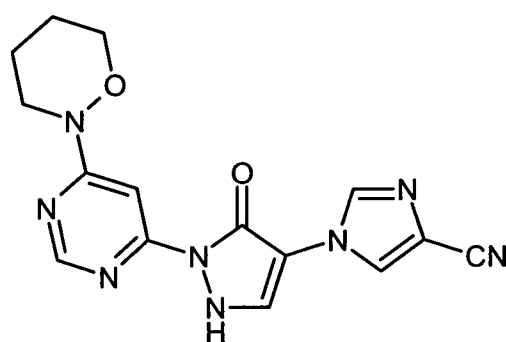
HPLC(RP18 管柱；移動相：乙腈/水梯度)單離產物。產量：
23 mg(理論值之 11%)

LC-MS(方法 4)： $R_t = 1.38$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 315$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)： $\delta = 8.58(\text{d}, 1\text{H})$, $8.42(\text{d}, 1\text{H})$, $8.40(\text{br. s}, 1\text{H})$, $7.88(\text{d}, 1\text{H})$, $7.66(\text{br. s}, 1\text{H})$, $4.09(\text{t}, 2\text{H})$, $3.98(\text{t}, 2\text{H})$, $1.86\text{-}1.68(\text{m}, 4\text{H})$ 。

實例 28

1-{2-[6-(1,2-氧氮雜環己烷-2-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1H-吡唑-4-基}-1H-咪唑-4-甲腈



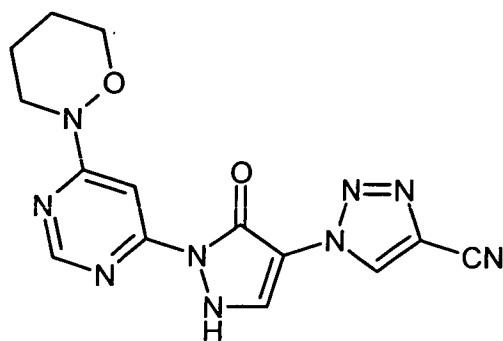
取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、205 mg(1.7 mmol)1,2-氧氮雜環己烷鹽酸鹽[Bhat 等人之 *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 7, 1435-1446]與 289 μl (215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 1.5 小時。添加 59 μl (49 mg, 0.4 mmol)三氟乙酸與 324 mg(1.4 mmol)來自實例 6A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：199 mg(理論值之 39%)

LC-MS(方法 5)： $R_t = 0.87$ min；MS(ESIpos)： $m/z = 339$ $[M+H]^+$ ；

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : δ = 8.57(d, 1H), 8.45(d, 1H), 8.40(br. s, 1H), 8.23(d, 1H), 7.70(br. s, 1H), 4.07(t, 2H), 3.96(t, 2H), 1.85-1.65(m, 4H)。

實例 29

1-{2-[6-(1,2-氧氮雜環己烷-2-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1H-吡唑-4-基}-1H-1,2,3-三唑-4-甲腈



取含 200 mg(1.4 mmol)來自實例 11A 之化合物、205 mg(1.7 mmol)1,2-氧氮雜環己烷鹽酸鹽[Bhat 等人之 *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 7, 1435-1446]與 289 μl (215 mg, 1.7 mmol)*N*-乙基-*N*-(丙烷-2-基)丙烷-2-胺之 3 ml 水混合物於 100°C 下攪拌 1.5 小時。添加 59 μl (49 mg, 0.4 mmol)三氟乙酸與 325 mg(1.4 mmol)來自實例 7A 之化合物後，於 100°C 下攪拌反應混合物 16 小時。濾出沉澱固體，依序以水及乙醚洗滌。產物減壓乾燥。產量：122 mg(理論值之 24%)

LC-MS(方法 4) : R_t = 1.66 min ; MS(ESIpos) : m/z = 340 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) : δ = 9.28(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.36(s, 1H), 7.60(br. s, 1H), 4.12(t, 2H), 4.03(t, 2H), 1.88-1.70(m, 4H)。

B. 藥理活性分析法

根據本發明化合物之藥理性質可依下列分析法證實：

縮寫：

DMEM 杜氏改良伊格氏培養基(Dulbecco's modified Eagle medium)

FCS 胎牛血清

TMB 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺

Tris 參(羥基甲基)胺基甲烷

1. 測定 HIF 脯胺醯基 4-羥化酶抑制劑活性與選擇性之活體外試驗

1.a) 對 HIF 脯胺醯基羥化酶之抑制活性：

羥化之 HIF 會專一性結合馮希伯-林道(von Hippel-Lindau)蛋白質-延伸蛋白 B-延伸蛋白 C 複合物(VBC 複合物)。這種交互作用僅發生在保留之脯胺醯基上之 HIF 被羥化時。其係 HIF 脯胺醯基羥化酶活性之生化測定基礎。該試驗係依文獻說明進行[Oehme F., Jonghaus W., Narouz-Ott L., Huetter J., Flamme I., *Anal. Biochem.* **330**(1), 74-80(2004)]：

取已塗佈 NeutrAvidin HBC 之透明 96 孔微滴定板(Pierce)，使用阻斷劑酪蛋白培養 30 分鐘。培養板再經每孔各 200 μ l 洗滌緩衝液(50 mM Tris，pH 7.5、100 mM NaCl，10%(v/v)阻斷劑酪蛋白、0.05%(v/v)Tween 20)洗滌 3 次。添加肽生物素 - DLDLEMLAPYIPMDDDFQL(比利時 4102 Seraing，Eurogentec 公司)，濃度 400 nM/100 μ l 洗滌緩衝液。以

此肽作為脯胺醯基羥化受質，並與微滴定板結合。培養 60 分鐘後，以洗滌緩衝液洗滌微滴定板 3 次，與含 1 mM 生物素之阻斷劑酪蛋白培養 30 分鐘後，再次以洗滌緩衝液洗滌 3 次。

進行脯胺醯基羥化酶反應時，取已與微滴定板結合之肽受質與含脯胺醯基羥化酶之溶胞液培養 1 至 60 分鐘。於室溫下，在 100 μ l 反應緩衝液(20 mM Tris, pH 7.5、5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 μ M - 1 mM 2-側氧基戊二酸酯, 10 μ M $FeSO_4$, 2 mM 抗壞血酸)中反應。反應混合物亦含有各種不同試驗濃度之脯胺醯基羥化酶抑制劑。該試驗物質之濃度最好(但不一定)在 1 nM 與 100 μ M 之間。以洗滌緩衝液洗滌微滴定板 3 次以中止反應。

定量脯胺醯基羥化反應時，添加同時包含來自大腸桿菌(*E. coli*)之硫氧化還原蛋白與 VBC 複合物之融合蛋白質之 80 μ l 結合緩衝液(50 mM Tris, pH 7.5、120 mM NaCl)。15 分鐘後，添加 10 μ l 含來自兔子之多株抗硫氧化還原蛋白抗體之結合緩衝液溶液。再過 30 分鐘後，取 10 μ l 含已與辣根過氧化酶偶合之抗兔子免疫球蛋白偶合之結合緩衝液溶液。於室溫下培養 30 分鐘後，以洗滌緩衝液洗滌微滴定板 3 次，以排除未結合之 VB 複合物與抗體。為了測定 VBC 複合物之結合量，由微滴定板與 TMB 培養 15 分鐘。添加 100 μ l 1 M 硫酸中止呈色反應。於 450 nm 下測定光密度，決定 VBC 複合物結合量。其與肽受質中羥化脯胺酸量呈正相關性。

或者，可利用與鎔(Perkin Elmer)偶合之 VBC 複合物來檢測脯胺醯基羥化程度。此時，VBC 複合物之結含量係以隨時間變化之螢光度測定。亦可使用標記^[35S]-甲硫胺酸之 VBC 複合物。此時，於網織球溶胞液中，利用活體外轉錄-轉譯作用製備標記放射性之 VBC 複合物。

該具體實施例在此試驗中抑制 HIF 脯胺醯基羥化酶活性之 IC₅₀ 值≤ 30 μM。具體實施例之代表性 IC₅₀ 值示於下表 1 中：

表 1

實例編號	IC ₅₀ [nM]	實例編號	IC ₅₀ [nM]
2	880	21	70
5	540	25	180
9	760	26	380
17	130	29	170
20	90		

1.b) 活體外之細胞功能試驗：

根據本發明化合物活性係採用重組體細胞株定量。細胞源自於人類肺癌細胞株(A549，ATCC：美國菌種培養收集處，Manassas, VA 20108, USA)。該試驗細胞株依穩定方式，經包含螢火蟲 *Photinus pyralis* 螢光酶(下文中稱為螢光酶)報導子基因，於人工最小促進子之控制下進行轉染。該最小促進子包括 TATA 盒上游之兩個缺氧負責元素[Oehme F., Ellinghaus P., Kolchhof P.,

Smith T.J., Ramakrishnan S., Hütter J., Schramm M., Flamme I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**(2), 343-9(2002)]。在缺氧效應下(例如：於 1% 氧之存在下培養 24 小時)或於非選擇性二氧化酶抑制劑(例如：濃度 100 μM 之去鐵胺(desferroxamine)，濃度 100 μM 之氯化鈷或濃度 1 mM 之 *N*-草醯基甘胺酸二乙酯)之作用下，試驗細胞株會產生螢光酶，可藉由合適之生物發光試劑(例如：Steady-Glo® Luciferase Assay System 螢光酶分析系統，美國 Promega Corporation, Madison, WI 53711, USA)與合適光度計檢測及定量。

試驗法：試驗前一天，將經過精確計算之細胞量塗覆在 384-或 1,536-孔微滴定板之培養基(DMEM，10% FCS，2 mM 麩醯胺)中，並保持在細胞培養箱中(大氣濕度 96%，5% v/v CO_2 ，37°C)。試驗當天，添加試驗物質至有標度濃度之培養基中。未添加試驗物質之細胞係作為陰性對照組。以測定細胞對抑制劑敏感性之試驗作為陽性對照組，例如：添加去鐵胺至終濃度 100 μM 。添加試驗物質至微滴定板孔中 6 至 24 小時後，以光度計測定所得光訊號。藉由測定值畫出劑量/效應曲線，作為決定最大活性濃度一半值(稱為 EC_{50} 值)之基礎。

1.c) 修飾基因表現之活體外細胞功能試驗

為了探討經過試驗物質處理之人類細胞株對專一性 mRNA 表現之修飾作用，取下列細胞株於 6-或 24-孔培養板上培養：人類肝腫瘤細胞(HUH，日本 JCRB 細胞銀行)、人類胚胎腎臟纖維母細胞(HEK/293，美國

ATCC, Manassas, VA 20108)、人類子宮頸癌細胞(HeLa, 美國 ATCC, Manassas, VA 20108)、人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC, 美國 Cambrex, East Rutherford, New Jersey 07073)。添加試驗物質後 24 小時, 以磷酸鹽緩衝之生理食鹽水洗滌細胞, 使用合適方法取得總 RNA(例如: Trizol[®] 試劑, 德國 Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe)。

典型之分析實驗中, 各取 1 μ g 依此方式取得之總 RNA, 使用 DNase I 分解, 使用合適之逆轉錄酶反應(ImProm-II 逆轉錄酶系統, 美國 Promega 公司, Madison, WI 53711)轉譯成互補 DNA(cDNA)。各取 2.5%依此方式取得之 cDNA 進行聚合酶鏈反應。利用實時定量性聚合酶鏈反應[TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* 6(10), 986-94(1996)], 使用 ABI Prism 7700 序列檢測儀器(Applied Biosystems, Inc.)探討所試驗基因之 mRNA 表現程度。此時所採用引子-探針組合係利用 Primer Express 1.5 軟體產生(Applied Biosystems, Inc.)。明確言之, 探討促紅血球生成素、碳酸酐酶 IX、乳酸脫氫酶 A 與血管內皮細胞生長因子之 mRNA。

根據本發明物質在源於人類之細胞中, 會隨劑量變化而顯著提高缺氧所誘發基因之 mRNA。

2. 檢測心血管系統中作用之活體內試驗

2.a) 修飾基因表現之活體內試驗:

取溶於合適溶劑中之試驗化合物, 對小鼠或大鼠使

用胃管經口投藥、經腹膜內投藥或經靜脈內投藥。典型劑量為每公斤體重投與 0.1、0.5、1、5、10、20、50、100 與 300 mg 物質。對照組動物僅接受投與溶劑。投與試驗物質後 4、8 或 24 小時，以過量異氟烷(isoflurane)殺死動物，隨後切下頸部及取出待試驗之器官。取一部份器官於液態氮中急速冷凍。依 B.1.a)之說明，自部份器官中得到總 RNA，並轉譯成 cDNA。採用實時定量性聚合酶鏈反應，使用 ABI Prism 7700 序列檢測儀器 (Applied Biosystems, Inc.)探討待試驗基因之 mRNA 之表現程度[TaqMan-PCR；Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* 6(10), 986-94(1996)]。

相較於安慰劑對照組，在經口或非經腸式投與根據本發明物質後，使腎臟中促紅血球生成素之 mRNA 隨劑量變化而顯著提高。

2.b) 血清中促紅血球生成素含量測定法：

取含於合適溶劑中之試驗物質經腹膜內或經口投與小鼠或大鼠，一天一次或兩次。典型劑量為每公斤體重投與 0.1、0.5、1、5、10、20、50、100 與 300 mg 物質。安慰劑對照組動物僅接受投與溶劑。投藥前及最後一次投與試驗物質後 4 小時，在短暫麻醉下，自動物眼後靜脈叢或尾靜脈抽出 50 μ l 血液。添加肝素鋰防止血液凝結。離心得到血漿。利用促紅血球生成素-ELISA(Quantikine[®] 小鼠 Epo 免疫分析法，美國 Minneapolis 市 R&D Systems 公司)，依據製造商之指

示，測定血漿中促紅血球生成素含量。利用小鼠所測定之促紅血球生成素參考值，將測定值換算成 pg/ml。

相較於起始值及安慰劑對照組，在經口或非經腸式投與根據本發明物質後，使血漿中促紅血球生成素隨劑量變化而顯著提高。

2.c) 周邊血液之細胞組成測定法：

取含於合適溶劑中之試驗物質經腹膜內或經口投與小鼠或大鼠，一天一次或兩次，共進行數天。典型劑量為每公斤體重投與 0.1、0.5、1、5、10、20、50、100 與 300 mg 物質。對照組動物僅接受投與溶劑。試驗結束時，在短暫麻醉下，自動物眼角靜脈叢或尾靜脈抽出血液。添加檸檬酸鈉防止血液凝結。以適當電子測定儀器測定血樣中紅血球、白血球及血小板濃度。利用血液抹片，使用適合此目的之染色溶液(KABE Labortechnik, Nümbrecht)，經由顯微鏡，分別在 1000 個紅血球中篩選測定網織球濃度。利用血球容積毛細管自眼後靜脈叢抽出血液，毛細管在適合此目的之離心機中離心後，手動讀取血球容積值。

相較於起始值及安慰劑對照組，在經口或非經腸式投與根據本發明物質後，使血球容積、紅血球數量與網織球隨劑量變化而顯著提高。

3. 溶解度測定法

起始溶液(初始溶液)製法：

準確稱取至少 1.5 mg 試驗物質加至附有螺旋蓋及瓶塞之寬口 10 mm 螺旋蓋 V 形瓶(來自 Glastechnik Gräfenroda

GmbH 公司，產品編號 8004-WM-H/V15 μ)中，添加 DMSO 至濃度 50 mg/ml，混合物渦轉 30 分鐘。

校準溶液製法：

所需之定量吸取步驟係於 1.2 ml 之 96 孔深孔分析板 (DWP)上，使用自動化液體操作機器進行。所使用溶劑為乙腈/水 8：2 之混合物。

校準溶液之起始溶液製法(儲備母液)：添加 833 μ l 溶劑混合物至 10 μ l 初始溶液(濃度=600 μ g/ml)，混合物均質化。各試驗物質分別在 DWP 中，製備 1：100 稀釋液，並使稀釋液均質化。

校準溶液 5(600 ng/ml)：添加 270 μ l 溶劑混合物至 30 μ l 母液中，混合物均質化。

校準溶液 4(60 ng/ml)：添加 270 μ l 溶劑混合物至 30 μ l 校準溶液 5 中，混合物均質化。

校準溶液 3(12 ng/ml)：添加 400 μ l 溶劑混合物至 100 μ l 校準溶液 4 中，混合物均質化。

校準溶液 2(1.2 ng/ml)：添加 270 μ l 溶劑混合物至 30 μ l 校準溶液 3 中，混合物均質化。

校準溶液 1(0.6 ng/ml)：添加 150 μ l 溶劑混合物至 150 μ l 校準溶液 2 中，混合物均質化。

樣本溶液製法：

所需之定量吸取步驟係於 1.2 ml 之 96 孔深孔分析板 (DWP)上，使用自動化液體操作機器進行。添加 1000 μ l PBS 緩衝液 pH 6.5 至 10.1 μ l 母液中(PBS 緩衝液 pH 6.5：稱取 61.86 g 氯化鈉、39.54 g 磷酸二氫鈉與 83.35 g 1 N 氫氧化

鈉水溶液加至 1 升定量燒瓶中，在燒瓶中添加水，攪拌混合物約 1 小時。由此溶液取 500 ml 加至 5 升定量燒瓶中，加水至燒瓶中。使用 1 N 氫氧化鈉水溶液調整 pH 至 6.5)。

操作法：

所需之定量吸取步驟係於 1.2 ml 之 96 孔 DWP 上，使用自動化液體操作機器進行。使用調節溫度之振盪器，使依此方式製備之樣本溶液於 20°C 與 1400 rpm 下振盪 24 小時。由此等溶液中分別取出 180 μ l，移至 Beckman polyallomer 離心管中。此等溶液於約 223 000 x g 下離心 1 小時。自各樣本溶液中取出 100 μ l 上清液，使用 PBS 緩衝液 6.5 稀釋 1：10 與 1：1000。

分析法：

以 HPLC/MS-MS 分析樣本。使用試驗化合物之 5 點校準曲線定量。溶解度以 mg/l 表示。分析順序：1)空白組(溶劑混合物)；2)校準溶液 0.6 ng/ml；3)校準溶液 1.2 ng/ml；4)校準溶液 12 ng/ml；5)校準溶液 60 ng/ml；6)校準溶液 600 ng/ml；7)空白組(溶劑混合物)；8)樣本溶液 1：1000；7)樣本溶液 1：10。

HPLC/MS-MS 法

HPLC：Agilent 1100，定量幫浦(G1311A)、自動取樣器 CTC HTS PAL，脫氣機(G1322A)與管柱恆溫器(G1316A)；管柱：Oasis HLB 20 mm x 2.1 mm，25 μ ；溫度：40°C；移動相 A：水+ 0.5 毫升甲酸/升；移動相 B：乙腈 + 0.5 毫升甲酸/升；流速：2.5 ml/min；停止時間 1.5 min；梯度：0 min 95% A，5% B；跳升：0-0.5 min 5% A，95% B；0.5-0.84

min 5% A , 95% B ; 跳升 : 0.84-0.85 min 95% A , 5% B ;
0.85-1.5 min 95% A , 5% B 。

MS/MS : Waters Quattro Micro Tandem MS/MS ; Z-Spray API 介面 ; HPLC-MS 初始分流器 1 : 20 ; 以 ESI 模式測定。

C. 醫藥組合物之具體實施例

根據本發明化合物可依下列方式轉化成醫藥調配物：

錠劑：

組成：

100 mg 根據本發明化合物、50 mg 乳糖(單水合物)、50 mg 玉米澱粉(天然)、10 mg 聚乙烯吡咯烷酮(PVP 25)(德國 Ludwigshafen 市 BASF 公司)與 2 mg 硬脂酸鎂。

錠劑重量 212 mg。直徑 8 mm，彎曲半徑 12 mm。

製法：

取含根據本發明化合物、乳糖與澱粉之混合物與濃度 5%(w/w)之 PVP 水溶液製成顆粒。乾燥後，顆粒與硬脂酸鎂混合 5 分鐘。使用一般壓錠機壓縮混合物(錠劑格式參見上文)。建議使用之壓縮力為 15 kN。

經口投藥用之懸浮液：

組成：

1000 mg 根據本發明化合物、1000 mg 乙醇(96%)、400 mg Rhodigel[®](來自美國賓州 FMC 公司之黃原膠)與 99 g 水。

10 毫升口服懸浮液相當於單獨劑量 100 mg 根據本發明化合物。

製法：

取 Rhodigel 懸浮於乙醇，添加根據本發明化合物至懸浮液中。攪拌加水。攪拌混合物約 6 小時，直到 Rhodigel 結束膨脹為止。

口服用溶液：**組成：**

500 mg 根據本發明化合物、2.5 g 聚山梨酸酯與 97 g 聚乙二醇 400。20 g 口服溶液相當於個別劑量 100 mg 根據本發明化合物。

製法：

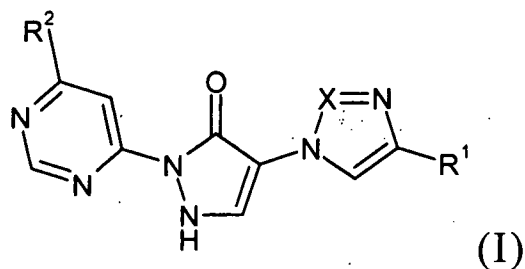
取根據本發明化合物攪拌懸浮於聚乙二醇與聚山梨酸酯之混合物中。持續攪拌操作，直到根據本發明化合物完全溶解為止。

經靜脈內溶液：

取根據本發明化合物以低於飽和溶解度之濃度溶於生理上可接受之溶劑(例如：等張性生理食鹽水溶液、5%葡萄糖溶液與/或 30%PEG 400 溶液)中。溶液經過無菌過濾，移入無菌且無熱原注射容器中。

七、申請專利範圍

1. 一種如下式化合物，



其中

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表哌啶-1-基，其中哌啶-1-基經一個取代基取代，其中該取代基係選自 C₃-C₆-環烷基所組成群，
 或其一種鹽。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其特徵在於

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫或氰基，

R² 代表哌啶-1-基，其中哌啶-1-基之 4-位置經一個取代基取代，其中該取代基係選自 C₃-C₆-環烷基所組成群，

或其一種鹽。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其特徵在於

X 代表 N 或 CH，

R¹ 代表氫，

R² 代表哌啶-1-基，其中哌啶-1-基之 4-位置經一個取

代基取代，其中該取代基係選自 C_3 - C_6 -環烷基所組成群，

或其一種鹽。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其特徵在於

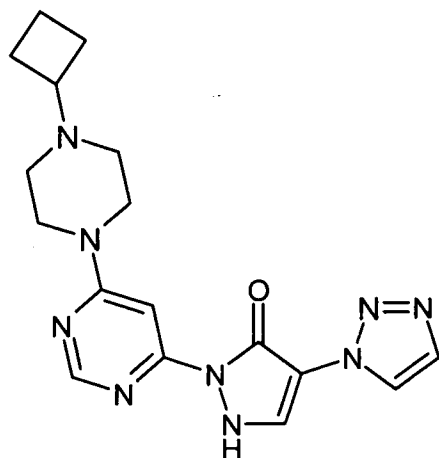
X 代表 N 或 CH，

R^1 代表氫或氰基，

R^2 代表 4-環丁基哌咍-1-基，

或其一種鹽。

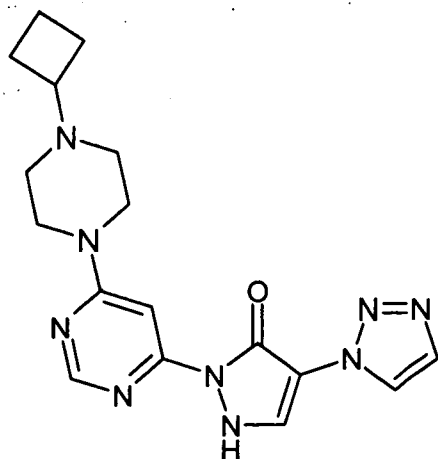
5. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其為 2-[6-(4-環丁基哌咍-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二氫-3*H*-吡唑-3-酮，具有下式



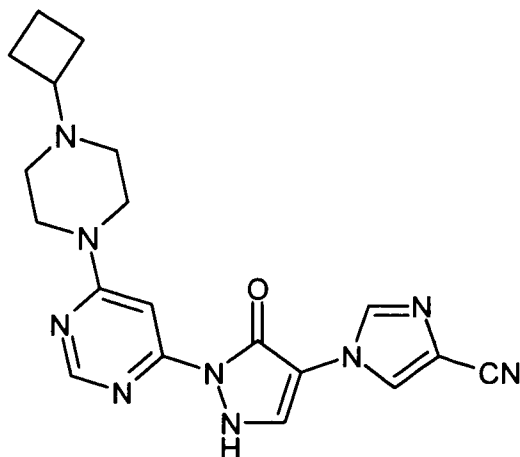
或其一種鹽。

6. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其為 2-[6-(4-環丁基哌咍-1-基)嘧啶-4-基]-4-(1*H*-1,2,3-三唑-1-基)-1,2-二

氮-3*H*-吡唑-3-酮，具有下式

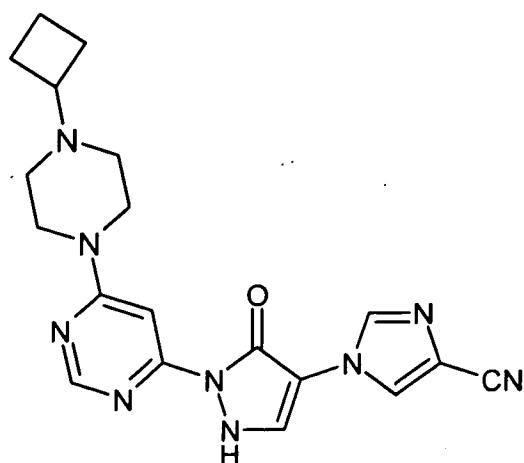


7. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其為 1-{2-[6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈，具有下式



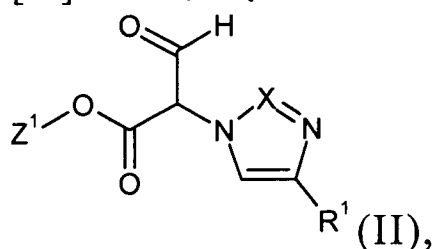
或其一種鹽。

8. 根據申請專利範圍第 1 項之化合物，其為 1-{2-[6-(4-環丁基哌啶-1-基)嘧啶-4-基]-3-側氧基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-基}-1*H*-咪唑-4-甲腈，具有下式



9. 一種製備根據申請專利範圍第 1 項之式(I)化合物或其鹽之方法，其特徵在於

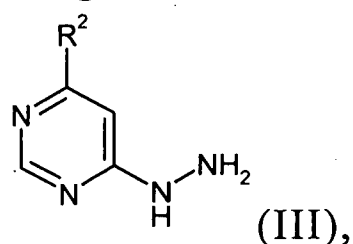
[A]由如下式化合物



其中 R^1 如申請專利範圍第 1 項之定義，及

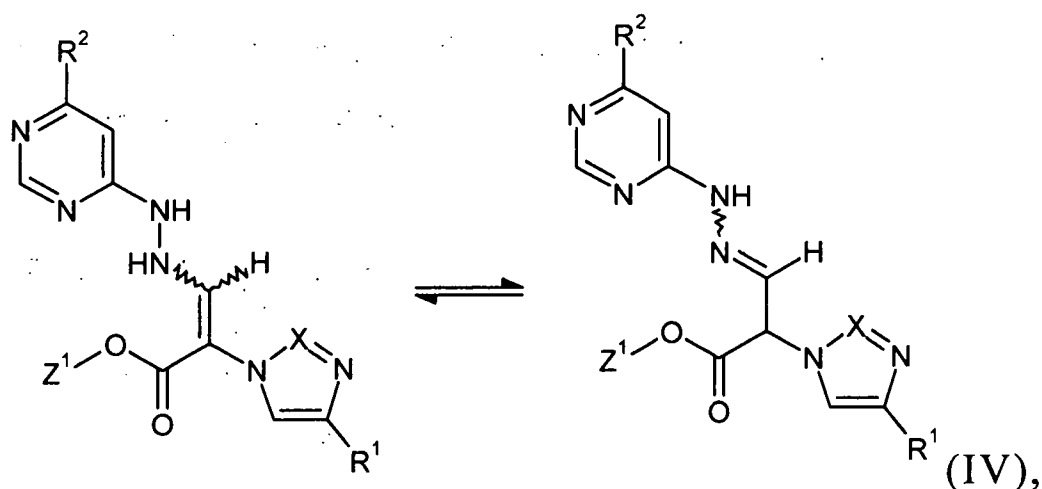
Z^1 代表甲基或乙基，

於惰性溶劑中，若適當時，於酸之存在下，與如下式化合物反應



其中 R^2 如申請專利範圍第 1 項之定義，

產生如下式化合物



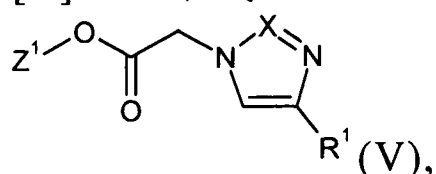
其中 Z^1 、 R^1 與 R^2 如申請專利範圍第 1 項之定義，

其在此等反應條件下或於接續反應步驟中，於鹼之影響下，環化產生式(I)化合物，

且式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其一種鹽，

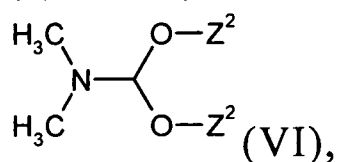
或

[B]由如下式化合物



其中 Z^1 與 R^1 如申請專利範圍第 1 項之定義，

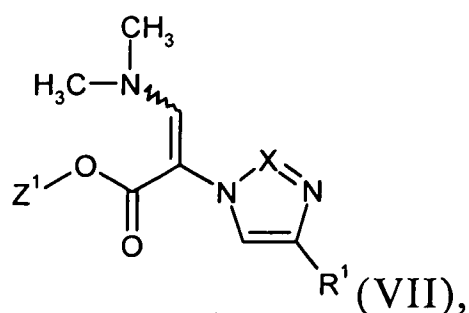
與如下式化合物縮合



其中

Z^2 代表甲基或乙基，

產生如下式化合物



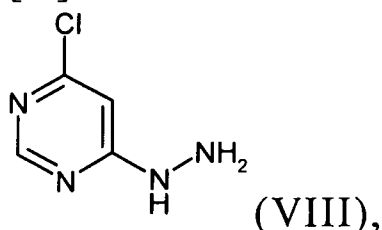
其中 Z^1 與 R^1 如申請專利範圍第 1 項之定義，

然後於酸之存在下，與式(III)化合物反應，產生式(IV)化合物，其在此等反應條件下或於接續反應步驟中，於鹼之影響下，環化產生式(I)化合物，

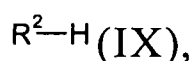
式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其一種鹽、其溶劑合物或其鹽之溶劑合物，

或

[C]由如下式化合物



於作為溶劑之水中，於同爐反應中，先與如下式化合物反應



其中 R^2 如申請專利範圍第 1 項之定義，

然後與式(VII)化合物反應，產生式(I)化合物，

式(I)化合物若適當時，與適當之(i)溶劑與/或(ii)鹼或酸反應，轉化成其一種鹽。

10. 根據申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之化合物，其係

供治療與/或預防疾病。

11. 一種以根據申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之化合物於製備醫藥供治療心血管疾病、心臟功能不足、貧血、慢性腎臟疾病與腎功能不足上之用途。
12. 一種醫藥品，其包含根據申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之化合物與惰性無毒之醫藥上合適之輔劑組合。
13. 根據申請專利範圍第 12 項之醫藥品，其係與另一種或多種選自下列所組成群中之化合物組合：ACE 抑制劑、血管收縮素 II 受體拮抗劑、 β 受體阻斷劑、鈣拮抗劑、PDE 抑制劑、礦物皮質激素受體拮抗劑、利尿劑、阿斯匹靈、鐵補充劑、維生素 B12 與葉酸補充劑、斯塔汀抑制素(statins)、毛地黃(毛地黃毒苷)衍生物、腫瘤化療劑與抗生素。
14. 根據申請專利範圍第 13 項之醫藥品，其係供治療心血管疾病、心臟功能不足、貧血、慢性腎臟疾病與腎功能不足。
15. 根據申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項所定義之化合物，其係用於治療心血管疾病、心臟功能不足、貧血、慢性腎臟疾病與腎功能不足之方法。