(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201219401 A1
(43)公開日： 中華民國 101 (2012) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：100132460 (22)申請日： 中華民國 100 (2011) 年 09 月 08 日
(51)Int. Cl.： *C07D495/04 (2006.01)* *A61K31/519 (2006.01)*
A61P19/10 (2006.01)
(30)優先權：2010/09/14 美國 61/382,526
(71)申請人：雷西肯製藥股份有限公司 (美國) LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國
(72)發明人：巴伯莎約瑟夫 BARBOSA, JOSEPH (US) ；卡爾森肯尼士高登 CARSON, KENNETH GORDON (US) ；蓋爾德彥麥可華特 GARDYAN, MICHAEL WALTER (US) ；何偉 HE, WEI (CN) ；倫巴多維多莉亞 LOMBARDO, VICTORIA (US) ；帕巴蒲瑞彬 PABBA, PRAVEEN (IN) ；塔佛詹姆士二世 TARVER, JAMES JR. (US)
(74)代理人：蔡坤財；李世章
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：9 共 106 頁

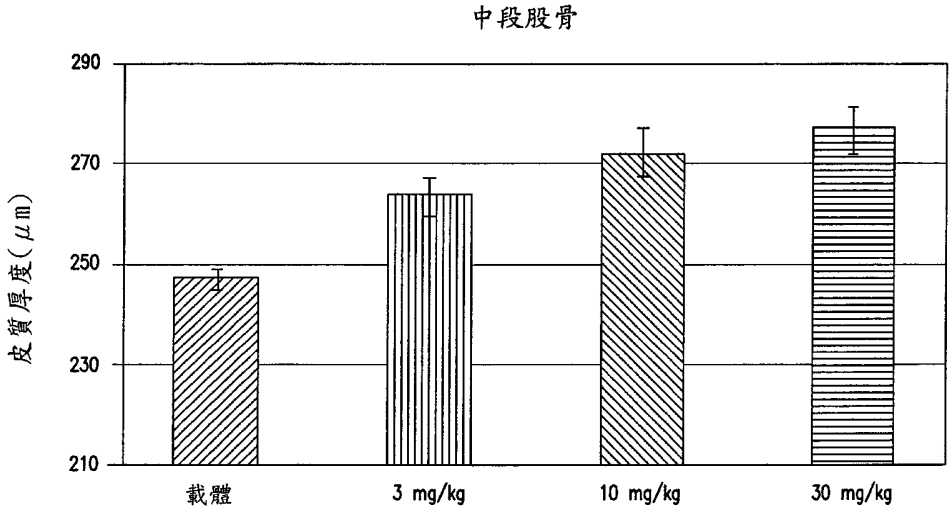
(54)名稱

背板果膠乙醯酯酶的雙環抑制劑及其用法

BICYCLIC INHIBITORS OF NOTUM PECTINACETYLESTERASE AND METHODS OF THEIR USE

(57)摘要

本發明描述可用於抑制背板果膠乙醯酯酶的化合物以及包含化合物的組合物以及可用上述化合物與組合物來治療影響骨的疾病與異常的應用方法。



(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201219401 A1
(43)公開日： 中華民國 101 (2012) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：100132460 (22)申請日： 中華民國 100 (2011) 年 09 月 08 日
(51)Int. Cl.： *C07D495/04 (2006.01)* *A61K31/519 (2006.01)*
A61P19/10 (2006.01)
(30)優先權：2010/09/14 美國 61/382,526
(71)申請人：雷西肯製藥股份有限公司 (美國) LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國
(72)發明人：巴伯莎約瑟夫 BARBOSA, JOSEPH (US) ；卡爾森肯尼士高登 CARSON, KENNETH GORDON (US) ；蓋爾德彥麥可華特 GARDYAN, MICHAEL WALTER (US) ；何偉 HE, WEI (CN) ；倫巴多維多莉亞 LOMBARDO, VICTORIA (US) ；帕巴蒲瑞彬 PABBA, PRAVEEN (IN) ；塔佛詹姆士二世 TARVER, JAMES JR. (US)
(74)代理人：蔡坤財；李世章
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：9 共 106 頁

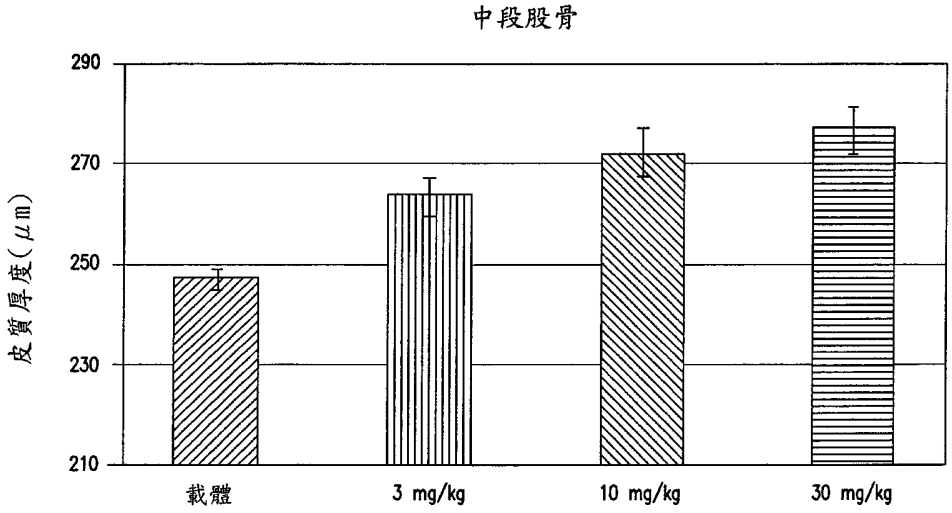
(54)名稱

背板果膠乙醯酯酶的雙環抑制劑及其用法

BICYCLIC INHIBITORS OF NOTUM PECTINACETYLESTERASE AND METHODS OF THEIR USE

(57)摘要

本發明描述可用於抑制背板果膠乙醯酯酶的化合物以及包含化合物的組合物以及可用上述化合物與組合物來治療影響骨的疾病與異常的應用方法。



六、發明說明：

本申請案主張2010年9月14日申請的美國臨時專利申請案第61/382,526號的權益，將美國臨時專利申請案的全文以引用之方式併入本文。

【發明所屬之技術領域】

本發明有關於背板果膠乙醯酯酶的小分子抑制劑、包含背板果膠乙醯酯酶的小分子抑制劑的組合物以及上述小分子抑制劑與組合物的應用方法。

【先前技術】

骨健康取決於形成骨的骨母細胞以及吸收骨的破骨細胞的協調活性。「骨置換作用(bone turnover)反應該等合成與代謝細胞功能間的平衡，並確保成熟骨架受傷時能自行修復並藉由釋出礦物質(諸如，鈣與磷)進入循環維持骨的內分泌功能」Allen, J.G.等人，J. Med. Chem., 53 (2010年6月10日)，第4332至4353頁中的第4332頁。許多疾病狀態影響此平衡，此造成骨質量的增加或減少或骨品質的改變。骨礦物質密度的逐漸減少被稱為骨質缺乏；骨的嚴重損失被稱為骨質疏鬆。同上文獻註記。

骨質疏鬆治療與預防的目前標準照顧利用雙磷酸鹽類的口服小分子抗骨吸收物(antiresportives)。同上文獻註記的第4333頁。在骨質疏鬆治療中亦通常應用唑來磷酸(Zoledronic acid)、雷洛西芬(raloxifene)、鈣與維生素D

補充。同上文獻註記。雖然抗骨吸收劑有助於預防骨損失，但合成劑「能夠增加骨質量至較大程度……且亦具有能力來改善骨品質並提高骨強度。」Guo, H.等人，J. Med. Chem., 53 (2010年2月25日)，第1819至1829頁中的第1819頁。在美國，人類PTH是唯一FDA認可的合成劑。上述Allen文獻的第4333頁。「由於骨質疏鬆治療的可用合成劑的缺乏，迫切需要可治療此疾病且非毒性、具成本效益且施加容易的小分子化合物的發展」上述Guo文獻的第1819頁。

「雖然相較於抗骨吸收治療而言，刺激骨形成的藥物劑的發展較不先進，但習知有許多路徑可促進骨母細胞功能」上述Allen文獻的第4338頁。該等路徑包括骨型態蛋白、轉化生長因子β、副甲狀腺素、類胰島素生長因子、纖維母細胞生長因子及無翼型MMTV嵌入位置(WNT)信號。同上文獻註記。Guo與同事近來描述關於該等路徑的第一路徑的結果。Guo上述文獻。明確地說，他們描述某些經取代的苯并噻吩與苯并呋喃化合物提高小鼠與大鼠中的骨型態蛋白2表現。報導化合物的兩個化合物在活體內刺激骨形成與骨小梁連接恢復。上述文獻的第1819頁。

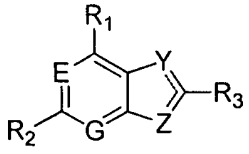
該等路徑的另一路徑為WNT路徑，WNT路徑牽涉於多種發育與再生過程。上述Allen文獻的第4340頁。然而，路徑是複雜的，且關於路徑的大部分以及路徑的成分如何影響骨頭尚未清楚。舉例而言，已經暗示LRP-5

與 β-連環素「無法直接連接通過信號來控制骨質量」，LRP-5 的突變與人類中骨質量增加有關，而典範 WNT 信號通過 β-連環素而發生，同上文獻註記。

基因表現數據的近來分析已經導致辨別出 WNT 信號的新標的。參見例如 Torisu, Y.等人，Cancer Sci., 99(6)：1139-1146, 1143 (2008)。上述標的之一為背板果膠乙醯酯酶(亦稱為 NOTUM 與 LOC174111)。

【發明內容】

本發明包含式：



的化合物與該等化合物之藥物可接受鹽類，其中 E 與 G 之一為氮，而 E 與 G 之另一者為氮或 CR_4；Y 與 Z 之一為 CR_5，而 Y 與 Z 之另一者為 O 或 $S(O)_n$，其中 n 為 0、1 或 2；R_1 為鹵基、$-R_{1A}$、$-OR_{1A}$、$-S(O)_mR_{1A}$、$-S(O)_mOR_{1A}$ 或 $-S(O)_mN(R_{1A})_2$，其中 m 為 0、1 或 2；各個 R_{1A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2 為氫、鹵基、$-CO_2R_{2A}$、$-C(O)N(R_{2A})_2$、$-SR_{2A}$、$-OR_{2A}$、$-N(R_{2A})_2$ 或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個 R_{2A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3 為

氫、鹵基、氰基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環，或者 R_3 與 R_5 一起與 R_3 與 R_5 附接的原子形成任選取代的環狀基團；各個 R_{3A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_4 為氫、鹵基或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5 為氫、鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$ 或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環，或者 R_5 與 R_3 一起與 R_5 與 R_3 附接的原子形成任選取代的環狀基團；及各個 R_{5A} 為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環。

本發明亦包含藥物組合物與藥物組合物的應用方法，且藥物組合物包括本文揭露的化合物。

本發明進一步包含抑制背板果膠乙醯酯酶(「NOTUM」)的方法、刺激內皮質骨形成的方法、以及治療、管理與預防骨損失(例如，骨質疏鬆)相關的疾病與異常的方法。

【實施方式】

本發明部分係基於發現 NOTUM 的抑制可影響內皮質骨形成而完成。本發明的特定態樣係基於下列研究：缺少功能性 NOTUM 基因的小鼠(「基因剔除小鼠」)，抑制 NOTUM 的化合物的發現，以及上述化合物可用來在小鼠與大鼠中刺激皮質骨形成的發現。

1.1. 定義

除非另有明示，否則「烯基（alkenyl）」一詞意指具有2至20個(例如，2至10個或2至6個)碳原子且至少一個碳-碳雙鍵的直鏈、支鏈及/或環狀碳氫化合物。代表性之烯基基團包括乙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基、異丁烯基(isobutylenyl)、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基及3-癸烯基。

除非另有明示，否則「烷氧基(alkoxy)」一詞意指–O–烷基。烷氧基的實例包括(但不限於)-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$O(CH_2)_2CH_3$、-$O(CH_2)_3CH_3$、-$O(CH_2)_4CH_3$及-$O(CH_2)_5CH_3$。

除非另有明示，否則「烷基（alkyl）」一詞意指具有1至20個(例如，1至10個或1至4個)碳原子的直鏈、支鏈及/或環狀(「環烷基(cycloalkyl)」)碳氫化合物。具有1至4個碳原子之烷基基團稱為「低級烷基（lower alkyl）」。烷基基團的實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、異丙基、正-丁基、第三-丁基、異丁基、戊基、己基、異己基、庚基、4,4-二甲基戊基、辛基、2,2,4-三甲基戊基、壬基、癸基、十一烷基及十二烷基。環烷基

基團可為單環或多環，環烷基基團的實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基及金剛烷基(adamantyl)。烷基基團的其他實例具有線性、分支及/或環狀的部分(例如，1-乙基-4-甲基-環己基)。「烷基」一詞包括飽和碳氫化合物以及烯基與炔基基團。

除非另有明示，否則「烷芳基」或「烷基-芳基」一詞意指一個烷基基團連結至一個芳基基團。

除非另有明示，否則「烷基雜芳基」或「烷基-雜芳基」一詞意指一個烷基基團連結至一個雜芳基基團。

除非另有明示，否則「烷基雜環」或「烷基-雜環」一詞意指一個烷基基團連結至一個雜環基團。

除非另有明示，否則「炔基（alkynyl）」一詞意指具有2至20個(例如，2至20個或2至6個)碳原子且至少一個碳-碳三鍵的直鏈、支鏈與/或環狀碳氫化合物。代表性之炔基基團包含乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、5-己炔基、1-庚炔基、2-庚炔基、6-庚炔基、1-辛炔基、2-辛炔基、7-辛炔基、1-壬炔基、2-壬炔基、8-壬炔基、1-癸炔基、2-癸炔基及9-癸炔基。

除非另有明示，否則「芳基（aryl）」一詞意指由碳原子及氫原子所組成之一芳香環或一芳香環或部分芳香環系統。一個芳基基團可包含數個連結或稠合(fused)在一起的環。芳基基團之實例包含（但不限於）蒽基

（anthracenyl）、薁基（azulenyl）、聯苯（biphenyl）、芴基（fluorenyl）、二氫茚基（indan）、茚基（indenyl）、萘基（naphthyl）、菲基（phenanthrenyl）、苯基（phenyl）及 1,2,3,4-四氫-萘（1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene）。

除非另有明示，否則「芳烷基」或「芳基-烷基」一詞意指一個芳基基團連結至一烷基基團。

除非另有明示，否則「鹵素(halogen)」及「鹵基(halo)」二詞涵括氟、氯、溴及碘。

除非另有明示，否則「雜烷基（heteroalkyl）」一詞指的是一烷基基團（諸如，直鏈、支鏈或環狀），其中至少有一個碳原子已被一個雜原子（例如，N、O 或 S）所取代。

除非另有明示，否則「雜烷芳基」或「雜烷基-芳基」二詞代表雜烷基基團連結至烷基基團。

除非另有明示，否則「雜烷基雜環」或「雜烷基-雜環」二詞代表雜烷基基團連結至雜環基團。

除非另有明示，否則「雜芳基（heteroaryl）」一詞意指一芳基基團，其中至少有一個碳原子已被一個雜原子（例如，N、O 或 S）所取代。實例包含(但不限於)吖啶基（acridinyl）、苯並咪唑基（benzimidazolyl）、苯並呋喃基（benzofuranyl）、苯並異噻唑基（benzoisothiazolyl）、苯並異口号唑基（benzoisoxazolyl）、苯並喹唑啉基（benzoquinazolinyl）、苯並噻唑基（benzothiazolyl）、

苯並口㗁唑基（benzoxazolyl）、呋喃基（furyl）、咪唑基（imidazolyl）、吲哚基（indolyl）、異噻唑基（isothiazolyl）、異口㗁唑基（isoxazolyl）、口㗁二唑基（oxadiazolyl）、口㗁唑基（oxazolyl）、呔口井基（phthalazinyl）、吡口井基（pyrazinyl）、吡唑基（pyrazolyl）、嗒口井基（pyridazinyl）、吡啶基（pyridyl）、嘧啶基（pyrimidinyl）、呱嗪基（pyrimidyl）、吡咯基（pyrrolyl）、喹唑啉基（quinazolinyl）、喹啉基（quinolinyl）、四唑基（tetrazolyl）、噻唑基（thiazolyl）、及三嗪基（triazinyl）。

除非另有明示，否則「雜芳烷基（heteroarylalkyl）」或「雜芳基-烷基（heteroaryl-alkyl）」一詞意指一個雜芳基基團連結至一個烷基基團。

除非另有明示，否則「雜環（heterocycle）」一詞指的是由碳與氫與至少一雜原子(例如，N、O 或 S)所構成之芳香族、部分芳香族或非芳香族的單環或多環或環系統。一個雜環可包含數個（即，2 個或更多個）稠合或連結在一起的環。雜環類包含雜芳類。實例包含(但不限於)苯並[1,3]間二口㗁唑基（benzo[1,3]dioxolyl）、2,3-二氫-苯並[1,4] 二口㗁英基（2,3-二氫-benzo[1,4]dioxinyl）、口辛啉基（cinnolinyl）、呋喃基（furanyl）、脲乙醯基（hydantoinyl）、口末啉基（morpholinyl）、氧雜環丁基（oxetanyl）、環氧乙基（oxiranyl）、呱口井基（piperazinyl）、呱啶基

（piperidinyl）、吡咯烷酮基（pyrrolidinonyl）、吡咯啶基（pyrrolidinyl）、四氫呋喃基（tetrahydrofuranyl）、四氫吡喃基（tetrahydropyranyl）、四氫吡啶基（tetrahydropyridinyl）、四氫嘧啶基（tetrahydropyrimidinyl）、四氫噻吩基（tetrahydrothiophenyl）、四氫噻吡喃基（tetrahydrothiopyranyl）及戊內醯胺基（valerolactamyl）。

除非另有明示，否則「雜環烷基（heterocyclealkyl）」或「雜環-烷基(heterocycle-alkyl)」一詞指的是一雜環基團連結至一烷基基團。

除非另有明示，否則「雜環烷基（heterocycloalkyl）」一詞指的是一非芳香族雜環。

除非另有明示，否則「雜環烷基烷基（heterocycloalkylalkyl）」或「雜環烷基-烷基」一詞指的是一雜環烷基基團連結至一烷基基團。

除非另有明示，否則「管理(“manage”、“managing”及“management”)」一詞係包含預防患者(已經罹患疾病或異常)某特定疾病或異常的復發，與/或延長罹患該疾病或異常之患者保持緩解(remission)的時間。該等詞彙包括調節該疾病或異常的閾值(threshold)、發展及/或持續時間，或改變該患者對於該疾病或異常的反應方式。

除非另有明示，否則「藥物可接受鹽類」一詞係指自藥物可接受之無毒性酸類或鹼類(包含無機酸及無機鹼以及有機酸及有機鹼)所製備之鹽類。適當的藥物可接受之鹼加成鹽類(base addition salt)包括但不限於：由鋁、鈣、鋰、鎂、鉀、鈉及鋅所形成的金屬鹽類(metallic salt)，或由離胺酸(lysine)、N,N' -二苄基乙二胺(N,N' -dibenzylethylenediamine)、氯普魯卡因(chloroprocaine)、膽鹼(choline)、二乙醇胺(diethanolamine)、乙二胺(ethylenediamine)、葡胺(meglumine)(N-葡甲胺)及普魯卡因(procaine)所形成的有機鹽類(organic salt)。適當的無毒性酸類包括但不限於：諸如乙酸(acetic acid)、藻酸(alginic acid)、鄰胺基苯甲酸(anthranilic acid)、苯磺酸(benzenesulfonic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、樟腦磺酸(camphorsulfonic acid)、檸檬酸(citric acid)、乙烯基磺酸(ethenesulfonic acid)、蟻酸(formic acid)、反-丁烯二酸(fumaric acid)、呋喃甲酸(furoic acid)、半乳糖醛酸(galacturonic acid)、葡萄糖酸(gluconic acid)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid)、麩胺酸(glutamic acid)、乙醇酸(glycolic acid)、氫溴酸(hydrobromic acid)、鹽酸(hydrochloric acid)、羥基乙磺酸(isethionic acid)、乳酸(lactic acid)、順-丁烯二酸(maleic acid)、蘋果酸(malic acid)、苯乙醇酸(mandelic acid)、甲基磺酸(methanesulfonic acid)、黏液酸(mucic acid)、硝酸(nitric acid)、雙羥萘酸(pamoic acid)、泛酸

(pantothenic acid)、苯乙酸(phenylacetic acid)、磷酸(phosphoric acid)、丙酸(propionic acid)、柳酸(salicylic acid)、硬脂酸(stearic acid)、琥珀酸(succinic acid)、磺胺酸(sulfanilic acid)、硫酸(sulfuric acid)、酒石酸(tartaric acid)、及對甲苯磺酸(p-toluenesulfonic acid)等無機酸與有機酸。特定的無毒性酸包括鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸及甲基磺酸。因此，特定的鹽類包括鹽酸鹽(hydrochloride salt)及甲磺酸鹽(mesylate salt)。其他則為此技術已知之鹽類，參照例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版(Mack Publishing, Easton PA: 1990)及 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版(Mack Publishing, Easton PA: 1995)。

除非另有明示，否則「預防(“prevent”、“preventing”及“prevention”)」此詞意指發生於患者開始罹患特定疾病或異常之前的行動，此行動可抑制或減少該疾病或異常的嚴重度。換句話說，該詞彙包括預防法(prophylaxis)。

除非另有明示，否則化合物之「預防有效劑量(prophylactically effective amount)」係足以預防疾病或徵兆(或是與該疾病或異常相關之一或更多種症狀)或預防疾病或徵兆(或是與該疾病或異常相關之一或更多種症狀)復發之劑量。化合物的「預防有效劑量」為治療藥劑的劑量，「預防有效劑量」可單獨或搭配其他藥劑在

該疾病的預防中提供預防疾病的好處。「預防有效劑量」一詞可以包括可改善整體預防法或提高另一預防藥劑之預防效應的劑量。

除非另有明示，否則當詞彙「經取代(substituted)」用於描述化學結構或基團時，該詞彙意指該結構或基團之衍生物，其中該結構或基團之一或更多個氫原子係經化學基團或官能基(functional group)取代，該化學基團或官能基諸如(但不限於)：醇類、醛類、烷氧基、鏈烷氧基(alkanoyloxy)、烷氧基羰基(alkoxycarbonyl)、烯基、烷基(諸如，甲基、乙基、丙基、第三-丁基)、炔基、烷羰氧基(alkylcarbonyloxy)(-OC(O)烷基)、醯胺(-C(O)NH-烷基-或-烷基 NHC(O)烷基)、脒基(-C(NH)NH-烷基或-C(NR)NH_2)、胺類(一級、二級及三級，諸如烷胺基(alkylamino)、芳胺基(arylamino)、芳基烷胺基(arylalkylamino))、芳醯基(aroyl)、芳基、芳氧基、偶氮、胺甲醯基(胺甲醯基)(-NHC(O)O-烷基-或-OC(O)NH-烷基)、胺基甲醯基(carbamyl)(例如，$CONH_2$、CONH-烷基、CONH-芳基及 CONH-芳烷基)、羰基、羧基、羧酸、羧酸酐、氯化羧酸、氰基、酯類、環氧化物、醚類(例如，甲氧基、乙氧基)、胍基(guanidino)、鹵基(halo)、鹵烷基(例如，$-CCl_3$、$-CF_3$、$-C(CF_3)_3$)、雜烷基、半縮醛(hemiacetal)、亞胺(一級及二級)、異氰酸鹽、異硫氰酸鹽、酮類、亞硝酸鹽、硝基、側氧基(oxo)、磷酸二酯

（phosphodiester）、硫化物、磺醯胺基（sulfonamido）（例如，SO_2NH_2）、碸類（sulfone）、磺醯基（sulfonyl）（包含烷磺醯基、芳磺醯基及芳烷基磺醯基）、亞碸（sulfoxide）、硫醇基（thiol）（例如，硫氫基（sulfhydryl）、硫醚（thioether））及尿素（urea）（-NHCONH-烷基-）。

除非另有明示，否則化合物之「治療有效劑量（therapeutically effective amount）」係足以在疾病或症狀的治療或管理中提供治療好處的劑量，或是足以延緩或使一或更多個與該疾病或異常相關之症狀減至最輕的劑量。化合物的「治療有效劑量」意指治療藥劑的劑量，該劑量可單獨或搭配其他治療在該疾病或症狀之治療或管理上提供治療好處。詞彙「治療有效劑量」包括可改善整體治療、減少或避免疾病或症狀的徵候或起因或是提高另一治療藥劑之治療效應的劑量。

除非另有明示，否則「治療（“treat”、“treating”及“treatment”）」此詞乃盤計一種在患者正罹患特定疾病或異常時所採取的行動，該行動減輕該疾病或異常的嚴重度，或是阻滯或減緩該疾病或異常之進展。

除非另有明示，否則「包含」一詞和「包含，但不限於」具有相同之意義。同樣地，「諸如」一詞和「諸如，但不限於」具有相同的意義。

除非另有明示，否則一連串名詞前方的一或多個形容詞被視為應用於該些名詞的各者上。例如「任選取代之

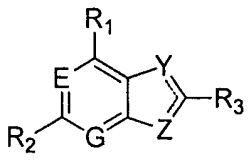
烷基、芳基或雜芳基」此句和「任選取代之烷基、任選取代之芳基、任選取代之雜芳基」具有相同之意義。

應注意的是，一個形成一個較大型化合物的一部分之化學基團，在文中可使用當該一部分之化學基團以單獨分子存在時一般所賦予之名稱或是一般賦予該單獨分子基團之名稱。例如當用於描述一個連接在其他化學基團的基團時，「吡啶」及「吡啶基」被賦予了相同的意義。因此，「XOH，其中X為吡啶基」及「XOH，其中X為吡啶」該兩個句子被賦予了相同之意義，且包含化合物吡啶-2-醇、吡啶-3-醇、吡啶-4-醇。

亦應注意者係假如結構或結構之一部分的立體化學並未以例如粗線或虛線標示，則該結構或該結構的該部分應被視為包含該結構或該結構的該部分所有立體異構物。再者，圖式中所示之具有未滿足原子價(unsatisfied valence)的任何原子係假定連接足夠的氫原子以滿足任何原子的原子價。此外，要是原子價容許，以實線平行於虛線所示之化學鍵包含單鍵及雙（例如芳香族）鍵。

1.2. 化合物

本發明包含式：



的化合物與該化合物之藥物可接受鹽類，其中：E與G之一為氮，而E與G之另一者為氮或CR_4；Y與Z之一

為 CR_5，而 Y 與 Z 之另一者為 O 或 $S(O)_n$，其中 n 為 0、1 或 2；R_1 為鹵基、$-R_{1A}$、$-OR_{1A}$、$-S(O)_mR_{1A}$、$-S(O)_mOR_{1A}$ 或 $-S(O)_mN(R_{1A})_2$，其中 m 為 0、1 或 2；各個 R_{1A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2 為氫、鹵基、$-CO_2R_{2A}$、$-C(O)N(R_{2A})_2$、$-SR_{2A}$、$-OR_{2A}$、$-N(R_{2A})_2$ 或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個 R_{2A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3 為氫、鹵基、氰基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環，或者 R_3 與 R_5 一起與 R_3 與 R_5 附接的原子形成任選取代的環狀基團；各個 R_{3A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_4 為氫、鹵基或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5 為氫、鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$ 或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環，或者 R_5 與 R_3 一起與 R_5 與 R_3 附接的原子形成任選取代的環狀基團；及各個 R_{5A} 為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環。

某些化合物中，E 與 G 兩者皆為氮。

某些化合物中，Z 為 S。

某些化合物中，Y 為 S。

某些化合物中，R_1為-R_{1A}或-$S(O)_nR_{1A}$。某些化合物中，R_{1A}為經取代之烷基。特定化合物中，R_{1A}由下列一或更多者任選取代：氰基、鹵基、羥基、-$N(R_{1B})_2$、-$S(O)_pR_{1B}$、-$S(O)_pOR_{1B}$、-$S(O)_pN(R_{1B})_2$、-$C(O)OR_{1B}$、-$C(O)N(R_{1B})_2$或-$C(O)N(R_{1B})S(O)_pR_{1B}$；其中各個$R_{1B}$獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及p為0、1或2。某些化合物中，R_{1B}由下列一或更多者任選取代：烷氧基、烷基、胺基(包括烷胺基、二烷胺基)、芳基、羧酸、氰基、鹵基、雜環或羥基。

某些化合物中，R_{1A}由-$C(O)OR_{1B}$取代。其他化合物中，R_{1A}由-$C(O)N(R_{1B})_2$取代。特定化合物中，R_{1B}為氫或低級烷基。

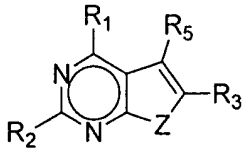
某些化合物中，R_2為氫、鹵基或低級烷基。特定化合物中，R_2為氫。

某些化合物中，R_3為氰基、鹵基、羥基或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_4為氫。

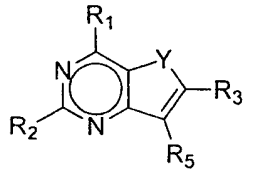
某些化合物中，R_5為氰基、鹵基、羥基或任選取代的烷基。

某些化合物的式為：

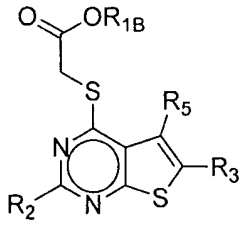


。

其他化合物的式為：



本發明實施例包括式：



的化合物與該式的化合物之藥物可接受鹽類，其中：R_{1B}為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2為氫或任選取代的烷基；各個R_{2A}獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3為鹵基、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5為鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環。

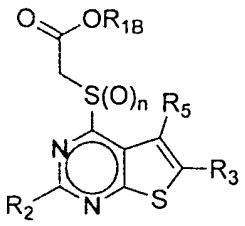
特定化合物係如：當R_2為氫、R_3為甲基且R_5為氯時，R_{1B}非為乙基；且當R_3為甲基時，R_5非為甲基或任選取代的苯基。某些化合物中，R_3非為低級烷基(例如，甲基)。某些化合物中，R_5非為低級烷基(例如，甲基)。

某些化合物中，R_{1B}為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。特定化合物中，R_{1B}為氫或烷基。

某些化合物中，R_3為烷基或鹵基(例如，氯)。

某些化合物中，R_5為烷基(例如，低級烷基)或鹵基。

本發明實施例包括式：



的化合物與該式的化合物之藥物可接受鹽類，其中：R_{1B}為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2為氫、鹵基、$-CO_2R_{2A}$、$-C(O)N(R_{2A})_2$、$-SR_{2A}$、$-OR_{2A}$或$-N(R_{2A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{2A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3為氫、鹵基、氰基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5為氫、鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及n為1或2。

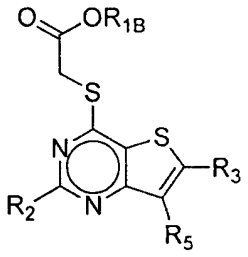
某些化合物中，R_{1B}為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。特定化合物中，R_{1B}為氫或烷基。

此式的某些化合物中，R_2為氫或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_3為烷基或鹵基(例如，氯)。某些化合物中，R_3非為低級烷基(例如，甲基)。

某些化合物中，R_5為烷基(例如，低級烷基)或鹵基。某些化合物中，R_5非為低級烷基(例如，甲基)。

本發明實施例包括式：



的化合物與該式的化合物之藥物可接受鹽類，其中：R_{1B}為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2為氫或任選取代的烷基；各個R_{2A}獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3為鹵基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$或$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5為鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環。

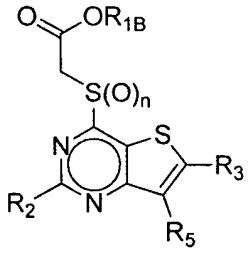
此式的某些化合物中，R_2為氫或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_{1B}為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。特定化合物中，R_{1B}為氫或烷基。

某些化合物中，R_3為烷基或鹵基(例如，氯)。某些化合物中，R_3非為低級烷基(例如，甲基)。

某些化合物中，R_5為烷基(例如，低級烷基)或鹵基。某些化合物中，R_5非為低級烷基(例如，甲基)。

本發明實施例包括式：



的化合物與該式的化合物之藥物可接受鹽類，其中：R_{1B}為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2為氫、鹵基、$-CO_2R_{2A}$、$-C(O)N(R_{2A})_2$、$-SR_{2A}$、$-OR_{2A}$或$-N(R_{2A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{2A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3為氫、鹵基、氰基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_4為氫、鹵基或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5為氫、鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及n為1或2。

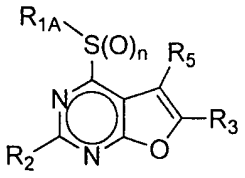
某些化合物中，R_{1B}為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。特定化合物中，R_{1B}為氫或烷基。

此式的某些化合物中，R_2為氫或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_3為烷基或鹵基(例如，氯)。某些化合物中，R_3非為低級烷基(例如，甲基)。

某些化合物中，R_5為烷基(例如，低級烷基)或鹵基。某些化合物中，R_5非為低級烷基(例如，甲基)。

本發明實施例包括式：



的化合物與該式的化合物之藥物可接受鹽類，其中：各個R_{1A}獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2為氫或任選取代的烷基；各個R_{2A}獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3為鹵基、$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$或$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5為鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及n為0、1或2。

特定化合物係如：當R_2為氫時，R_3與R_5非兩者皆為苯基；當R_{1A}為經取代之嘧啶、R_2為氫且R_3為經取代之苯基時，R_5非為甲基；當R_2為氫時，R_3與R_5非兩者皆

為甲基；且當 R_{1A} 為經取代之苯基、R_2 為氫且 R_3 為經取代之苯基時，R_5 非為氫。

某些化合物中，R_{1A} 為經取代之烷基。特定化合物中，R_{1A} 由下列一或更多取代：氰基、鹵基、羥基、$-N(R_{1B})_2$、$-S(O)_pR_{1B}$、$-S(O)_pOR_{1B}$、$-S(O)_pN(R_{1B})_2$、$-C(O)OR_{1B}$、$-C(O)N(R_{1B})_2$ 或 $-C(O)N(R_{1B})S(O)_pR_{1B}$；其中各個 R_{1B} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及 p 為 0、1 或 2。

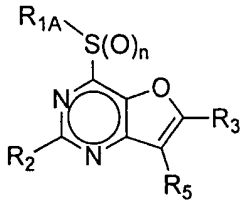
某些化合物中，R_{1B} 由下列一或更多任選取代：烷氧基、烷基、胺基(包括烷胺基、二烷胺基)、芳基、羧酸、氰基、鹵基、雜環或羥基。特定化合物中，R_{1B} 為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。某些化合物中，R_{1B} 為氫或烷基。

某些化合物中，R_2 為氫或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_3 為烷基或鹵基。

某些化合物中，R_5 為烷基或鹵基。

本發明實施例包括式：



的化合物及該式之化合物之藥物可接受鹽類，其中：各個 R_{1A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_2 為氫或任選取代的烷基；各個 R_{2A} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_3 為鹵基、

$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$ 或 $-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個 R_{3A} 獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；R_5 為鹵基、$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$ 或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；各個 R_{5A} 獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及 n 為 0、1 或 2。

特定實施例係如：化合物非為 2-((6,7-二苯基呋喃[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-1-口末啉乙酮。實施例係例如 R_3 與 R_5 非兩者皆為苯基。

某些化合物中，R_{1A} 為經取代之烷基。特定化合物中，R_{1A} 由一或更多下列取代：氰基、鹵基、羥基、$-N(R_{1B})_2$、$-S(O)_pR_{1B}$、$-S(O)_pOR_{1B}$、$-S(O)_pN(R_{1B})_2$、$-C(O)OR_{1B}$、$-C(O)N(R_{1B})_2$ 或 $-C(O)N(R_{1B})S(O)_pR_{1B}$；其中各個 R_{1B} 獨立地為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及 p 為 0、1 或 2。

某些化合物中，R_{1B} 由下列一或更多任選取代：烷氧基、烷基、胺基(包括烷胺基、二烷胺基)、芳基、羧酸、氰基、鹵基、雜環或羥基。特定化合物中，R_{1B} 為氫或任選取代的烷基(例如，低級烷基)或芳基。某些化合物中，R_{1B} 為氫或烷基。

某些化合物中，R_2 為氫或任選取代的烷基。

某些化合物中，R_3 為烷基或鹵基。

某些化合物中，R_5 為烷基或鹵基。

如本文所述的結合試驗所確定，特定化合物的 IC_{50} 低於約 0.1、0.05 或 0.025 μM。如本文所述的報導基因試驗所確定，特定化合物的 EC_{50} 低於約 5、2.5 或 1 μM。

可藉由本文揭露的方法以及技術習知的方法來製備本發明的化合物(即，本文揭露的化合物)。參見例如 Stewart 等人的美國專利第 6,579,882 號；Wiesenfeldt 等人的歐洲專利 0447891。

1.3. 治療方法

本發明包含刺激患者中內皮質骨形成的方法，該方法包括對有需要的患者施加有效劑量的本發明化合物。本發明亦包含增加皮質骨厚度的方法，該方法包括對有需要的患者施加有效劑量的本發明化合物。

本發明包含治療、管理或預防與骨損失相關的疾病或異常的方法，該方法包括對有需要的患者施加治療或預防有效劑量的本發明化合物。疾病與異常的實例包括骨質疏鬆(例如，停經後骨質疏鬆、類固醇或糖皮質類固醇引發的骨質疏鬆)、骨質缺乏與佩吉特氏病(Paget's disease)。

本發明亦包含治療、管理或預防骨折的方法，該方法包括對有需要的患者施加治療或預防有效劑量的本發明化合物。特定骨折與轉移性骨疾病(即，轉移至骨的癌症)相關。可轉移至骨的癌症實例包括前列腺癌、乳癌、肺癌、甲狀腺癌與腎臟癌。

本發明亦包含治療、管理或預防與疾病或異常相關或由疾病或異常所導致之骨損失的方法，該方法包括對有需要的患者施加治療或預防有效劑量的本發明化合物。疾病與異常之實例包括腹腔性疾病(celiac disease)、克隆氏症(Crohns Disease)、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、副甲狀腺機能亢進症、發炎性腸道疾病與潰瘍性大腸炎。

可自本發明之方法受益的患者實例包括年滿55歲或更老的男人與女人、停經後婦女、與罹患腎功能不全的患者。

可搭配(例如，同時或不同時)其他習知可用於治療、管理或預防影響骨骼之疾病或症狀的藥物來施加本發明之化合物。實例包括：雄激素受體調節劑；雙磷酸鹽；抑鈣激素(calcitonin)；鈣感測受體拮抗劑；組織蛋白酶K(cathepsin K)抑制劑；雌激素與雌激素受體調節劑；整合素(integrin)結合劑、抗體與受體拮抗劑；副甲狀腺素(PTH)與副甲狀腺素之類似物與模擬物；以及維生素D與合成維生素D類似物。

雄激素受體調節劑的實例包括菲那雄胺(finasteride)與其他5α-還原酶抑制劑、尼魯米特(nilutamide)、氟他胺(flutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、利阿唑(liarozole)與乙酸阿比特龍酯(abiraterone acetate)。

雙磷酸鹽的實例包括阿侖膦酸鹽(alendronate)、西米德諾內(cimadronate)、克羅多納(clodronate)、依替膦酸

鹽(etidronate)、伊班膦酸鹽(ibandronate)、因卡膦酸鹽(incadronate)、米諾膦酸鹽(minodronate)、奈立膦酸鹽(neridronate)、奧帕膦酸鹽(olpadronate)、帕米德諾內(pamidronate)、派里德諾內(piridronate)、利塞膦酸鹽(risedronate)、泰魯膦酸鹽(tiludronate)與唑來膦酸鹽(zolendronate)與上述藥物之可接受鹽類與酯類。

組織蛋白酶K抑制劑的實例包括VEL-0230、AAE581(巴利卡替(balicatib))、MV061194、SB-462795(瑞拉卡替(relacatib))、MK-0822(奧達卡替(odanacatib))與MK-1256。

雌激素與雌激素受體調節劑的實例包括天然雌激素(例如，7-雌二醇、雌酮與雌三醇)、結合態雌激素(例如，結合態馬雌激素)、口服避孕劑、硫酸化雌激素、黃體素、雌二醇、曲洛西芬(droloxifene)、雷洛西芬、拉索西芬(lasofoxifene)、TSE-424、泰莫西芬(tamoxifen)、艾多西芬(idoxifene)、LY353381、LY117081、托瑞米芬(toremifene)、氟維司群(fulvestrant)、4-[7-(2,2-二甲基-1-側氧丙氧基-4-甲基-2-[4-[2-(1-吡啶基)乙氧基]苯基]-2H-1-苯并哌喃基-3-基]-苯基-2,2-二甲基丙酸酯、4,4'-二羥二苯基酮-2,4-二硝苯基-腙與SH646。

整合素結合劑、抗體與受體拮抗劑的實例包括維他新(vitaxin)(MEDI-522)、西侖吉肽(cilengitide)與L-000845704。

1.4. 藥物配方

本發明包含藥物組合物，該等藥物組合物包括一或更多本發明的化合物與選擇性的一或更多其他藥物(例如上述那些藥物)。

某些藥物組合物係適合口服、黏膜式施用(例如，鼻部、舌下、陰道、頰內或直腸式)、非腸胃式施用(例如，皮下、靜脈內、快速注射(bolus injection)、肌肉內或動脈內)或皮膚滲透式施用於患者的單一單位(single unit)劑型。劑型的實例包括(但不限於)：藥片(tablet)；糖衣錠(caplet)；膠囊(capsule)，例如軟式彈性凝膠膠囊(soft elastic gelatin capsule)；膠囊(cachet)；片劑(troche)；錠劑(lozenge)；擴散劑(dispersion)；栓劑(suppository)；藥膏(ointment)；泥罨劑(cataplasm)(糊藥(poultice))；糊劑(paste)；藥粉(powder)；軟膏(dressing)；乳膏(cream)；膏藥(plaster)；藥水(solution)；貼片(patch)；氣霧劑(aerosol)(例如，鼻部噴霧器或吸入器)；凝膠(gel)；適合口服或黏膜式施用於患者的液體劑型，包括懸浮劑(例如，水相或非水相液體懸浮劑，水基乳劑(oil-in-water emulsion)或油基液體乳劑(water-in-oil liquid emulsion))、藥水與酏劑(elixir)；適合非腸胃式施用於患者的液體劑型；以及滅菌固體(例如，結晶或非晶固體)，該滅菌固體可經重新構成以提供適合非腸胃式施用於患者的液體劑型。

該配方應與施用模式相稱。例如，口服需要腸溶包膜(enteric coating)以保護本發明之化合物在胃腸道中不被分解。同樣地，配方可含有能幫助運送活性成分至作用位置的成分。例如，為了保護化合物免於酵素的分解、幫助化合物在循環系統內的運送及使化合物有效穿透細胞膜至細胞內等目的，可用脂質體配方來施用化合物。

劑型之成分、外形與類型將取決於劑型之應用而有所改變。例如，用在疾病急性治療之劑型比起用在相同疾病慢性治療之劑型而言包含較大量的一或更多種活性成分。同樣地，非腸胃式劑型比起用於治療相同疾病之口服劑型而言包含較少量的一或更多種活性成分。本發明包含之特定劑型的該等與其他方面彼此之間有所不同，且熟悉技術人士可輕易理解之。參閱，例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Mack Publishing, Easton PA (1990)。

本發明的藥物組合物較適合口服。適合口服施用的劑型包括藥片(例如，可咀嚼的藥片)、糖衣錠、膠囊及液體(例如，調味糖漿)。該等劑型含有預定劑量的活性成分，並且可以利用熟悉技術人士習知的藥學方法來製備，可以參照 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版(Mack Publishing, Easton PA: 1990)。

典型口服劑型的製備，依照習知的藥物化合技術，係於適當的混合物中以至少一賦形劑(excipient)化合活性

成分。賦形劑可以依據施用所欲之製備劑型而有許多不同的種類選擇。

因為施用的便利性，藥片及膠囊為最有效的口服單位劑型。如果有需要，藥片可以利用標準水溶液或非水溶液技術進行外部塗層。該等劑型可以利用習知的配藥學方法來製備。一般來說，藥物組合物及劑型的製備，係將活性成分與液體載體(liquid carrier)、微細的固體載體(solid carrier)或二者，進行均質且充分的混合，然後若需要的話形塑所得產物成為所欲形狀。固體劑型必須添加崩解劑(disintegrant)以幫助快速的溶解。亦可添加潤滑劑(lubricant)以助於劑型(例如，藥片)的製造。

2. 實例

2.1. 基因剔除小鼠

利用來自 OMNIBANK 的突變鼠科 ES 細胞株集合的相應突變胚胎幹細胞(ES)株，來產生在人類 NOTUM 基因的鼠科同源中基因工程突變的同型合子小鼠(大致參見美國專利第 6,080,576 號)。簡而言之，將包含突變病毒插入鼠科 NOTUM 基因座的 ES 細胞株顯微注入囊胚中，接著將囊胚植入假孕雌性宿主並承載至足月(to term)。將得到的嵌合後代接著與 C57BL/6 雌性小鼠繁殖，並檢查後代基因剔除 NOTUM 對偶基因的生殖腺傳遞。接著

繁殖突變 NOTUM 對偶基因的異型合子動物以產生比例大致為 1：2：1 的突變 NOTUM 對偶基因的同型合子後代、突變 NOTUM 對偶基因異型合子的後代或野生型後代。

搭配破壞 NOTUM 基因的異型合子(+/-)小鼠與野生型(+/+)同窩小鼠來研究破壞 NOTUM 基因的同型合子(-/-)小鼠。此研究過程中，小鼠接受醫療作業，該醫療作業利用醫療診斷程序的整合套件來評估哺乳類個體的主要器官系統的功能。藉由在上述數目的「基因剃除」同型合子(-/-)小鼠中研究並搭配異型合子(+/-)小鼠與野生型(+/+)同窩小鼠，可取得更可靠且重複性的數據。

如第 1 圖所示，在 16 周大時，具有破壞 NOTUM 基因的同型合子雄性小鼠(「homs」)相較於具有破壞 NOTUM 基因之野生型同窩小鼠而言，在不同骨骼位置呈現較大的皮質厚度(兩組的小鼠數目 N = 10)。藉由微型電腦斷層掃描(Scanco μCT40)來測量該等差異：中段股骨處的 28% ($p < 0.001$)；中段肱骨處的 19% ($p < 0.001$)；中段脛骨處的 17% ($p < 0.001$)；與脛骨-腓骨結合處的 11% ($p < 0.001$)。如第 2 圖所示，在 16 周大時，NOTUM 突變的異型合子小鼠(「hets」)的中段股骨皮質骨厚度亦比 NOTUM 突變的野生型同窩小鼠來的大：雄性 hets (N = 50)比起雄性野生型同窩小鼠(N = 23)呈現 6% ($p = 0.007$)的提高；而雌性 hets (N = 57)比起雌性野生型同窩小鼠(N = 22)呈現 9% ($p < 0.001$)的提高。

NOTUM動物中觀察的骨形成再分配的實際表現由第3圖與第4圖所反映，第3圖與第4圖顯示利用標準4點彎曲試驗的股骨斷裂強度試驗的結果(由SkeleTech(現為Ricerca Biosciences)所執行)。第3圖提供自16周大的雄性小鼠取得的結果，如第3圖所示，比起雄性野生型同窩小鼠(N = 23)，hets (N = 20)呈現股骨斷裂強度5%(p = 0.54)的提高，而homs (N = 17)呈現股骨斷裂強度28% (p < 0.001)的提高。另一方面，NOTUM homs與hets兩者的脊椎骨壓迫試驗並未顯示最大脊椎骨壓迫負載如同野生型對照般顯著降低。在16周大的雌性小鼠上取得相似結果。如第4圖所示，比起雌性野生型同窩小鼠(N = 21)，hets (N = 20)呈現股骨斷裂強度12% (p = 0.04)的提高，而homs (N = 18)呈現股骨斷裂強度28% (p < 0.001)的提高。該等數據與其他數據的分析顯示皮質厚度與股骨斷裂強度間的強烈關連。

2.2. 報導分析

利用此分析來測定化合物的EC_{50}值，此分析利用如下所述配置的條件培養基。將包含人類背板果膠乙醯轉移酶於pcDNA3.1(+)載體中之質體轉染進入HEK293細胞，並在400 μg/mL的G418存在下生長來選擇株落。維持條件培養基中包含最高表現的人類背板果膠乙醯轉移酶的株落以用於所有未來的活性分析。自ATCC購買過度表現與分泌進入條件培養基的L細胞。

分析步驟如下。在 15-cm 盤中將五百萬個 CellSensor®LEF/TCF-bla FreeStyle™ 293F 細胞生長至接近滿盤。細胞生長培養基由 DMEM 與 10%透析 FBS、5 μg/ml Blasticidin (Invitrogen，R210-01)、0.1 mM NEAA、25 mM HEPES 與 1×GPS 所構成。接著以胰蛋白酵素處理細胞，步驟如下：首先以 PBS 清洗細胞，接著添加 5 mL 的胰蛋白酵素並讓盤在室溫下培養兩分鐘。接著在每個 15 cm 盤添加總共 10 mL 的分析媒介 (Opti-MEM，添加 0.5%透析 FBS、0.1 mM NEAA、1mM 丙酮酸鈉、10 mM HEPES、1x GPS)。計算細胞數目並懸浮成每毫升 0.75 百萬個細胞。將細胞以每個孔每 20 μL 有 15000 個細胞的密度植入 Biocoat 384 孔的盤(Fisher，目錄號#356663)。在 37°C 下培養細胞 3 個小時後，在每個孔中添加 10 μL 的分析媒介中的 30 mM LiCl，接著在 37°C 下培養另外 3 個小時。同時，利用 ECHO 將化合物聲學上擊入 Greiner 384 孔的盤(目錄號# 781076)，接著添加每孔 10 μL 的 Wnt3a 條件培養基與每孔 10 μL 的背板果膠乙醯酯酶-條件培養基。接著自 Greiner 盤將 10 μL 的 Wnt3a/背板果膠乙醯轉移酶混合物轉移至 384 孔的盤(含有 CellSensor 細胞)的各個孔。在 37°C 下培養細胞整夜後，藉由添加 5 μL 的 1xCCF4 (Invitrogen，目錄編號 K1085)至各個孔來讓反應展開，覆蓋整個 384 孔的盤，並在黑暗中且室溫下溫和地搖擺 3 小時。接著在 Envision

Plate Reader 上利用 400 nm 的激發波長與 460 nm 與 535 nm 的發射波長來讀取盤。

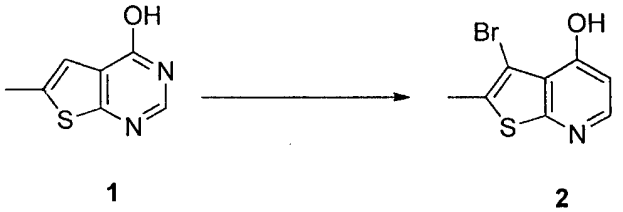
2.3. 結合分析

利用此分析來測定化合物的 IC_{50} 值，此分析利用 8-辛醯氧芘-1,3,6-三磺酸三鈉(OPTS)，OPTS 為酯酶與脂肪酶之螢光分析的水溶性酵素基質。將包含人類背板果膠乙醯轉移酶於 pcDNA3.1(+)載體中之質體轉染進入 HEK293 細胞，並在 400 μg/mL 的 G418 存在下生長來選擇株落。將來自該等細胞的狀態培養基(condition media)用於分析。

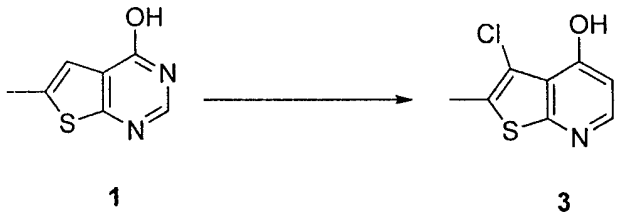
利用 ECHO 以聲學上配置 75 nL 的化合物進入乾 Greiner 384 孔的盤(目錄號# 781076)，接著添加 10 uL 的 50 mM Tris/HCl (pH 6.8)至該等 384 孔的分析盤的每個孔中。以分析緩衝液(50 mM Tris，pH 6.8，5 mM $CaCl_2$，0.5 mM $MgCl_2$)稀釋含有人類背板果膠乙醯轉移酶的條件培養基 75 倍，並將 25 μL 的此種「酵素混合」添加至各個孔接著為 10 分鐘的預培養。藉由添加 15 μL 的 OPTS 基質(Sigma，目錄號# 74875)至 5 μM 的最終濃度來啟動酵素反應且在室溫下反應時間為 10 分鐘。在 Envision Plate Reader 上以 485nm 的激發波長與 535 nm 的發射波長來讀取所有盤。

2.4. 一般合成方法 A：3-氯-2-甲基噻吩駢[2,3-*b*]吡啶-4-醇(2)；3-溴-2-甲基噻吩駢[2,3-b]吡啶-4-醇(3)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



1 2



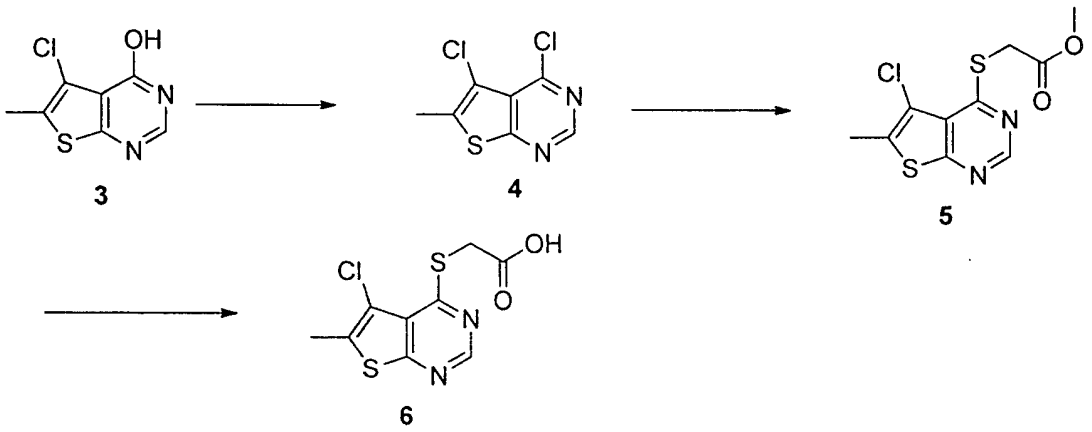
1 3

在 100 mL 的圓底燒瓶中，6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-醇 **1** (1g，6.2 mmol)溶解於乙酸(12 mL)中並在室溫下攪拌。對此添加溴(0.3 mL，6.2 mmol)並在室溫下攪拌反應混合物整夜。接著以冰淬滅反應並攪拌至冰融化。接著過濾產物、以水清洗產物並乾燥以取得乾燥產物狀的 3-溴-2-甲基噻吩駢[2,3-b]吡啶-4-醇 **2** (1g，66%產率)。

在 3 L 的圓底燒瓶中，6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-醇 **1** (50 g，310 mmol)溶解於乙酸(525 mL)中並添加 NCS (37.5 g，372 mmol)。在 55°C 下加熱反應達 8 小時。反應接著冷卻至室溫，以水淬滅反應，並二氯甲烷萃取化合物(2 x 250 mL)。以鹵水清洗結合之有機層並在 $MgSO_4$ 上乾燥，過濾並濃縮，產出 3-氯-2-甲基噻吩駢[2,3-b]吡啶-4-醇的固體 **3** (42.15 g，70%產率)。

2.5. 一般合成方法 B：2-(5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(6)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



4 的合成：將 3-氯-2-甲基噻吩駢[2,3-b]吡啶-4-醇 **3** (40 g，2000 mmol，1 當量)懸浮於 $POCl_3$ (368 mL，4000 mmol，20 當量)中並加熱至 90°C 達 4 小時。在冷卻後，濃縮反應並將殘餘物冷卻至 0°C。接著緩慢添加冰水以確保 $POCl_3$ 的完整消耗。用乙酸乙酯萃取黑色溶液三次。以飽和 $NaHCO_3$ 水溶液清洗結合之有機萃取物兩次，以鹵水清洗結合之有機萃取物，在 $MgSO_4$ 上乾燥，過濾並濃縮，產出淺棕色固體 4,5-二氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **4** (41.6 g，93%產率)，在完全乾燥後隨即應用 **4**。

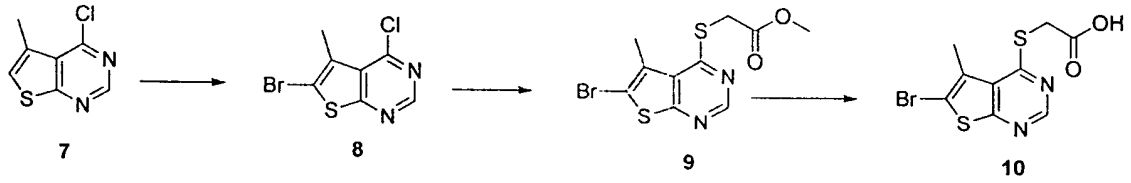
5 的合成：將 4,5-二氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **4** (40 g，182.2 mmol，1 當量)懸浮於甲醇(500 mL)中並冷卻至 0°C。緩慢地添加 2-巯基乙酸甲酯(27 mL，191.5 mmol，1.05 當量)，接著緩慢地添加 TEA (53 mL，382.6 mmol，2.1 當量)。在攪拌 90 分鐘後，濃縮反應。殘餘物溶解於

乙酸乙酯中並透過矽膠塞過濾以移除鹽類與某些色素。濃縮過濾物並利用矽膠層析法(具有己烷中的0-15%乙酸乙酯)純化過濾物，產出2-(5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯**5**(47.30 g，91%產率)的灰白色固體。

6的合成：2-(5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸酯**5**(45 g，150 mmol，1當量)溶解於THF(350 mL)中，並添加1 N的NaOH水溶液(300 mL，300 mmol，2當量)，且有效地攪拌。在40分鐘後，濃縮反應並讓殘餘物溶解於水中，冷卻至0°C並以1 N HCl酸化至低pH。透過真空過濾收集沉澱物，並以水清洗沉澱物。在真空下乾燥沉澱物整夜，產出純2-(5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸**6**(40.5 g, 94%產率)的白色固體。**MS** *m/z* $C_9H_7ClN_2O_2S_2$ $[M+1]^+$ = 275 and $[M+1]^{+3}$ = 277。**^{1}H NMR** (400 MHz，甲醇-d_4) δ ppm 8.66 (s, 1 H), 4.05 (s, 2 H), 2.54 (s, 3 H)。**^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 170.04 (s), 162.55 (s, 1C), 162.48 (s, 1C), 152.55 (s, 1C), 135.03 (s, 1C), 125.03 (s, 1C), 114.36 (s, 1C), 32.17 (s, 1C), 14.05 (s, 1C)。

2.6. 一般合成方法C：2-(6-溴-5-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(10)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



7 8 9 10

8 的合成：將根據一般合成方法 **B** 製備的 4-氯-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **7** (1g，5.4mmol)溶解於乙酸中，並在室溫下攪拌。對此反應混合物，添加溴(1 當量＝275 μL，5.4 mmol)並攪拌反應混合物整夜。接著以冰淬滅反應並攪拌到冰融化。接著過濾出產物，以水清洗產物，並乾燥之以取得 1g 淡黃色固體的 6-溴-4-氯-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **8** (786 mg，55%產率)。

根據一般合成方法 **B** 來製備化合物 **9** 與 **10**。

2.7. 一般合成方法 D：2-(5-環丙基-6-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯(12)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：

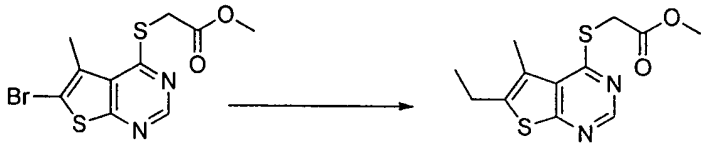
11 12

在 100 mL 的圓底燒瓶中，填充的 2-(5-溴-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **11** (0.100 g，0.3 mmol，1 當量)、環丙基硼酸(51 mgs，0.6 mmol)與三環己膦(8.4 mgs，0.03 mmol)與 K_3PO_4 (212 mgs，1.05 mmol)溶解於

甲苯與水混合物(4 mL，1：1)中。在室溫下且 N_2 氛圍中攪拌此混合物。對此攪拌溶液添加二乙醯氧基鈀(4 mgs，0.015 mmol)。接著在 100°C 下加熱反應混合物達 8 小時。添加 1 N HCl 來淬滅反應，並以 EtOAc 萃取水相部分三次。在 $MgSO_4$ 上乾燥結合之有機部分，過濾並濃縮以產生淡黃色固體的 2-(5-環丙基-6-甲基噻吩駢[2.3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯(40 mgs，45%產率) **12**。

2.8. 一般合成方法 E：2-(6-乙基-5-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯(13)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



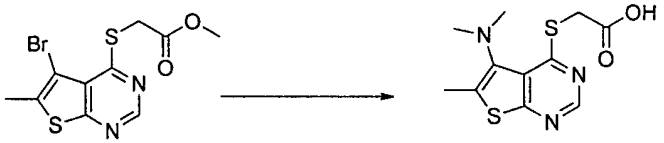
9　　13

在 100 mL 的圓底燒瓶中，將填充的根據一般合成方法 **C** 製備的 2-(6-溴-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **9** (50mg，0.15mmol)、與二乙基鋅(甲苯中 1.1M，204 μL，0.23mmol)、$Pd(dba)_3$ (4 mg，0.0075 mmol)與 2-二環己膦-2',6'-異丙氧二苯基(13 mg，0.03 mmol)溶解於微波容器中的乾燥 DMF (2.5mL)，並在 160°C 下的微波照射下加熱 10 分鐘。在將上述溶液冷卻至室溫後，透過矽藻土過濾並濃縮之。上述溶液溶解於 EtOAc 中並以水清洗之。以鹵水清洗有機層，在硫酸鎂上乾燥，並濃縮

以產生 2-(6-乙基-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **13** (17 mgs，40%產率)。

2.9. 一般合成方法 F：2-(5-(二甲胺)-6-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(14)的製備

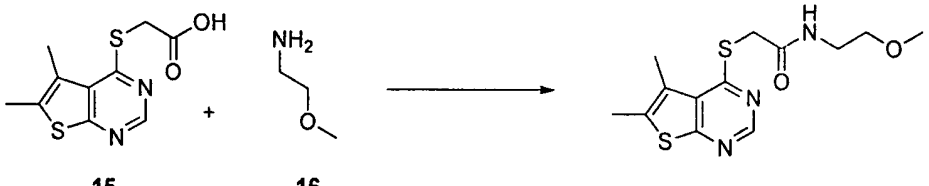
藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



將利用一般合成方法 **C** 製備的 2-(5-溴-6-甲基噻吩駢[2.3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **11** (100mg，0.3 mmol)溶解於 1mL (過量，作為溶劑)的二甲胺(40%，水中)中。接著添加催化數量的氧化銅，並在 140°C 下的微波照射下加熱反應 15 分鐘。接著藉由製備級 HPLC (乙酸銨/乙腈水溶液)純化反應分解物。分離物 **14** 為白色固體(60 mgs，71%產率)。

2.10. 一般合成方法 G：2-(5,6-二甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)-N-(2-甲氧基乙基)乙醯胺(17)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



將可商業上取得並亦可利用一般合成方法 **B** 製備的 2-(5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸 **15** (0.050 g，0.2 mmol，1 當量)溶解於 DMF (2.2 mL)中。對此混合物添加 2-甲氧基乙胺 **16** (0.019 g，0.24 mmol，1.2 當量)、HATU (0.076 g，0.2 mmol，1 當量)與 N,N-二異丙基乙胺(0.08 mL，0.44 mmol，2.2 當量)，並在室溫下攪拌反應混合物 8 小時。添加水以淬滅反應，且以 EtOAc 萃取液相部分三次。在 $MgSO_4$ 上乾燥結合之有機層，過濾並濃縮之。藉由利用中性條件之製備級 HPLC 來純化殘餘物，產出灰白色固體的 2-(5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)-N-(2-甲氧基乙基)乙醯胺 **17** (56 mg，90%產率)。

2.11. 一般合成方法 H：2-(5,6-二甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸異丙酯的製備(19)

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：

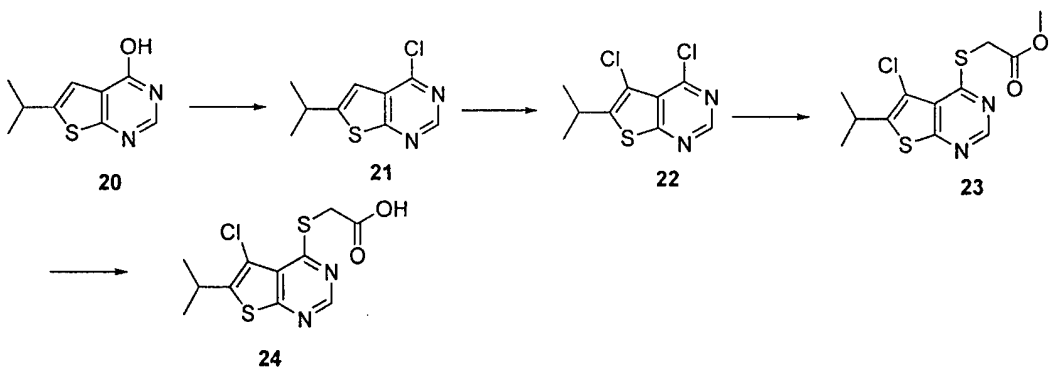
15 **18** **19**

將可商業上取得並亦可利用一般合成方法 **B** 製備的化合物 **15** (100 mg，0.4 mmol)溶解於乾 DCM 中，並添加亞硫醯氯(56 uL，0.8 mmol)且在室溫下攪拌 1 小時。接著添加過量的丙烷-2-醇 **18**，並在室溫下再攪拌 1 小時。

接著，濃縮反應混合物，並利用中性相製備級 HPLC（乙酸銨/乙腈水溶液）純化以產生固體的 **19**（100 mg，85%產率）。

2.12. 一般合成方法 I：2-(5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(24)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



21 的合成：將可商業上取得並亦可利用一般合成方法 **D** 製備的嘧啶酮 **20**（10 g，51.4 mmol，1 當量）懸浮於 $POCl_3$（95 mL，1028 mmol，20 當量）中並加熱至 90°C 達 4 小時。冷卻後，濃縮反應，並冷卻殘餘物至 0°C。接著緩慢添加冰水以確保 $POCl_3$ 的完全消耗。用乙酸乙酯萃取黑色溶液三次。用飽和 $NaHCO_3$ 水溶液清洗結合之有機萃取物兩次，用鹵水清洗一次，在 $MgSO_4$ 上乾燥，過濾並濃縮，產出淺棕色固體的 4-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **21**（10.16 g，93%產率），在 **21** 完全乾燥後隨即應用 **21**。

22 的合成：將固體 4-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **21** (9.2 g，43.2 mmol，1 當量)溶解於乙酸(75 mL)中，並添加 NCS (8.65 g，86.5 mmol，2 當量)。在 55°C 下加熱反應 6 小時。冷卻反應，以水淬滅之，並用二氯甲烷(2 x 50 mL)萃取化合物。用鹵水清洗結合之有機層並在 $MgSO_4$ 上乾燥，過濾並濃縮，產出固體的 4,5-二氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **22** (6.2 g，58%產率)。

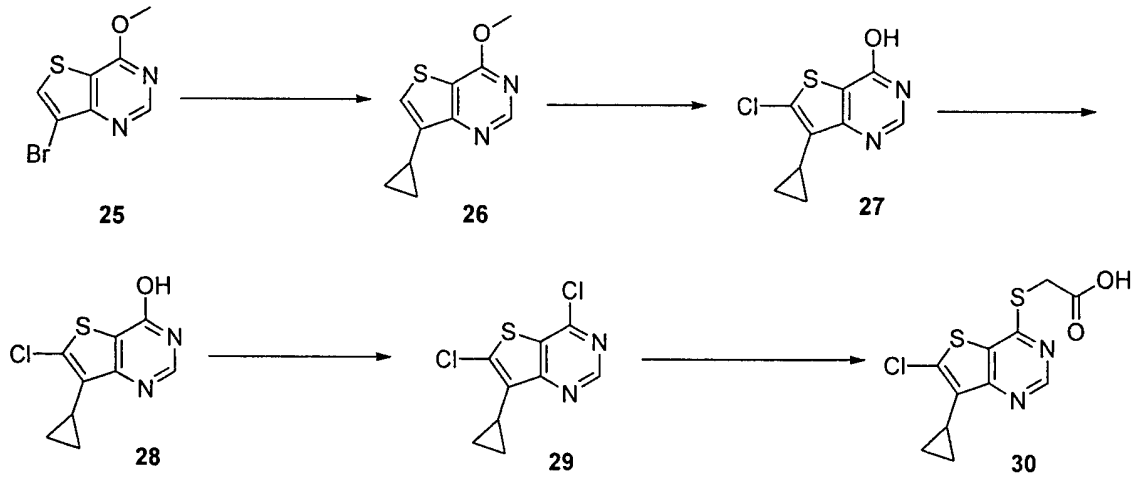
23 的合成：將 4,5-二氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶 **22** (11.6 g，47 mmol，1 當量)懸浮於甲醇(125 mL)中並冷卻至 0°C。緩慢地添加 2-巰基乙酸甲酯(6.86 mL，49.35 mmol，1.05 當量)，接著緩慢地添加 TEA (13.7 mL，98.7 mmol，2.1 當量)。攪拌 90 分鐘後，濃縮反應。將殘餘物溶解於乙酸乙酯中，並透過矽膠塞過濾以移除鹽類與某些色素。濃縮過濾物並利用矽膠層析法(己烷中的 0-15 % 乙酸乙酯)純化，產出灰白色固體的 2-(5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **23** (13.6 g，92%產率)。

24 的合成：將化合物 **23** (5.0 g，15.8 mmol，1 當量)溶解於 THF (50 mL)中並添加 1 N 的 NaOH 水溶液(32 mL，32 mmol，2 當量)且有效率地攪拌。在 40 分鐘後，濃縮反應並將殘餘物溶解於水中，冷卻至 0 °C 並用 1 N HCl 酸化至低 pH。透過真空過濾法收集沉澱物，並用水清洗之。在真空下乾燥整夜，產出白色固體的純 2-(5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸 **24** (4.5 g，94% 產率)。**MS** *m/z* $C_{11}H_{11}ClN_2O_2S_2$ $[M+1]^+ = 303$ and $[M+1]^{+3}$

= 305。**^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.83 (s, 1 H), 8.81 (s, 1 H), 4.12 (s, 2 H), 3.52 - 3.76 (m, 1 H), 1.32 (d, J=7.03 Hz, 6 H)。**^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 170.0 (s, 1C), 162.8 (s, 1C), 162.2 (s, 1C), 152.6 (s, 1C), 146.9 (s, 1C), 125.1 (s, 1C), 112.3 (s, 1C), 32.2 (s, 1C), 28.6 (s, 1C), 23.4 (s, 1C), 23.1 (s, 1C)。

2.13. 一般合成方法 J：2-(6-氯-7-環丙基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(31)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



26 的合成：在 500 mL 圓底燒瓶中，將裝填的 7-溴-4-甲氧基噻吩駢[3,2-d]嘧啶 **25** (4 g，16.32 mmol，1 當量)與環丙基硼酸(2.81 g，32.6 mmol，2 當量)與碳酸鉀(6.76 g，49 mmol，3 當量)與催化劑 $PdCl_2(Ph_3P)_2$ (575 mg，0.816 mmol，0.05 當量)溶解於甲苯(60 mL)與 H_2O (16 mL)的混

合物中。用 N_2 強烈淨化反應混合物 5 分鐘，並在 100°C 下加熱反應混合物 6 小時。在冷卻至室溫後，過濾反應混合物並分成兩層。用甲苯清洗液相層並濃縮結合之有機溶劑。利用矽膠管柱層析法(利用 EtOAc 與庚烷(10 – 30%)溶劑)來純化粗製材料，產出淡黃色固體的 7-環丙基-4-甲氧基噻吩駢[3,2-d]嘧啶 **26** (3 g，90%產率)。

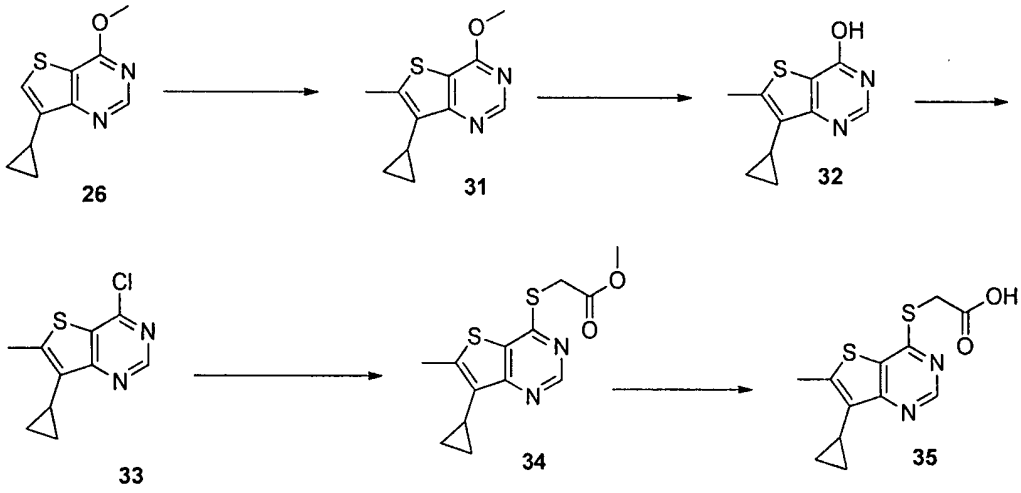
利用一般合成方法 **A** 合成化合物 **27**。

28 的合成：將 6-氯-7-環丙基-4-甲氧基噻吩駢[3,2-d]嘧啶(2 g，8.25 mmol)溶解於 12 N HCl (6 mL，72.5 mmol)中，並在 70°C 下加熱反應混合物 40 分鐘。在反應混合物冷卻至室溫後，將水(15 mL)添加至此淺褐色漿狀物並適當地混合。過濾出沉澱物並用水與庚烷清洗之。將沉澱物在 40°C 下乾燥整夜後，產出淡黃色固體(1.6 g，90%產率)。

利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **29**。利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **30**。**MS** *m/z* $C_{11}H_9ClN_2O_2S_2$ $[M+1]^+ = 301$ and $[M+1]^{+3} = 303$。**^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 8.92 (s, 1 H), 4.22 (s, 2 H), 2.10 - 2.20 (m, 1 H), 1.45 - 1.52 (m, 2 H), 0.96 - 1.06 (m, 2 H)。**^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 169.6 (s, 2C), 161.4 (s, 1C), 156.2 (s, 1C), 154.1(s, 2C), 134.4 (s, 1C), 125.9 (s, 1C), 31.9 (s, 1C), 10.2 (s, 1C), 6.3 (s, 2C)。

2.14. 一般合成方法 K：2-(7-環丙基-6-甲基噻吩駢[2,3-*d*]嘧啶-4-基硫)乙酸(35)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



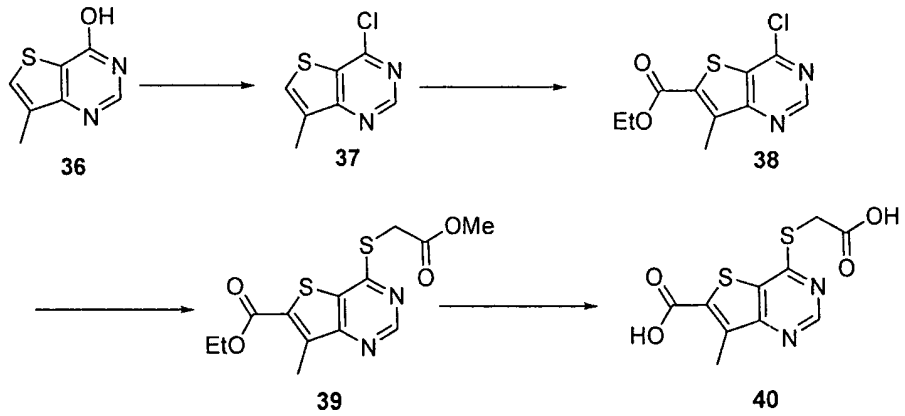
利用一般合成方法 **J** 合成化合物 **26**。

31 的合成：對 THF (60 mL)中的 N,N-二異丙基乙胺(14 mL，80 mmol)，在-60°C 下逐滴地添加 n-BuLi (37.5 mL，1.6 M，60 mmol)。在相同溫度下攪拌 15 分鐘後，添加一部分的化合物 **31** (4.14 g，20 mmol)並讓該化合物 **31** 在 45 分鐘內回溫至－45°C。接著將該化合物 **31** 再度冷卻至-60°C，並藉由緩慢地添加 MeI (5 mL，80 mmol)將 MeI 淬滅，並攪拌 2 小時將反應混合物回溫至室溫。在 2 小時後，用鹵水與水的混合物(100 mL)淬滅並分隔 THF 層。用二氯甲烷萃取液相層，並再度用鹵水清洗結合之有機溶劑，並通過 $MgSO_4$。利用矽膠層析法(利用乙酸乙酯/己烷混合物(10% - 30 %))來純化粗製產物，產出化合物 **32** (2.64 g，60%產率)。

利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **32-35**。**MS** *m/z* $C_{12}H_{12}N_2O_2S_2$ $[M+1]^+$ = 281。**^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.86 (br. s., 1 H), 8.85 (s, 1 H), 4.20 (s, 2 H), 2.65 (s, 3 H), 1.99 (tt, *J*=8.63, 5.43 Hz, 1 H), 1.23 - 1.30 (m, 2 H), 0.88 - 0.97 (m, 2 H)。

2.15. 一般合成方法 L：4-(羧甲基硫)-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-6-羧酸(40)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



可商業上取得化合物 **36**。利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **37**。

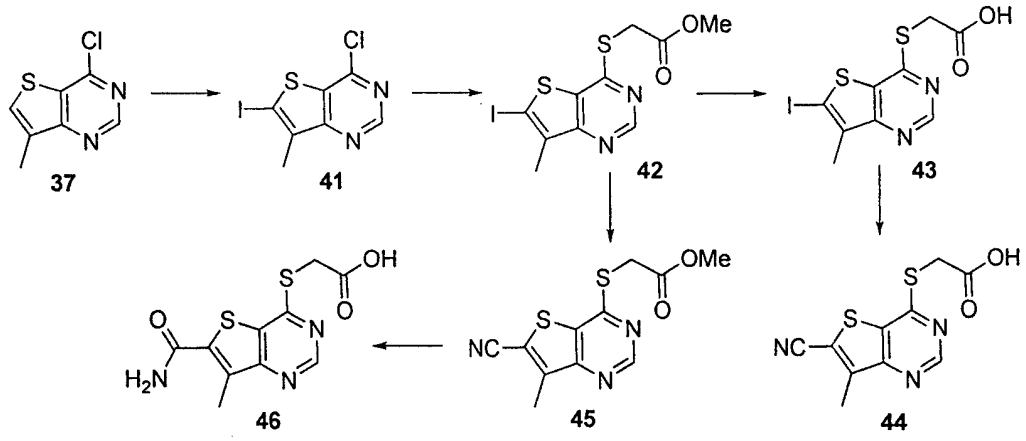
38 的合成：對-30 °C 下無水 THF (5 mL)中噻吩 **37** (368 mg，2 mmol，1.0 當量)的攪拌溶液添加 THF 中的 LDA 溶液(2.2 mmol，1.1 當量)(藉由在-30 °C 下 5 mL 的 THF 中混合 0.34 mL 的二異丙胺與 0.96 mL 的 2.5M nBuLi 來新鮮配置)。反應由清澈轉為黃色。在 20 分鐘後，逐滴添加氯甲酸乙酯(0.28 mL，3 mmol，1.5 當量)。在冷浴

槽中回溫至室溫後，藉由水來淬滅反應。用 10 mL 的乙酸乙酯來稀釋混合物，並用乙酸乙酯(10 mL，兩次)來萃取之。用鹵水清洗結合之有機層，在 Na_2SO_4 上乾燥，並濃縮。接著在矽膠上吸收粗製混合物，並藉由快速層析法(由 10% DCM/EA 洗提)純化以提供白色固體的酯類 **38** (127mg，25%產率)。

利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **39** 與 **40**。

2.16. 一般合成方法 M：2-(6-氰基-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基硫)乙酸(44)與 2-(6-胺甲醯基-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基硫)乙酸(46)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



41 的合成：對-30 °C 下無水 THF (5 mL)中利用一般合成方法 **B** 製備的 **37** (368 mg，2 mmol，1.0 當量)的溶液添加 THF 中的 LDA 溶液(2.2 mmol，1.1 當量)(藉由在-30 °C 下 5 mL 的 THF 中混合 0.34 mL 的二異丙胺與 0.96 mL 的 2.5M nBuLi 來新鮮配置)。反應由清澈轉為黃色。在

20 分鐘後，逐滴添加碘(609 mg，2.4 mmol，1.2 當量)。在冷浴槽中回溫至室溫後，藉由水來淬滅反應。用 10 mL 的乙酸乙酯來稀釋混合物，並用乙酸乙酯(10 mL，兩次)來萃取之。用鹵水清洗結合之有機層，在 Na_2SO_4 上乾燥，並濃縮。接著在矽膠上吸收粗製混合物，並藉由快速層析法(由 10%己烷/乙酸乙酯洗提)純化以提供白色固體的化合物 **41** (407 mg，65%產率)。

利用一般合成方法 **B** 合成化合物 **42** 與 **43**。

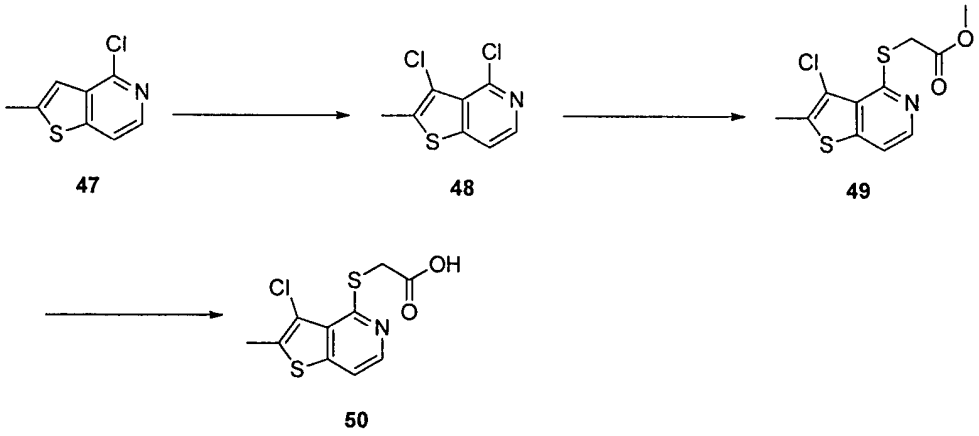
44 的合成：對 DMF (1 mL)中的化合物 **43** (70 mg，0.19 mmol，1 當量)添加 $Pd(PPh_3)_4$ (44 mg，0.038 mmol，0.2 當量)與 $Zn(CN)_2$ (30mg，0.25 mmol，1.1 當量)。在蓋上玻璃瓶之前，用 N_2 對玻璃瓶進行除氣 5 分鐘。接著在 100°C 下且微波照射下加熱反應 1.5 小時。移除所有溶劑，並藉由製備級薄層層析法純化殘餘物，產出白色固體(28 mg，42%產率)。**MS** *m/z* $C_{10}H_7N_3O_2S_2$ $[M+1]^+$ = 266.0；**^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 9.09 (s, 1 H), 4.12 (br. s., 2 H) 2.60 (s, 3 H)。

46 的合成：將利用一般合成方法 **M** 製備的化合物 **45** (40 mg，0.142 mmol，1 當量)溶解於 1 mL 的 MeOH 中。對此溶液添加 1N 的 NaOH (2.1 mL)。在藉由添加 1N 的 HCl 將得到之混合物中和之前，在室溫下攪拌得到之混合物。藉由製備級 HPLC 純化反應以提供白色固體的化合物 **46** (12 mg，29%產率)。**MS** *m/z* $C_{10}H_9N_3O_3S_2$ $[M+1]^+$ = 284.0，觀察到的 224。**^{1}H NMR** (400 MHz，氯仿-*d*) δ ppm

8.83 (s, 1 H) 6.06 - 6.36 (m, 2 H) 4.20 (s, 2 H) 2.77 (s, 3 H)。

2.17. 一般合成方法 N：2-(3-氯-2-甲基噻吩駢[3,2-c]吡啶-4-基硫)乙酸(50)的製備

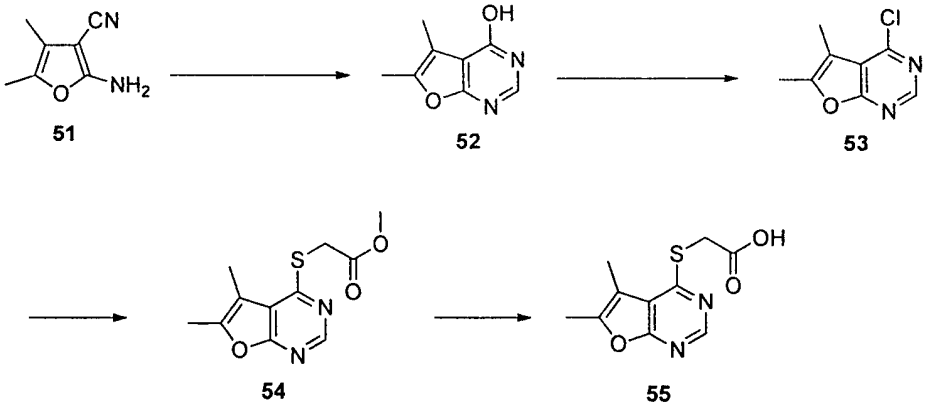
藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



可商業上取得化合物 47。利用一般合成方法 A 合成化合物 48。利用一般合成方法 B 合成化合物 49 與 50。

2.18. 一般合成方法 O：2-(5,6-二甲基呋喃[2,3-d]吡啶-4-基硫)乙酸(55)的製備

藉由下述之特定實例來描述合成本發明所包含之化合物的此種一般方法：



52 的合成：在 50 mL 圓底燒瓶中，將 2-胺-4,5-二甲基呋喃-3-甲腈 **51** (1g，7.4 mmol)溶解於作為溶劑的甲酸(15 mL)中。加熱此混合物至回流溫度達 6 小時。將反應冷卻至室溫並在真空幫浦下濃縮。接著將上述混合物溶解於二氯甲烷，並用 H_2O 清洗。接著讓粗製產物通過 Na_2SO_4，並濃縮以取得粗製二甲基呋喃嘧啶醇 **52** 作為粗製產物，**52** 係直接用於下一步驟。

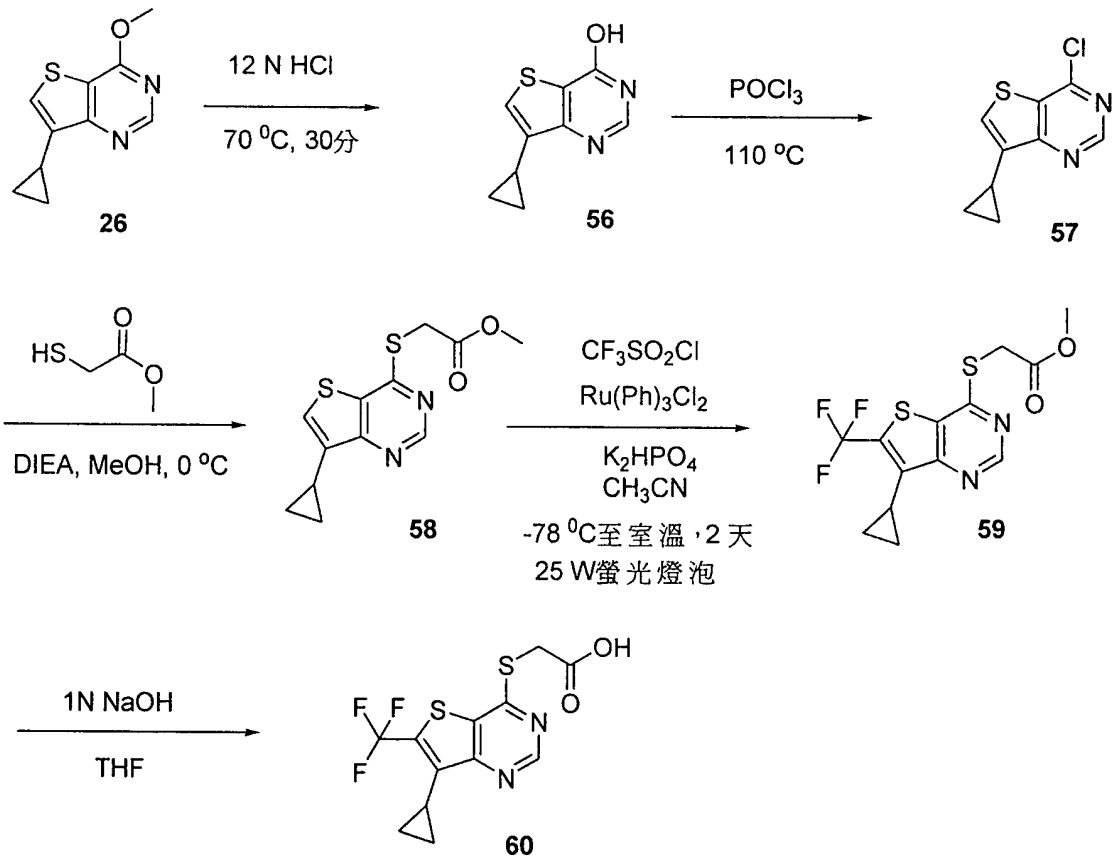
53 的合成：將 5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶-4-醇 **52** (700 mg，4.3 mmol，1 當量)懸浮於 $POCl_3$ (10 mL，100 mmol，23 當量)中並加熱至 90°C 達 3 小時。在冷卻後，濃縮反應並將殘餘物冷卻至 0°C。接著緩慢添加冰水以確保 $POCl_3$ 的完全消耗。用乙酸乙酯萃取黑色溶液三次。用飽和 $NaHCO_3$ 水溶液清洗結合之有機萃取物兩次，用鹵水清洗一次，在 $MgSO_4$ 上乾燥，過濾並濃縮，產出淺棕色固體的 4-氯-5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶 **53** (350 mg，55%產率)，在 **53** 完全乾燥後隨即應用 **53**。

54 的合成：將 4-氯-5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶 **53** (350 mg，1.91 mmol，1 當量)懸浮於甲醇(10 mL)中並冷卻至

0°C。緩慢地添加 2-巯基乙酸甲酯(0.13 mL，2.0 mmol，1.05 當量)，接著緩慢地添加 TEA (0.39 mL，3.84 mmol，2.1 當量)。在攪拌 90 分鐘後，濃縮反應。將殘餘物溶解於乙酸乙酯中並透過矽膠塞過濾以移除鹽類與某些色素。濃縮過濾物並利用矽膠層析法(己烷中的 0-15%乙酸乙酯)純化，產出固體的 2-(5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **54** (420 mg，90%產率)。

55 的合成：將 2-(5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯 **54** (400 mg，1.58 mmol，1 當量)溶解於 THF (10 mL)中，並添加 1 N 的 NaOH 水溶液(3.2 mL，3.2 mmol，2 當量)且有效地攪拌。在 40 分鐘後，濃縮反應並將殘餘物溶解於水中，冷卻至 0°C 並用 1 N 的 HCl 酸化至低 pH。透過真空過濾收集沉澱物，以水清洗之。將沉澱物在真空下乾燥整夜，產出固體的純 2-(5,6-二甲基呋喃[2,3-d]嘧啶-4-基硫)乙酸 **55** (353 mg，94%產率)。

2.19. 一般合成方法 P：2-(7-環丙基-6-(三氟甲基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸(60)的製備：



利用一般合成方法 **J** 合成化合物化合物 **26**、**56**、**57**、**58** 與 **60**。

59 的合成：在 100 mL 圓底燒瓶中裝配 $Ru(phen)_3Cl_2$ (14 mg，0.01 當量)與 K_2HPO_4 (930 mg，3 當量)，並在藉由注射器添加 MeCN (20 mL，0.125 M)與 2-(7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸乙酯 **58** (500 mg，1 當量)之前，透過交替的真空排出與氮回填(×3)對反應混合物進行除氣。在 -78 °C 下透過交替的真空排出與氮回填(×3)對得到的溶液進行除氣，並在各個重複之間讓溶液在氮

氣下回溫至室溫。藉由注射器添加三氟甲烷磺醯氯(0.4 mL，2 當量)並用石蠟膜(parafilm)密封玻璃瓶，並將玻璃瓶置放於 25 W 小型螢光燈泡約 2 cm 處。在 48 小時後，用水(2 mL)淬滅反應，並用 CH_2Cl_2 (×2)萃取之，並將結合之有機層在 $MgSO_4$ 上乾燥並在真空中濃縮。接著藉由製備級 HPLC(利用中性條件)來純化粗製材料以提供 10%產率的 2-(7-環丙基-6-(三氟甲基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯 **59** (62 mgs)。

2.20. 代表性化合物

在本文所述的一或更多個分析中製造多種化合物並試驗多種化合物之活性。將該等化合物的某些列示於下表 1 中，表 1 中，欄「製備」代表用於製造列舉化合物的一般合成方法。欄「HPLC 方法&時間(分鐘)」代表下列 HPLC 條件：

A： Sunfire C18 5u 4.6 x 50 mm，10%至 90% B，梯度時間 = 2 分，流率 = 3.5 mL/分，波長 = 220 與 254 nm，溶劑 A = 10 mM 乙酸銨水溶液，溶劑 B =乙腈。

B: Sunfire C18 5u 4.6 x 50 mm，10%至 90% B，梯度時間 = 2 分，流率 = 3.5 mL/分，波長 = 254 與 280 nm，溶劑 A =純水，溶劑 B = 95%甲醇/5%水以及 0.1%三氟乙酸(v/v)。

欄「IC_{50}」提供利用本文所述的結合分析測量的化合物的IC_{50}，其中：****代表低於或等於 0.025 μM 的數值；***代表低於或等於 0.05 μM 的數值；**代表低於或等於 0.1 μM 的數值；*代表低於或等於 0.25 μM 的數值；而--代表為測定不到IC_{50}。欄「EC_{50}」提供利用本文所述的報導分析測量的化合物的EC_{50}，其中：****代表低於或等於 1 μM 的數值；***代表低於或等於 5 μM 的數值；**代表低於或等於 10 μM 的數值；*代表低於或等於 15 μM 的數值；而--代表為測定不到EC_{50}。

表 1

化合物	製備	HPLC 方法 & 時間 (分)	純度 (%)	IC_{50}	EC_{50}
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(呋喃-2-基甲基)乙醯胺	G	A (1.742)	99	****	--

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.047)	99	****	****
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(5-甲基異口号唑-3-基)乙醯胺	G	A (1.763)	100	****	****
2-((6,7-二氫-5H-環戊[4,5]噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.188)	100	****	***
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-氟苯基)乙醯胺	G	--	90	****	--

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	H	A (1.927)	100	****	****
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-甲基乙醯胺	G	A (1.493)	98	****	****
1-(2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯)哌啶-4-甲醯胺	G	A (1.397)	99	*	--
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸丙酯	H	A (2.235)	100	****	****

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸丁酯	H	A (2.370)	100	****	****
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸異丙酯	H	A (2.217)	100	****	****
2-((6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (0.915)	100	*	**
2-((7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (0.915)	100	*	*
2-((5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (0.925)	100	**	--

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(乙磺醯基)乙醯胺	G	A (1.218)	100	****	--
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.440)	100	****	****
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-((四氫-2H-哌喃-2-基)氧)乙醯胺	G	A (1.760)	100	****	****
N-(環丙基磺醯)-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.235)	100	****	--

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-羥乙醯胺	G	A (1.970)	100	****	****
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-((5-甲基吡啶-2-基)磺醯)乙醯胺	G	A (1.273)	97	**	--
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-1-(異吲哚啉-2-基)乙酮	G	A (1.917)	99	****	**
2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-甲氧基-N-甲基乙醯胺	G	A (1.700)	97	****	****

2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(噻吩-2-基甲基)乙醯胺	G	A (1.820)	99	**	--
1-(5,6-二甲氧基異吲哚啉-2-基)-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酮	G	A (1.745)	100	****	--
N-氰基-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.162)	98	****	****
N-(4-氯-1H-吲唑-3-基)-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.733)	100	****	--

N-(2-(二甲胺)乙基)-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	B (1.490)	99	--	--
N-(3-(二甲胺)丙基)-2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	B (1.522)	99	--	--
2-((6-乙基-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,E	A (1.212)	100	****	--
2-((6-溴-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,C	A (1.145)	100	****	****

2-((5-溴-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.213)	99	****	****
2-((6-異丙基-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,D	A (1.305)	100	***	--
2-((5-環丙基-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	B,D	A (2.137)	100	****	--
2-((6-環丙基-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫) 乙酸甲酯	B,D	A (2.190)	100	****	--

2-((5-環丙基-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,D	A (1.238)	100	****	***
2-((6-環丙基-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,D	A (1.257)	99	--	***
2-((5-溴-6-乙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.408)	100	****	****
2-((6-溴-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.267)	99	****	--
2-((5-溴-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.345)	100	****	****

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.220)	92	****	****
2-((6-氯-5-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.265)	100	****	--
2-((6,7-二甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,D	A (1.127)	99	****	--
2-((6-環丙基-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,D	A (1.357)	98	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.138)	100	****	****

2-((7-氯-6-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.052)	100	--	--
2-((5-(二甲胺)-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B,F	A (1.088)	100	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	B	A (1.983)	100	****	****
2-((7,9-二甲基吡啶并[3',2':4,5]噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.320)	100	--	--

2-(吡啶并[3',2':4,5]噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基硫)乙酸	B	A (1.045)	100	--	--
2-(吡啶并[3',2':4,5]噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基硫)乙酸甲酯	B	A (1.770)	100	--	--
2-((5-氯-6-乙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.220)	100	****	****
2-((5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	I	A (1.325)	100	****	****

2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-氰基乙基)乙醯胺	G	A (1.893)	100	****	****
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-甲氧基乙基)乙醯胺	G	A (1.937)	100	****	****
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基) 硫)-N-(2-(哌啶-1-基)乙基)乙醯胺	G	A (1.663)	100	--	****

2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-甲基-2-吡咯啶基)乙醯胺	G	A (2.123)	100	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-甲基-2-(吡咯啶-1-基)丙基)乙醯胺	G	A (1.638)	99	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-甲氧基乙基)乙醯胺	G	A (1.687)	96	--	--

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-(哌啶-1-基)乙基)乙醯胺	G	A (1.658)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-氰基乙基)乙醯胺	G	A (1.805)	100	****	****
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-乙基乙醯胺	G	A (2.008)	100	****	****
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N,N-二甲基乙醯胺	G	A (2.020)	100	--	--

2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-口末啉乙基)乙醯胺	G	A (1.818)	98	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-丙基乙醯胺	G	A (2.150)	99	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-乙基乙醯胺	G	A (1.918)	100	****	****

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-甲基-2-(吡啶-1-基)丙基)乙醯胺	G	A (1.580)	99	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-丙基乙醯胺	G	A (2.105)	100	****	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-吡咯啉乙基)乙醯胺	G	A (1.778)	99	****	****

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N,N-二甲基乙醯胺	G	A (2.523)	100	****	****
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(4-甲氧基苄基)乙醯胺	G	A (2.172)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(吡啶-4-基甲基)乙醯胺	G	A (1.768)	99	****	--

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(噻吩-2-基甲基)乙醯胺	G	A (2.155)	100	****	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(2-(4-甲基噻唑-2-基)乙基)乙醯胺	G	A (1.968)	99	****	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-1-(4,4-二氟哌啶-1-基)乙酮	G	A (2.320)	100	--	--

N-(2-(1H-吡唑-4-基)乙基)-2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.712)	100	***	****
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(4-氰基苄基)乙醯胺	G	A (2.107)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(4-氰苄基)乙醯胺	G	A (2.203)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(呋喃-2-基甲基)乙醯胺	G	A (2.083)	100	****	****

2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(4-甲氧基苄基)乙醯胺	G	A (2.257)	99	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(4-氟苄基)乙醯胺	G	A (1.970)	97	--	--
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(噻吩-2-基甲基)乙醯胺	G	A (2.247)	100	--	****

2-(2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯)異吲哚啉-4-甲酸甲酯	G	A (2.420)	100	--	--
N-(2-(1H-咪唑-4-基)乙基)-2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯胺	G	A (1.532)	100	****	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(氰基甲基)乙醯胺	G	A (1.930)	100	****	****
2-((6-(三級丁基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	B	A (2.375)	100	--	--

2-((6-氯基-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	.	B (2.498)	97	--	****
2-((6-氯基-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	M	A (1.330)	96	--	****
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(氯基甲基)乙醯胺	G	A (2.003)	99	****	****
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸異丙酯	H	A (2.587)	100	****	****

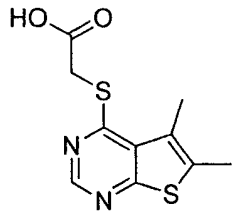
2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(1-甲基哌啶-4-基)乙醯胺	G	A (1.605)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-1-(4-異丙基哌口井-1-基)乙酮	G	A (1.947)	100	--	--
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(1-甲基哌啶-4-基)乙醯胺	G	A (1.557)	99	--	--

2-(2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-甲基乙醯胺)乙酸	G,B	A (1.648)	100	--	****
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(甲基磺醯)乙醯胺	G	A (1.522)	100	--	****
2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	J	A (1.927)	97	****	****
2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(1-羥丙烷-2-基)乙醯胺	G	B (2.543)	100	--	***

2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)-N-(1,3-二羥丙烷-2-基)乙醯胺	G	A (1.623)	99	--	--
(S)-1-(2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙醯)吡咯啶-2-甲酸甲酯	G	A (2.173)	99	--	--
2-((5-氯-6-丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	B	A (1.452)	97	****	****
2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸甲酯	J	A (2.858)	100	****	--

2-((7-環丙基-6-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	K	A (1.305)	100	****	****
2-((3-氯-2-甲基噻吩駢[3,2-c]吡啶-4-基)硫)乙酸	--	--	--	--	***
2-(7-環丙基-6-(三氟甲基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸	J,P	A (1.665)	96	****	****
2-(7-環丙基-6-(三氟甲基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸酯	J,P	A (2.495)	95	****	****

2.21. 2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學



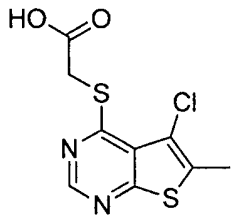
第一研究中，藉由在第 10.7 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 25 天，來確定 2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。在動物的飲食中施加化合物。應用四組小鼠：對照(N = 12)；25 mg/kg 的化合物(N = 9)；83 mg/kg 的化合物(N = 9)；與額外組，其中在飲食中施加 Li_2CO_3 (0.1%) (N = 9)。

利用 Scanco μCT40 來測量中段股骨的皮質厚度。相較於對照組，在化合物兩個劑量上均發現皮質骨厚度的增加：25 mg/kg 的 9% (p = 0.04)；與 83 mg/kg 的 8% (p = 0.07)。至於 Li_2CO_3 組，發現皮質骨厚度減少 2% (p = 0.90)。

第二研究中，一樣藉由在第 10.7 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 25 天，來確定 2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。在動物的飲食中施加化合物。應用四組小鼠：對照(N = 12)；1 mg/kg 的化合物(N = 9)；8 mg/kg 的化合物(N = 9)；與 24 mg/kg 的化合物(N = 9)。如第 5 圖所示，用 8 mg/kg 處理的小鼠呈現中段股骨皮質厚度增加 4% (p

= 0.19)，而用 24 mg/kg 處理的小鼠呈現中段股骨皮質厚度增加 6% (p = 0.05)。

2.22. 2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學



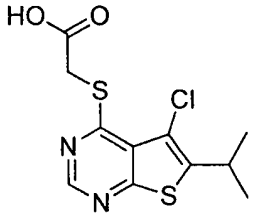
在 Fischer 344 卵巢切除大鼠中研究 2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學。大鼠在第 43 或 46 周大時進行卵巢切除或佯作手術，並在其後用化合物開始 37 或 40 周的治療，到第 83 周大。

應用四個治療組：佯作手術，給予對照飲食(N = 14)；佯作手術，給予化合物(N = 12)；OVX-手術，給予對照飲食(N = 14)；與 OVX-手術，給予化合物(N = 12)。藉由將化合物併入大鼠飲食中來給藥：每公斤飲食中 0.46 克化合物。目標劑量為 30 mg/kg。服藥存在五周。

藉由 microCT 利用 Scanco μCT40 來測定骨質與骨骼結構。如第 6 圖所示，治療增加了佯作與 OVX 兩組的中段股骨皮質骨厚度：完整大鼠的 3%與卵巢切除大鼠的 5%。佯作對照與 OVX 對照的皮質骨厚度之間的差異為 -13%。二因子 ANOVA 值為：OVX 手術的 $p < 0.001$；治療的 $p = 0.05$；而互動的 $p = 0.65$。

如第 7 圖所示，治療亦增加佯作與 OVX 兩組的中段脛骨皮質厚度：完整大鼠的 2%與卵巢切除大鼠的 5%。二因子 ANOVA 值為：OVX 手術的 p = 0.79；治療的 p = 0.05；而互動的 p = 0.52。

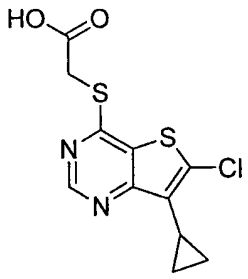
2.23. 2-((5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學



藉由在第 8.7 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 25 天，來確定 2-((5-氯-6-異丙基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。藉由管餵每日施加兩次化合物(載體=水中的 0.1% Tween 80)。應用四組小鼠：對照(N = 13)；5 mg/kg 的化合物(N = 13)；10 mg/kg 的化合物(N = 13)；15 mg/kg 的化合物(N = 13)。

藉由 microCT (Scanco μCT40)來測量中段股骨的皮質厚度。相較於對照組，在所有劑量上均發現皮質骨厚度的增加：5 mg/kg 的 6% (p = 0.002)；10 mg/kg 的 5% (p = 0.007)；與 15 mg/kg 的 6% (p = 0.001)。

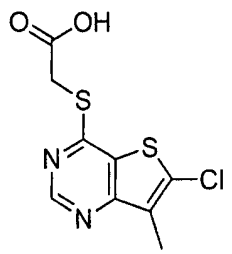
2.24. 2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學



藉由在第 8.7 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 25 天，來確定 2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。藉由管餵每日施加化合物(載體= 水中的 0.1% Tween 80)。應用四組小鼠：對照(N = 13)；3 mg/kg 的化合物(N = 13)；10 mg/kg 的化合物(N = 13)；30 mg/kg 的化合物(N = 13)。

藉由 microCT (Scanco μCT40)來測量中段股骨的皮質厚度。如第 8 圖所示，相較於對照組，在所有劑量上均發現皮質骨厚度的增加：3 mg/kg 的 7% ($p = 0.003$)；10 mg/kg 的 10% ($p < 0.001$)；與 30 mg/kg 的 13% ($p < 0.001$)。

2.25. 2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的藥理學



第一實驗中，藉由在第 54 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 25 天，來確定 2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。藉由管餵每日施加化合物(載體= 水中的 0.1% Tween 80)。應用三組小鼠：對照(N = 10)；10 mg/kg 的化合物(N = 10)；與 100 mg/kg 的化合物(N = 10)。相較於對照組，在兩個劑量上發現中段股骨的皮質骨厚度的增加(由 microCT (Scanco μCT40)所測量)：10 mg/kg 的 6% (p = 0.06)；與 100 mg/kg 的 7% (p=0.03)。此實驗中，如同一般實例般，利用各個小鼠的右股骨來取得中段股骨的皮質厚度數據。此實驗中，10 mg/kg 劑量組的結果包括一個小鼠的左股骨測量，該小鼠的右股骨測量為異常的。

第二實驗中，藉由在第 8.1 周大時開始用化合物治療 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠達 7 天與 18 天，來確定 2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸的活體內效應。在動物飲食中施加化合物。應用三組小鼠：對照(N = 9)；34 mg/kg 的化合物進行 7 天(N = 9)；與 34 mg/kg 的化合物進行 18 天(N = 9)。如第 9 圖所示，相較於對照組，在兩個治療組上發現中段股骨的皮質骨厚度的增加：7 天治療後的 6% (p = 0.13)；與 18 天治療後的 10% (p < 0.01)。

將所有列示於上的參考資料(例如，專利與專利申請案)的全文以引用之方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

可參照附圖來了解本發明的某些態樣。

第 1 圖提供背板同型合子基因剔除小鼠(「HOM」)與背板野生型的那些同窩小鼠(「WT」)中不同骨頭位置的皮質厚度之間差異的圖解表示。

第 2 圖提供背板同型合子與異型合子(「HET」)基因剔除小鼠兩者相對於背板野生型同窩小鼠觀察到的皮質骨厚度的增加的圖解表示。

第 3 圖提供在雄性背板同型合子與異型合子基因剔除小鼠與雄性背板野生型同窩小鼠的骨頭上執行的股骨斷裂強度與脊椎骨壓迫試驗取得之結果的圖解表示。

第 4 圖提供在雌性背板同型合子與異型合子基因剔除小鼠與雌性背板野生型同窩小鼠的骨頭上執行的股骨斷裂強度與脊椎骨壓迫試驗取得之結果的圖解表示。

第 5 圖提供用 1 mg/kg、8 mg/kg 與 24 mg/kg 的背板抑制劑 2-((5,6-二甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸對 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠給藥 25 天後取得之中段股骨皮質厚度測量的圖解表示。

第 6 圖提供用 2-((5-氯-6-甲基噻吩駢[2,3-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸對 Fischer 344 卵巢切除大鼠給藥 5 周後取得之中段股骨皮質厚度測量的圖解表示，其中「佯作對照」代表大鼠並未切除卵巢且未施加化合物;「佯作加上化合

物」代表大鼠並未切除卵巢但卻施加化合物；「OVX 對照」代表大鼠進行卵巢切除但卻未施加化合物；而「OVX 加上化合物」代表大鼠進行卵巢切除且施加化合物。

第 7 圖提供與第 6 圖相關之相同實驗取得之中段脛骨皮質厚度測量的圖解表示。

第 8 圖提供用 3 mg/kg、10 mg/kg 與 30 mg/kg 的背板抑制劑 2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸對 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠給藥 25 天後取得之中段股骨皮質厚度測量的圖解表示。

第 9 圖提供用 34 mg/kg 的背板抑制劑 2-((6-氯-7-甲基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸對 F1 雄性雜交(129 x C57)小鼠給藥 7 天與 18 天後取得之中段股骨皮質厚度測量的圖解表示。

【主要元件符號說明】

201219401

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫）

※ 申請案號：100132460

※ 申請日期：2011 年 9 月 8 日

※IPC 分類：

C07D 495/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

背板果膠乙醯酯酶的雙環抑制劑及其用法

BICYCLIC INHIBITORS OF NOTUM PECTINACETYLESTERASE AND METHODS OF THEIR USE

二、中文發明摘要：

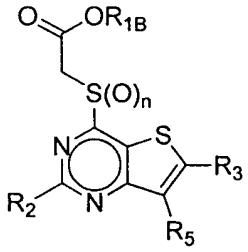
本發明描述可用於抑制背板果膠乙醯酯酶的化合物以及包含化合物的組合物以及可用上述化合物與組合物來治療影響骨的疾病與異常的應用方法。

三、英文發明摘要：

Compounds that may be used to inhibit Notum Pectinacetylesterase are described, as well as compositions comprising them, and methods of their use to treat diseases and disorders affecting the bone.

七、申請專利範圍：

1. 一種式：



的化合物或該化合物之一藥物可接受鹽類，其中：

R_{1B}為氫或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

R_2為氫、鹵基、

$-CO_2R_{2A}$、$-C(O)N(R_{2A})_2$、$-SR_{2A}$、$-OR_{2A}$或$-N(R_{2A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

各個R_{2A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

R_3為氫、鹵基、氰基、

$-CO_2R_{3A}$、$-C(O)N(R_{3A})_2$、$-SR_{3A}$、$-OR_{3A}$、$-N(R_{3A})_2$、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

各個R_{3A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

R_4為氫、鹵基或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

R_5為氫、鹵基、

$-CO_2R_{5A}$、$-C(O)N(R_{5A})_2$、$-SR_{5A}$、$-OR_{5A}$、$-N(R_{5A})_2$或任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；

各個R_{5A}獨立地為氫、任選取代的烷基、芳基、雜烷基或雜環；及

n為0、1或2；

其中「任選取代的」意指由一或更多下列任選取代：烷氧基、烷基、胺基(包括烷胺基、二烷胺基)、芳基、羧酸、氰基、鹵基、雜環或羥基。

2. 如請求項1所述之化合物，其中R_{1B}為氫或任選取代的烷基或芳基。

3. 如請求項1所述之化合物，其中R_2為氫或任選取代的烷基。

4. 如請求項1所述之化合物，其中R_3為任選取代的烷基或鹵基。

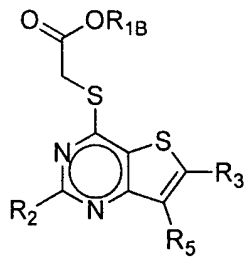
5. 如請求項4所述之化合物，其中R_3為氯。

6. 如請求項4所述之化合物，其中 R_3 為任選鹵化烷基。

7. 如請求項1所述之化合物，其中 R_5 為烷基或鹵基。

8. 如請求項7所述之化合物，其中 R_5 為低級烷基。

9. 如請求項1所述之化合物，該化合物為式：



。

10. 如請求項9所述之化合物，其中 R_{1B} 為氫或任選取代的烷基或芳基。

11. 如請求項9所述之化合物，其中 R_2 為氫或任選取代的烷基。

12. 如請求項9所述之化合物，其中 R_3 為任選取代的烷基或鹵基。

13. 如請求項 12 所述之化合物，其中 R_3 為氯。

14. 如請求項 12 所述之化合物，其中 R_3 為任選鹵化烷基。

15. 如請求項 9 所述之化合物，其中 R_5 為烷基或鹵基。

16. 如請求項 15 所述之化合物，其中 R_5 為低級烷基。

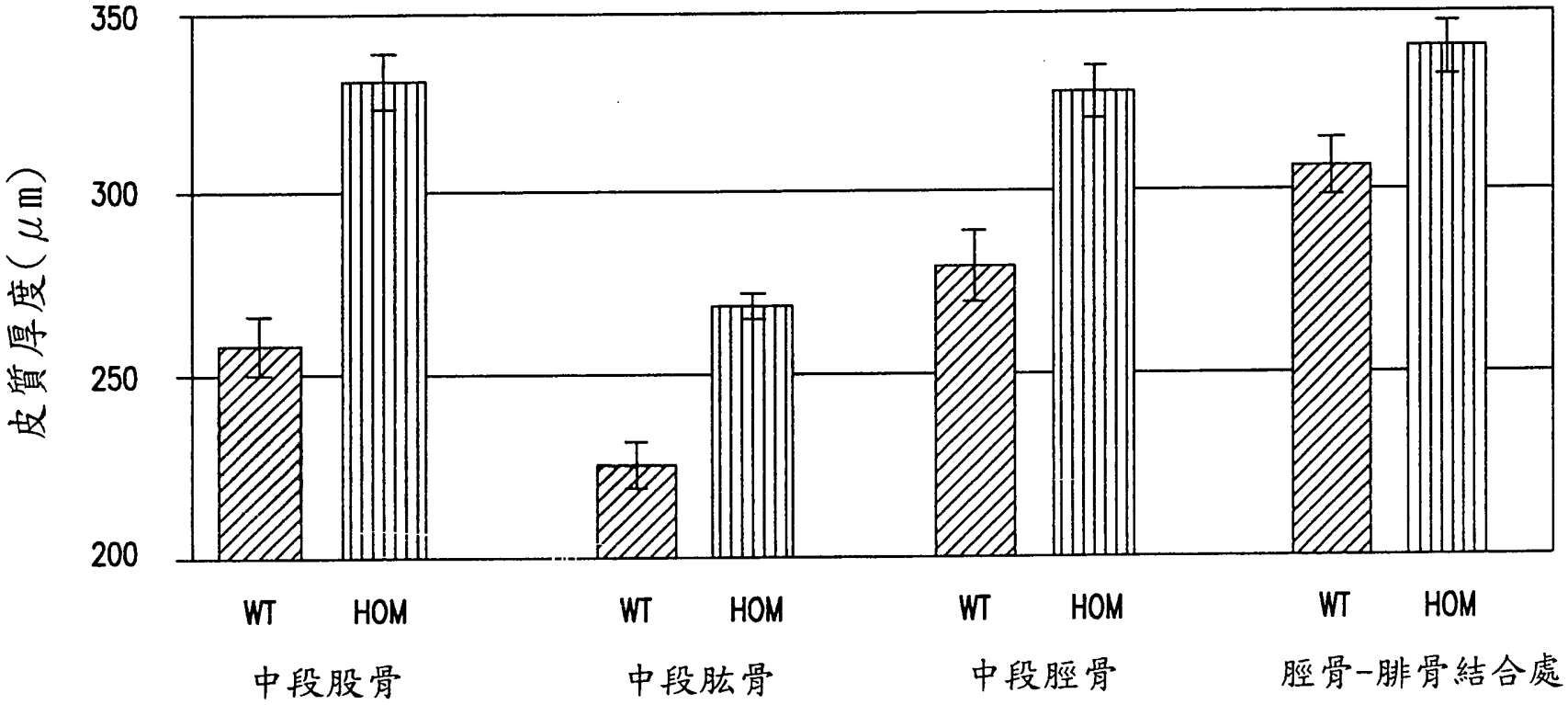
17. 如請求項 1 所述之化合物，該化合物為 2-((6-氯-7-環丙基噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸或該化合物之一藥物可接受鹽類。

18. 如請求項 1 所述之化合物，該化合物為 2-(7-環丙基-6-(三氟甲基)噻吩駢[3,2-d]嘧啶-4-基)硫)乙酸或該化合物之一藥物可接受鹽類。

19. 一種藥物組合物，包括請求項 1 之一化合物與一藥物可接受的賦形劑或稀釋劑。

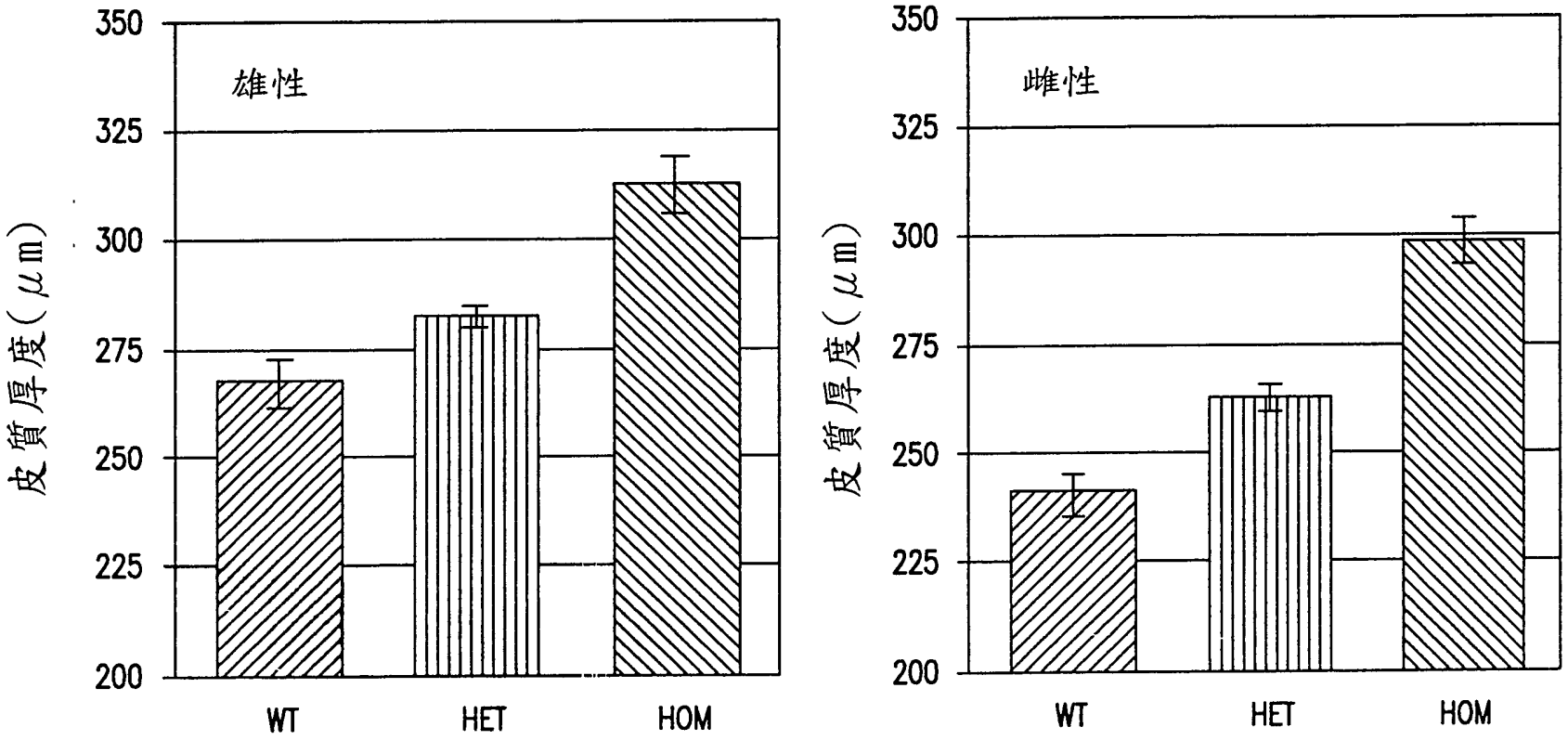
20. 請求項1之一化合物用於製備一藥物的應用，該藥物用於治療或管理一與骨損失(例如，骨質疏鬆)相關之疾病或異常。

基因剔除在不同骨骼位置的效應



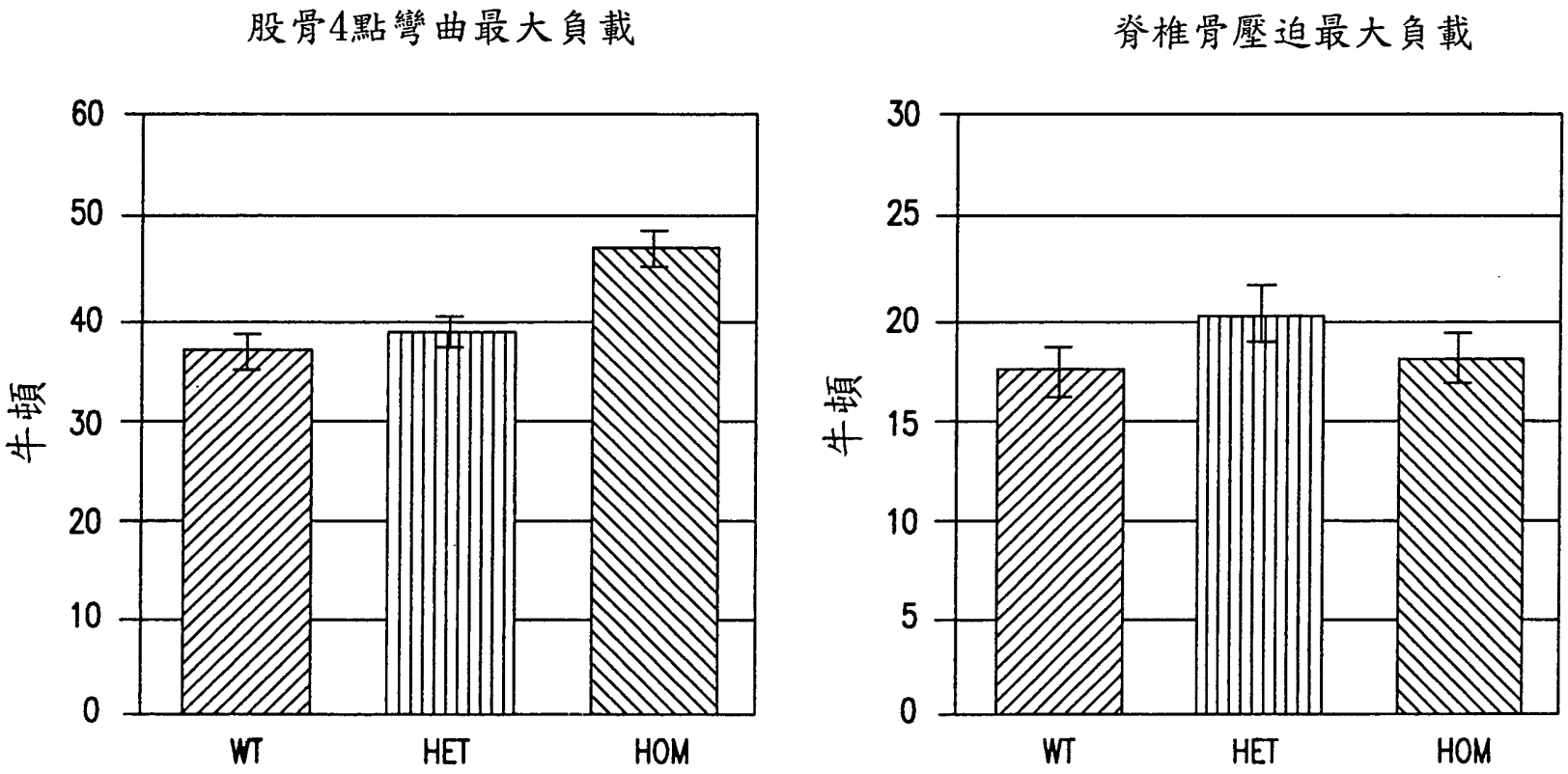
第1圖

在異型合子小鼠中發現皮質厚度的增加



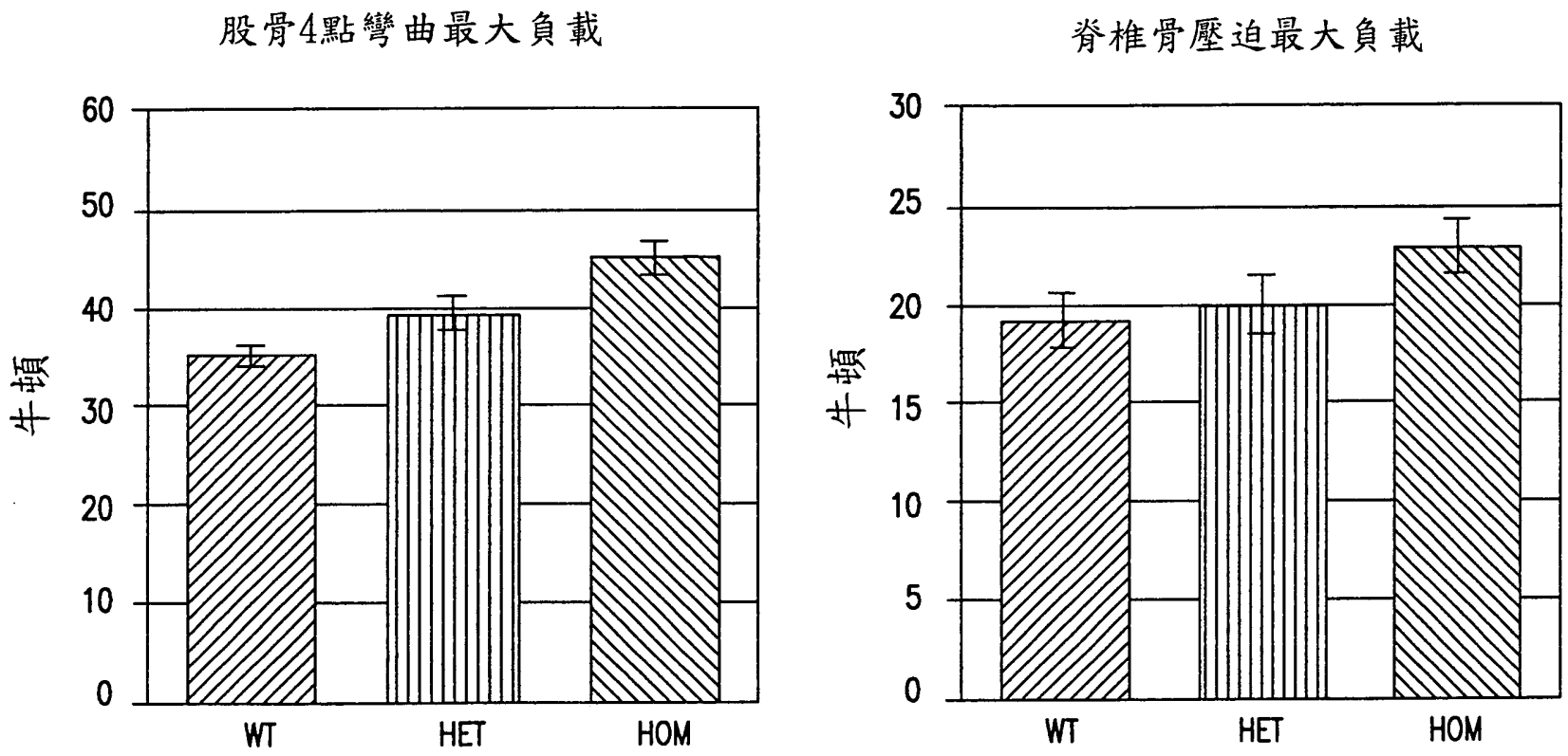
第2圖

雄鼠呈現股骨斷裂強度的提高

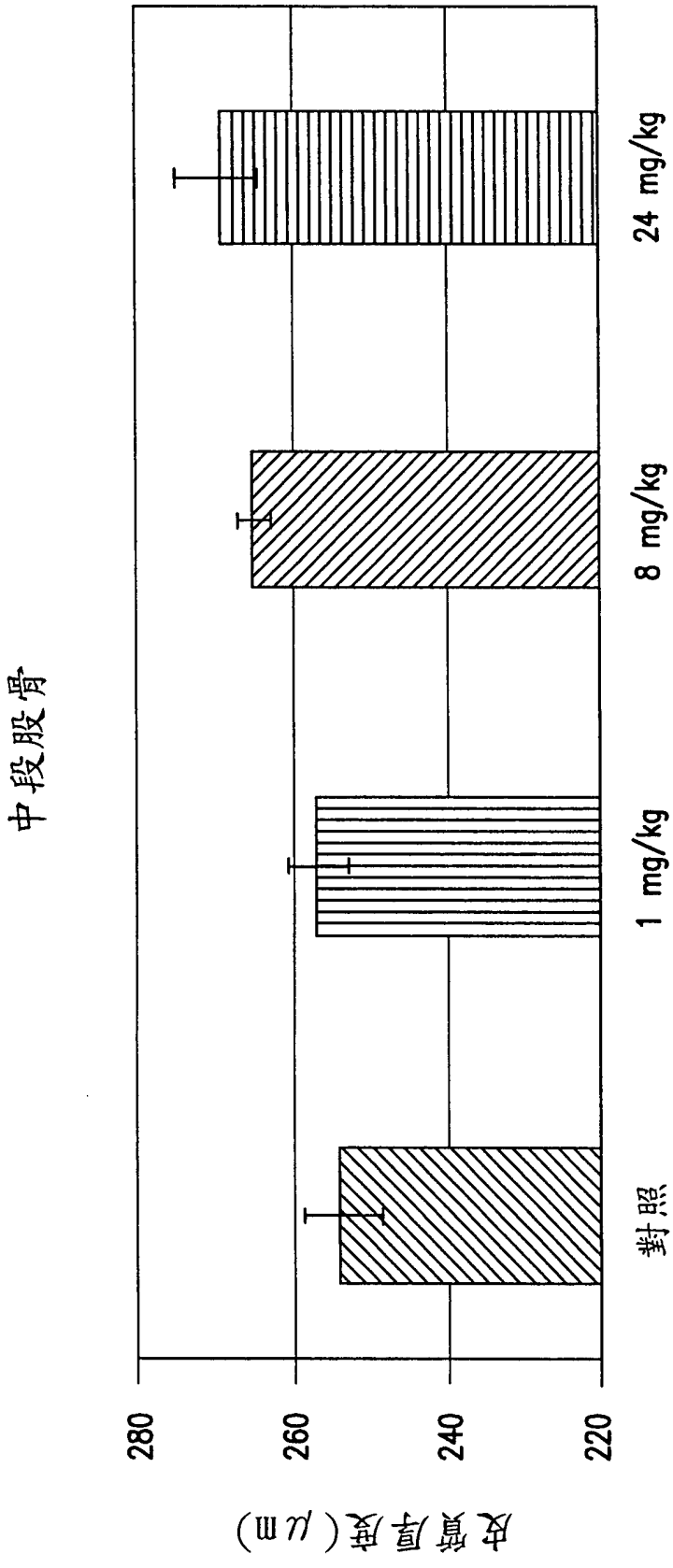


第3圖

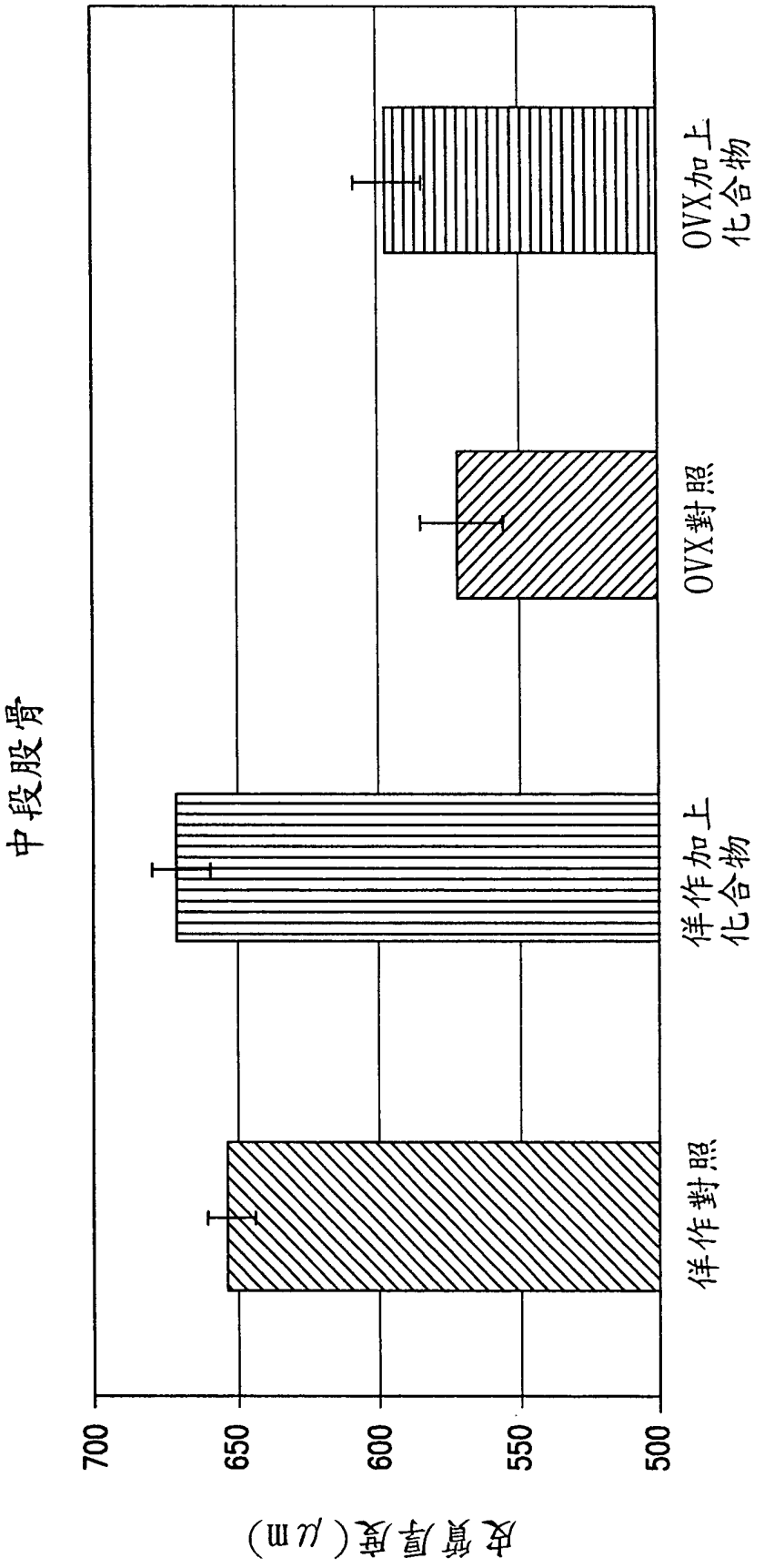
雌鼠呈現股骨斷裂強度的提高



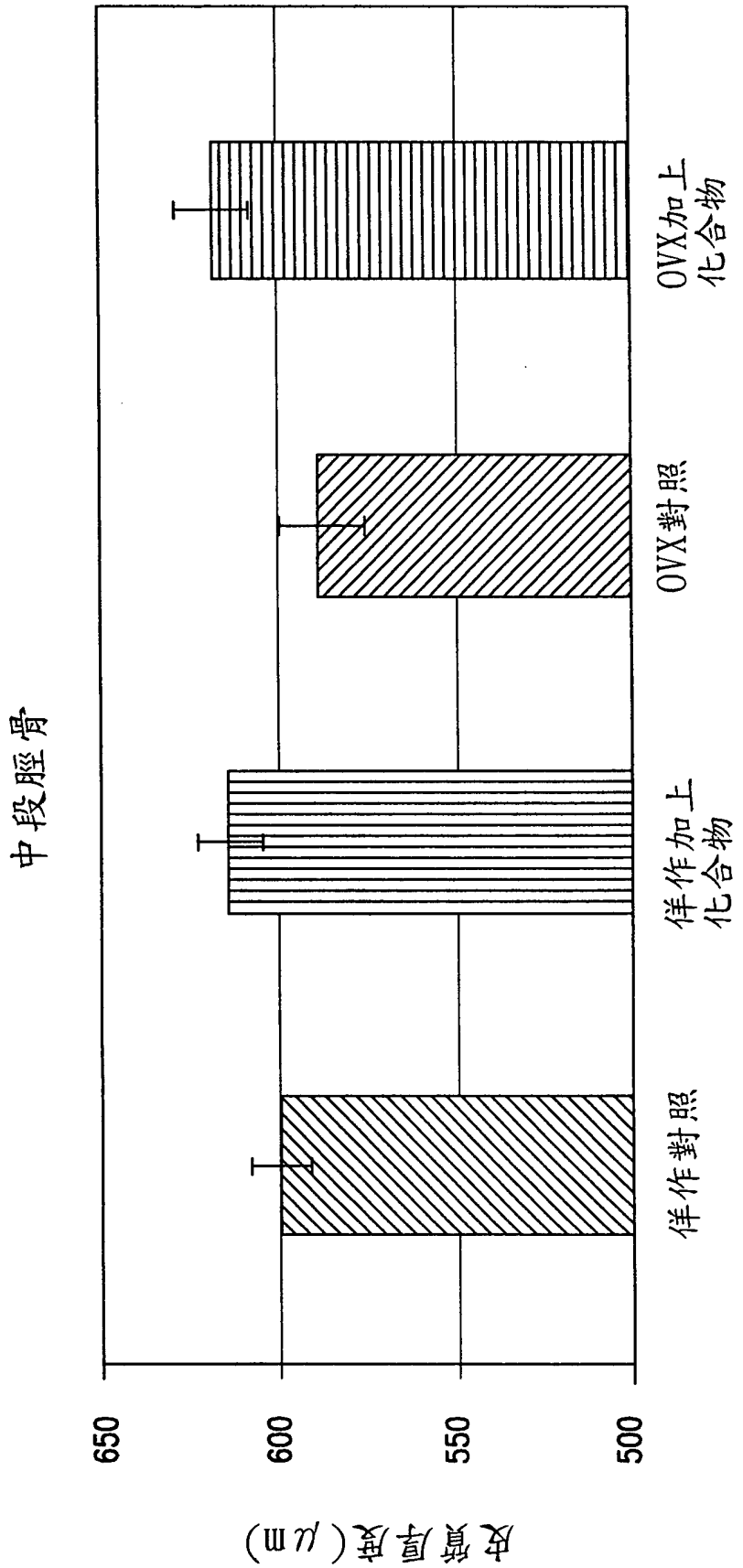
第4圖



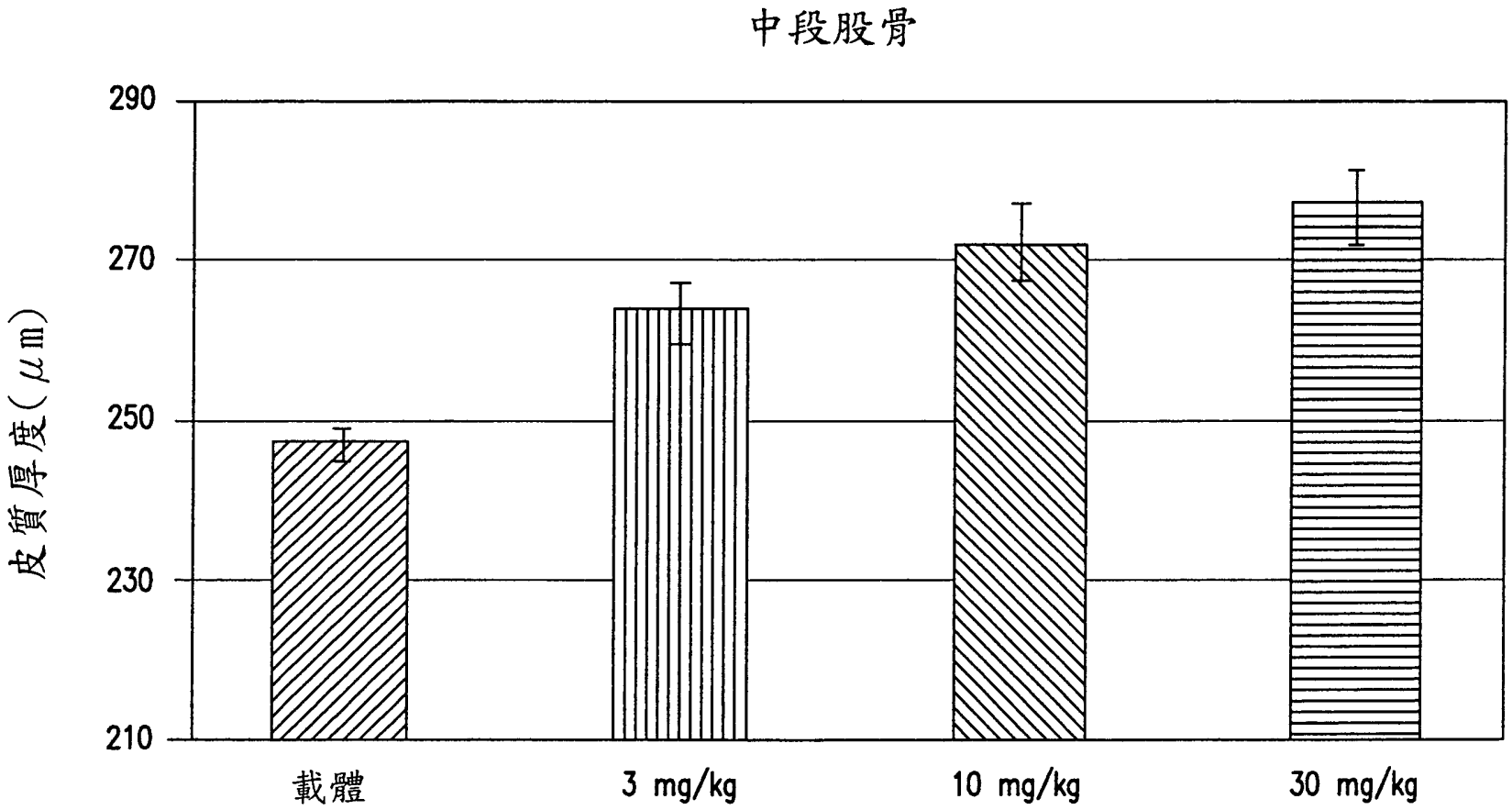
第5圖



第6圖



第7圖

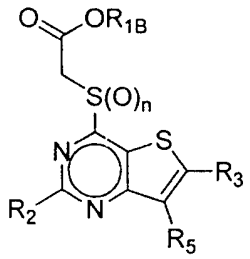


第8圖

第9圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（8）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：