I777325

(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 I777325 B**

(45)公告日： 中華民國 111 (2022) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：109143679 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.： *C07D231/14 (2006.01)* *C07D403/12 (2006.01)*
A61K31/415 (2006.01) *A61K31/4155 (2006.01)*
A61P27/02 (2006.01) *A61P11/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/12/31 美國 62/955,683

(71)申請人：財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)
新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：傅志偉 FU, CHIH WEI (TW) ；劉志鵬 LIU, CHIH PENG (TW) ；陳翊勛 CHEN, YI HSUN (TW) ；杜佳穆 TU, CHIA MU (TW) ；洪秋蓮 HUNG, CHIU LIEN (TW)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

US 2012/0135984A1 WO 2018/094362A1

審查人員：劉祥音

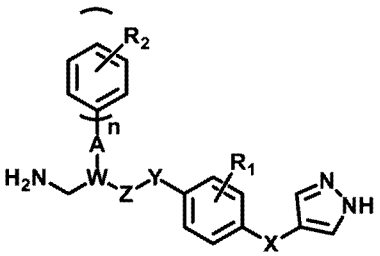
申請專利範圍項數：46 項 圖式數：10 共 128 頁

(54)名稱

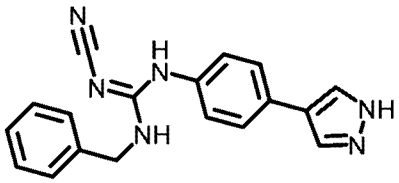
β-胺基酸衍生物、含其之激酶抑制劑與醫藥組成物以及其用途

(57)摘要

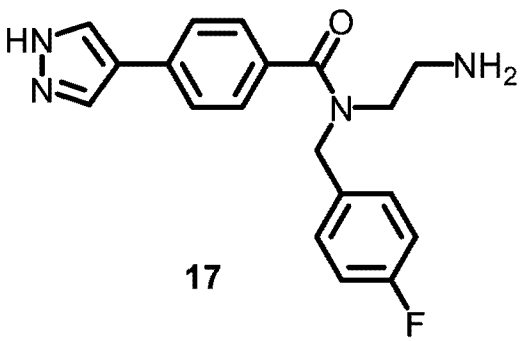
提供一種式(I)所示之化合物、化合物 16 或化合物 17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物：



式 (I)；

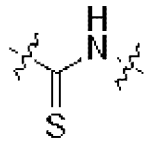
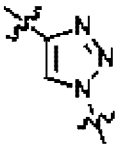
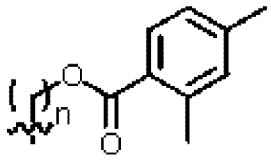


16



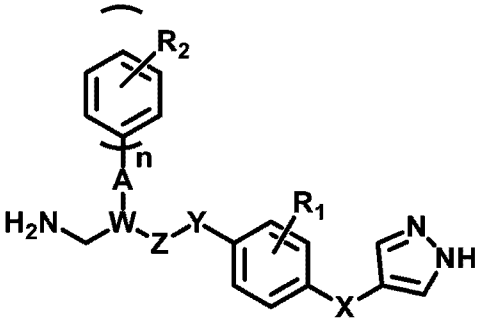
17

化合物 16； 化合物 17。該式(I)所示之化合物、化合物 16 與化合物 17 為 β 胺基酸衍生物，又於該式(I)中：X 為單鍵或 O；Y 為 NH；Z 為 C=O、C=S 或

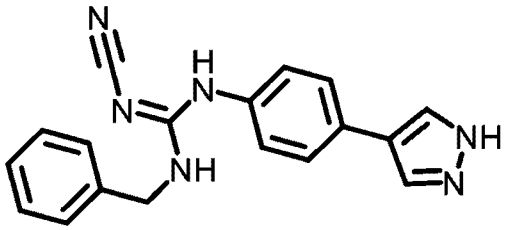

；W 為 CH 或 NH；A 為單鍵、O、OH、OCH_2、

或 N_3；R_1 為 H 或 F；R_2 為

H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO 或

；且 n 為 0 或 1。

A compound represented by Formula (I), Compound 16 or Compound 17, a pharmaceutically acceptable salt or ester, hydrate, or the individual optical isomers thereof, a mixture or a racemate of the individual enantiomers is provided:

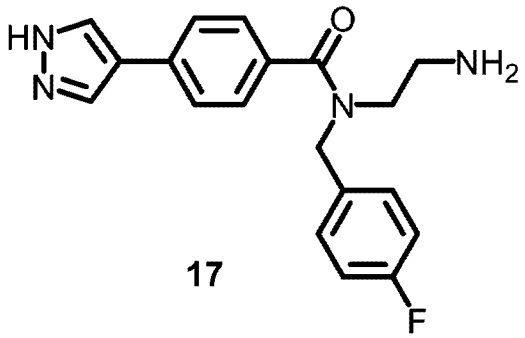


Formula (I);



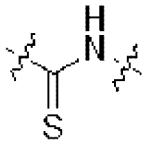
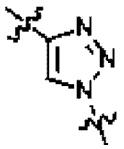
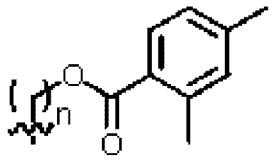
16

Compound 16;



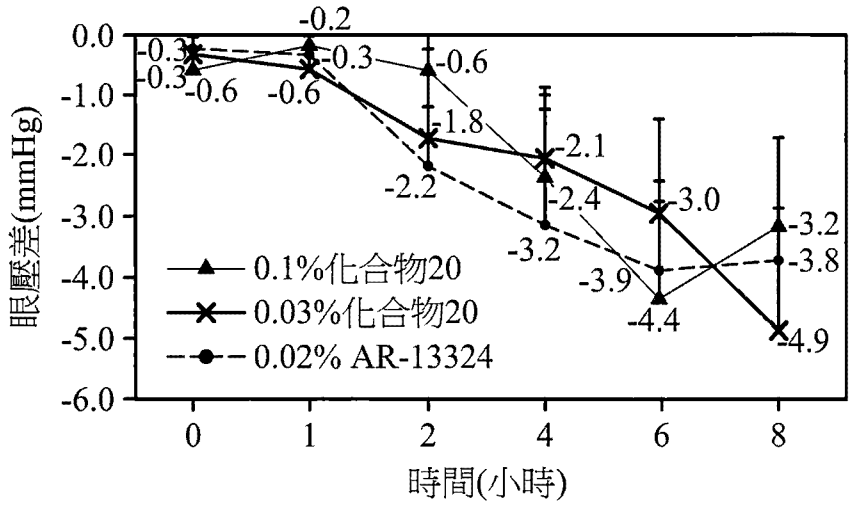
17

Compound 17. The compound represented by Formula (I), Compound 16 and Compound 17 are β-amino acid derivatives, and in Formula (I) : X is a single bond or O;

Y is NH; Z is C=O, C=S or  ; W is CH or NH; A is a single bond, O, OH, OCH_2,  or 

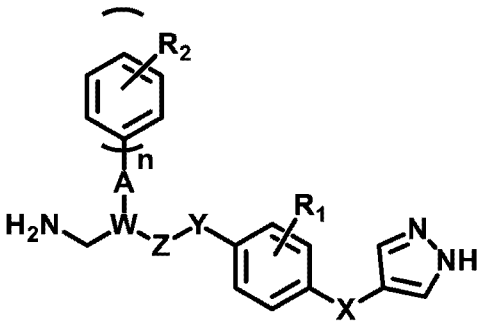
N_3; R_1 is H or F; R_2 is H, F, OH, CF_3, CH_2OH, CHO or ; and n is 0 or 1.

指定代表圖：



第 2 圖

特徵化學式：



式（I）。

公告本

I777325

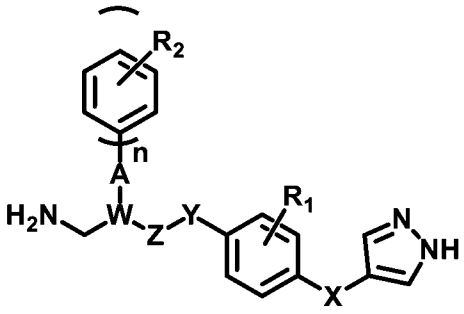
【發明摘要】

【中文發明名稱】　β-胺基酸衍生物、含其之激酶抑制劑與醫藥組成物以及其用途

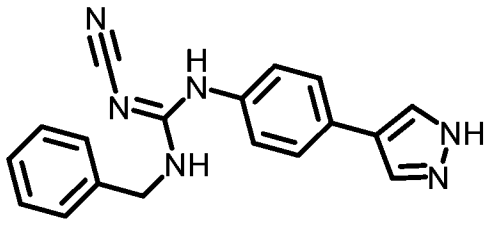
【英文發明名稱】 β-amino acid derivative, kinase inhibitor and pharmaceutical composition containing the same, and use of the same

【中文】

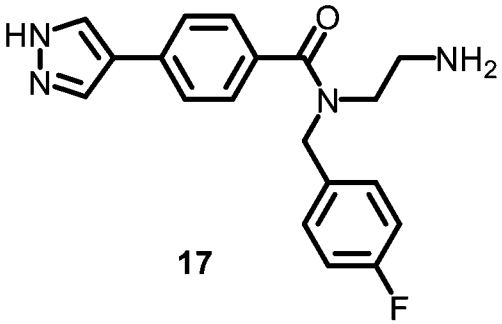
提供一種式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物：



式(I)；

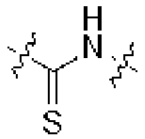
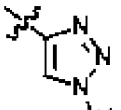
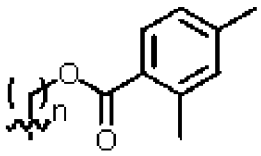


16



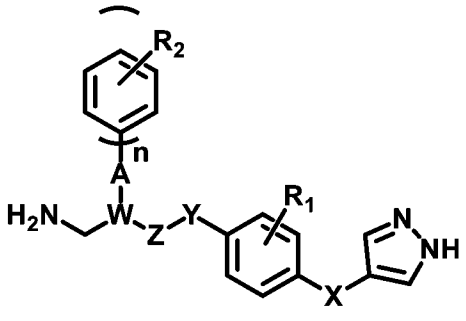
17

化合物16；　化合物17。該式(I)所示之化合物、化合物16與化合物17為β胺基酸衍生物，又於該式(I)中：X

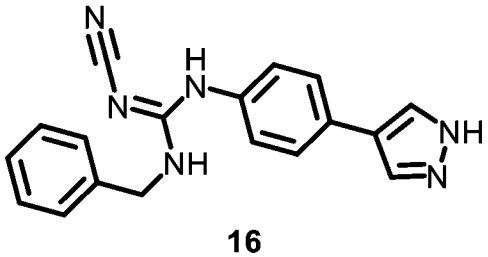
為單鍵或O；Y為NH；Z為C=O、C=S或  ；W為CH或NH；A為單鍵、O、OH、OCH_2、  或N_3；R_1為H或F；R_2為H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或  ；且n為0或1。

【英文】

A compound represented by Formula (I), Compound 16 or Compound 17, a pharmaceutically acceptable salt or ester, hydrate, or the individual optical isomers thereof, a mixture or a racemate of the individual enantiomers is provided:

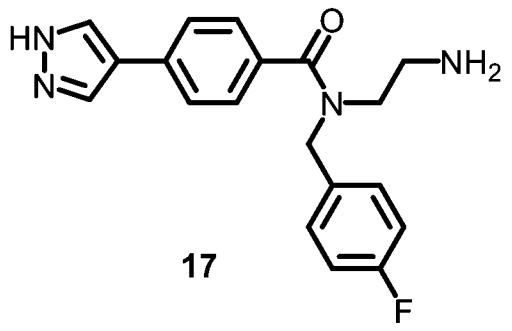


Formula (I);

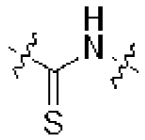
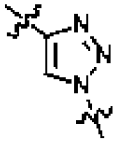
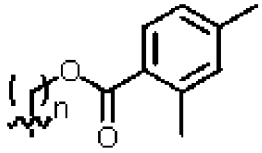


16

Compound 16;



17

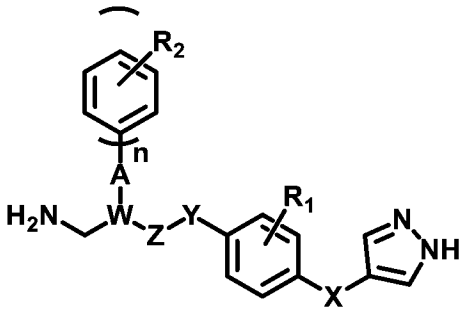
Compound 17. The compound represented by Formula (I), Compound 16 and Compound 17 are β-amino acid derivatives, and in Formula (I): X is a single bond or O; Y is NH; Z is C=O, C=S or  ; W is CH or NH; A is a single bond, O, OH, OCH_2,  or N_3; R_1 is H or F; R_2 is H, F, OH, CF_3, CH_2OH, CHO or  ; and n is 0 or 1.

【指定代表圖】　第2圖

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



式（I）。

第 109143679 號　修正日期:111.6.17　修正本

【發明說明書】

【中文發明名稱】　β-胺基酸衍生物、含其之激酶抑制劑與醫藥組成物以及其用途

【英文發明名稱】　β-amino acid derivative, kinase inhibitor and pharmaceutical composition containing the same, and use of the same

【技術領域】

【0001】 本揭露係關於一種新穎之化合物，且特別是關於一種新穎之β-胺基酸衍生物、含其之激酶抑制劑與醫藥組成物以及其用途。

【先前技術】

【0002】 為了將眼球維持在一定的形狀，以保持眼睛光學功能及新陳代謝，睫狀體會分泌房水來執行這個工作。當房水排出的通路受阻、蓄積，就會造成眼壓的升高，而眼壓是青光眼最重要的風險因素。

【0003】 目前已知房水引流主要通過以下三種途徑：(1) Schlemm管路徑（最主要(conventional pathway)）；(2) 葡萄膜-鞏膜路徑（少量），約10%-20%；(3) 虹膜表面吸收（微量）。而目前常用青光眼藥物的降眼壓機制為：(a) 減少房水生成，如β受體阻滯劑、碳酸酐酶抑制劑、α受體激動劑等；(b) 增加房水排出

（葡萄膜鞏膜途徑），如攝護腺素類似物、α受體激動劑等。

【0004】 Rho/ROCK途徑在細胞骨架的調節方面扮演重要角色。Rho/ROCK抑制劑可以通過調節小樑網組織中肌動蛋白細胞骨架、細胞外基質以及Schlemm's管內皮細胞的功能，進而達成降低眼壓之目的。

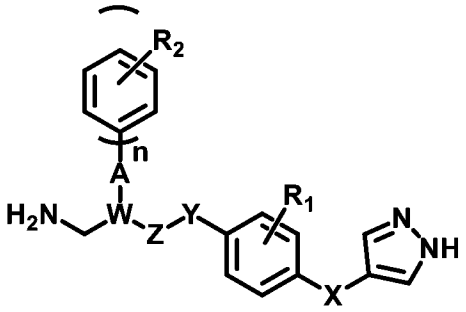
【0005】 當前，一些醫藥公司已開始探索ROCK抑制劑對人體中降眼壓的影響，並相繼研發新藥物。在評估人體臨床安全性與有效性後，目前市售ROCK抑制劑之降眼壓藥物包括Ripasudil (K-115)與Netarsudil (AR-13324)等。在Ripasudil III期臨床試驗中發現，輕度結膜充血為最常見的不良反應，其發生率高達75%，且結膜炎、點狀角膜炎等也有發生。Netarsudil (AR-13324)為ROCK/去甲腎上腺素轉運蛋白(norepinephrine transporter, NET)抑制劑化合物，除了作為ROCK抑制劑的作用外，還有抑制去甲腎上腺素的作用，具有持續降眼壓的作用，並且局部耐受性好，但其仍有結膜充血反應。此外，Netarsudil (AR-13324)在臨床三期試驗ROCKET1、ROCKET2（總計1,167位病患）對眼壓>25 mmHg的青光眼病患之藥效不如青光眼常規治療藥物Timolol，在<25mmHg的病患則是藥效與Timolol相當。

【0006】 基於目前已知ROCK抑制劑在應用於降低眼壓仍存在各種不同的副作用，以及長期使用單一機制藥物可能衍生藥效降低問題，使得病人無法長期使用單一種藥物，因此目前仍亟需開發具有新標靶或多標靶之新穎降眼壓藥物，以達成有效降低眼壓並減

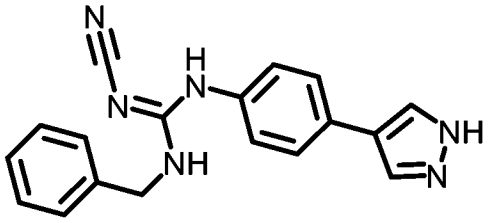
少副作用之效果。

【發明內容】

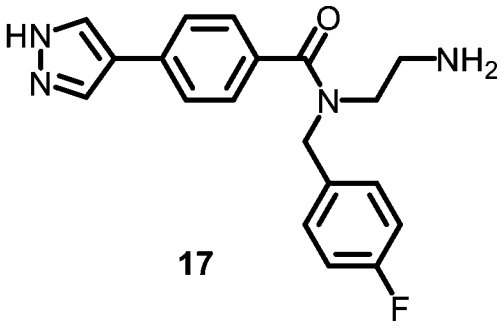
【0007】 本揭露提供一種式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯(ester)、水合物(hydrate)，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物：



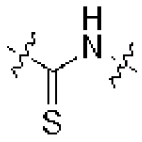
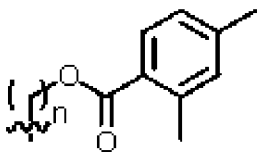
式(I)；



16



17

化合物16；化合物17。該式(I)所示之化合物為β胺基酸衍生物，又於該式(I)中：X為單鍵或O；Y為NH；Z為C=O、C=S或；W為CH或NH；A為單鍵、O、OH、OCH_2、或N_3；R_1為H或F；R_2為H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或；且n為0或1。

【0008】 本揭露也提供一種激酶抑制劑，包括上述式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【0009】 本揭露還提供一種醫藥組成物，包括一有效量之上述式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【0010】 又，本揭露提供一種上述式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備激酶抑制劑之用途。

【0011】 本揭露也提供一種上述式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備一藥物之用途，其中該藥物係用於受益於一激酶之抑制的一體內相關應用，且該激酶係擇自由以下所組成之群組的至少一個：Rho相關的蛋白激酶 (Rho-associated protein kinase, ROCK)、肌凝蛋白輕鏈激酶-4 (myosin light chain kinase 4, MYLK-4)、與有絲分裂原活化蛋白激酶-19 (mitogen-activated protein kinase 19, MAPK19, YSK-4)。

【0012】 此外，本揭露更提供一種上述式(I)所示之化合物、

化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物之用途，其係用於製備降低眼壓之藥物。

【0013】 為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

【圖式簡單說明】

【0014】

第1A圖顯示，在正常眼壓兔眼中，不同濃度之本揭露之化合物於第1天投藥之眼壓測定結果。

第1B圖顯示，在正常眼壓兔眼中，不同濃度之本揭露之化合物於第3天投藥之眼壓測定結果。

第2圖顯示，在正常眼壓兔眼中，本揭露之化合物與市售藥物的降眼壓功效。

第3A圖顯示，本揭露之化合物與市售藥物之眼刺激評估的分數。

第3B圖顯示，於眼刺激評估中，以本揭露之化合物與市售藥物處理之兔眼的照片。

第3C圖顯示，於眼刺激評估中，以本揭露之化合物連續投藥7天之兔眼，角膜無呈現混濁受損的照片。

第4圖顯示，在正常眼壓兔眼中，本揭露之化合物之藥物濃度在

標的組織8小時內均達到標靶作用藥效IC_{90}以上測試的結果。針對虹膜與睫狀體，化合物20之濃度係以單位ng/g進行測定；針對房水，化合物20之濃度係以單位ng/mL進行測定。

第5圖顯示，在正常眼壓兔眼中，本揭露之化合物之安全邊際(safety margin)測試的結果。

第6圖顯示，在正常眼壓獼猴中，本揭露之化合物與市售藥物的降眼壓功效。

第7圖顯示，在高滲透壓食鹽水誘導高眼壓兔眼中，本揭露之化合物與市售藥物的降眼壓功效。*：t-test, *p-value* < 0.05（相較於生理食鹽水）；#：t-test，*p-value* < 0.05 （相較於載劑）；ϕ：t-test，*p-value* < 0.05 （相較於市售藥物(AR-13324)）。

第8圖顯示，在磁珠誘導高眼壓兔眼中，本揭露之化合物與市售藥物的降眼壓功效。

第9圖顯示，在磁珠誘導高眼壓兔眼中，肌凝蛋白輕鏈激酶-4(myosin light chain kinase 4, MYLK-4)之表現。

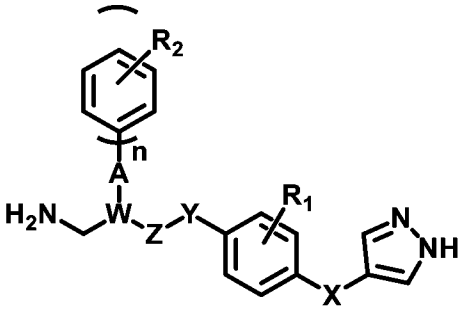
第10圖顯示，磁珠誘導高眼壓兔眼之組織切片的免疫組織化學染色。

【實施方式】

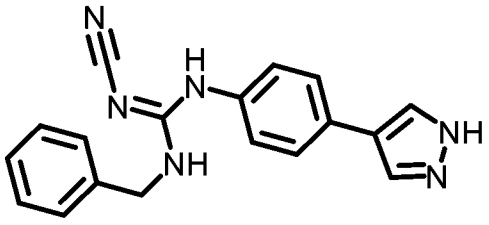
【0015】 本揭露提供一種新穎之β胺基酸衍生物，並同時提供此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其

個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【0016】 上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物，可包括以下式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，但不限於此：

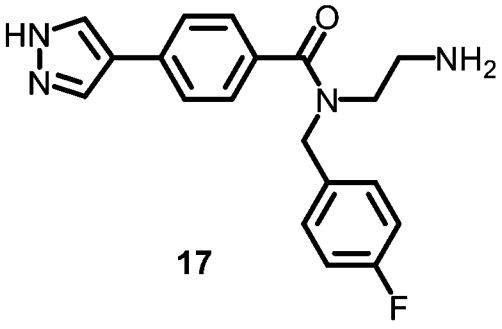


式(I)；



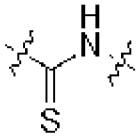
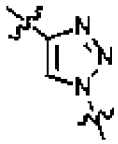
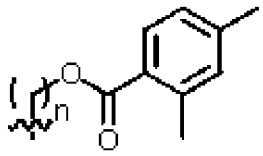
16

化合物16；



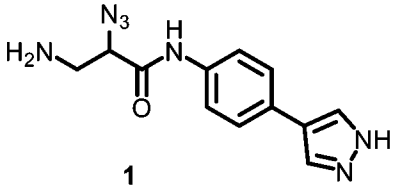
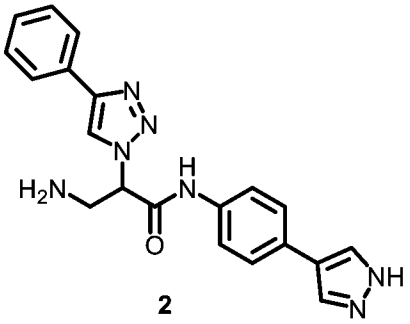
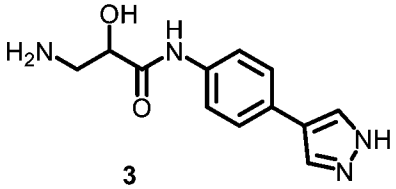
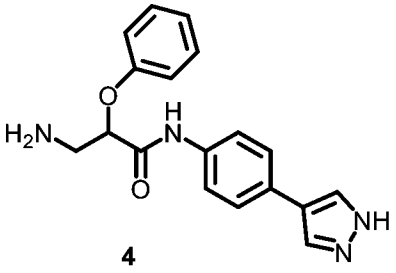
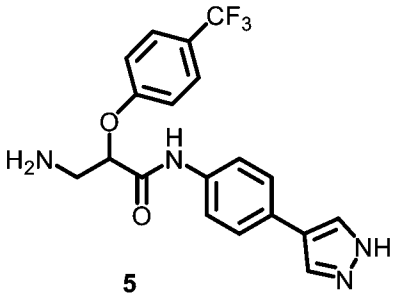
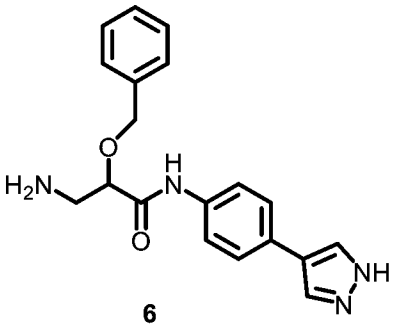
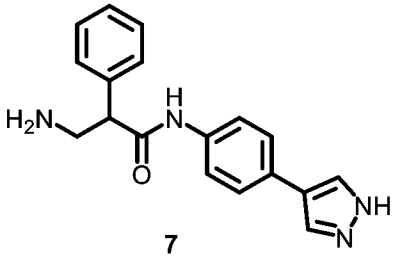
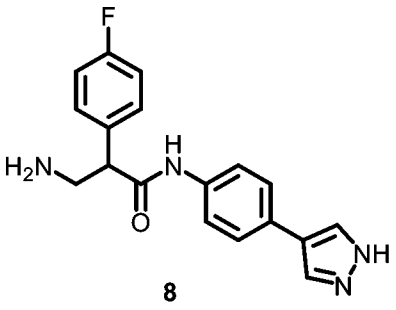
17

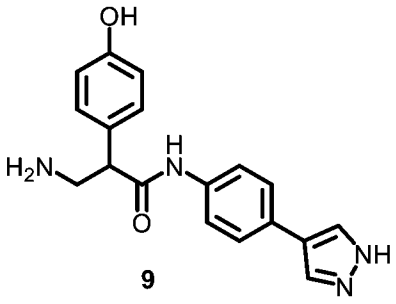
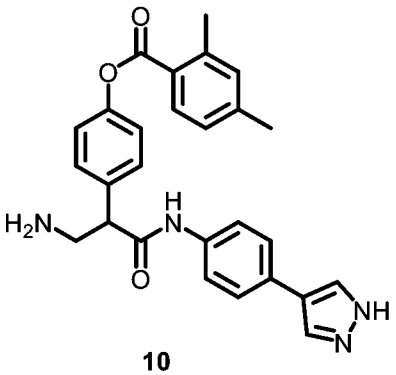
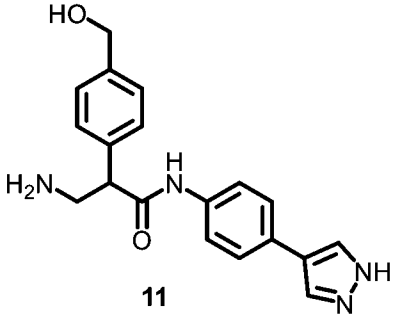
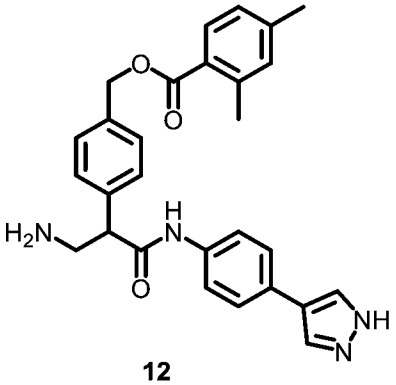
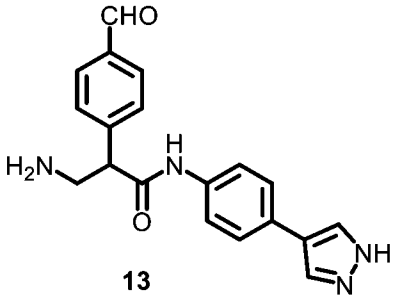
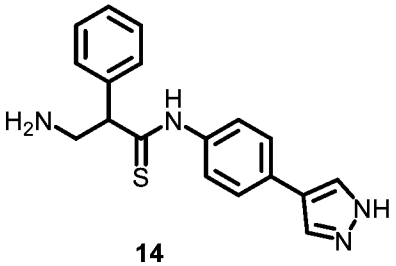
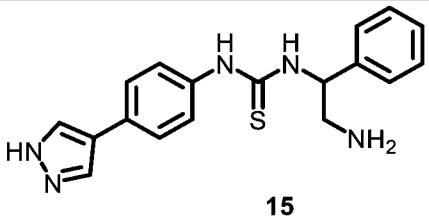
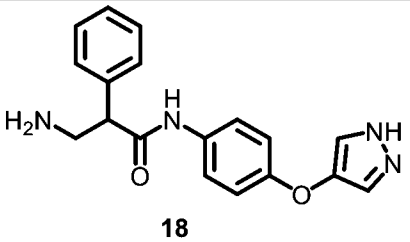
化合物17。

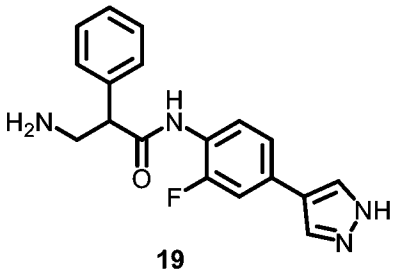
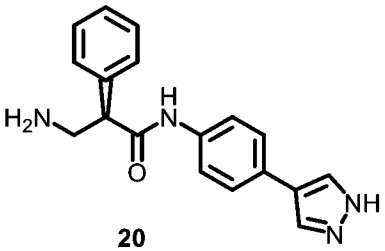
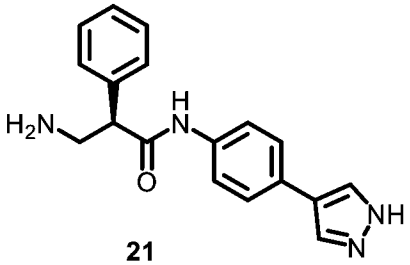
【0017】 於上方所示之式(I)中，X可為單鍵或O；Y可為NH；Z可為C=O、C=S或；W可為CH或NH；A可為單鍵、O、OH、OCH_2、或N_3；R_1可為H或F；R_2可為H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或；且n可為0或1。

【0018】 於本揭露中，上述式(I)所示之化合物可包括，但不限於，下方表1中所示之化合物。

【0019】 表1、式(I)所示之化合物的例子

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4
結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10

結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12
結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18
結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20

結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

【0020】 在一實施例中，本揭露之式(I)所示之化合物可為上述之化合物7，其為一消旋化合物(racemic compound)。在另一實施例中，本揭露之式(I)所示之化合物可為上述之化合物20，其為一S型化合物，進一步言之，為一S型鏡像異構物(S-Enantiomer)。

【0021】 在一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有抑制一激酶的功效，但不限於此。上述激酶的例子可包括，但不限於，肌凝蛋白輕鏈激酶-4 (myosin light chain kinase 4, MYLK-4)、有絲分裂原活化蛋白激酶-19 (mitogen-activated protein kinase 19, MAPK19, YSK-4)、Rho相關的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase, ROCK)或上述之任意組合。Rho相關的蛋白激酶則可包括，但不限於，Rho相關的蛋白激酶

-1(Rho-associated protein kinase-1, ROCK-1)。

【0022】 在一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4的功效。

【0023】 又，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物也可具有加成性標靶抑制作用。因此，在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有抑制有絲分裂原活化蛋白激酶-19的功效。

【0024】 又，在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有同時抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4與Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0025】 又，在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有同時抑制有絲分裂原活化蛋白激酶-19與Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0026】 此外，在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有同時抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19與Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0027】 在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有降低眼壓之功效。在一特定實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物可經由肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相關的蛋白激酶或上述之任意組合而達成降低眼壓之功效。

【0028】 由於上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有降低眼壓之功效，因此其可應用於一高眼壓症(ocular hypertension)或一具有高眼壓症之疾病的治療及/或預防。上述高眼壓症係指眼壓大於正常範圍的症狀。例如，人類正常眼壓為約10-21 mmHg，高眼壓症為眼壓大於約21 mmHg的症狀，如大於約22 mmHg、大於約25 mmHg、大於約30 mmHg等，但不限於此。

【0029】 在一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可應用於眼壓大於約25 mmHg，如大於約30 mmHg之高眼壓症的治療及/或預防。

【0030】 基於前述，本揭露也提供一種激酶抑制劑，其可包括任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，但不限於此。

【0031】 於本揭露之激酶抑制劑中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有抑制一激酶的功效，而於此所述之激酶可包括，但不限於，肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相關的蛋白激酶或上述之任意組合。Rho相關的蛋白激酶則可包括，但不限於，Rho相關的蛋白激酶-1。

【0032】 於本揭露之激酶抑制劑中，在一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，可具有抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4及/或有絲分裂原活化蛋白激酶-19之功效。於本揭露之激酶抑制劑中，在另一實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基

酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，除了抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4及/或有絲分裂原活化蛋白激酶-19之功效外，還可具有抑制Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0033】 在一實施例中，本揭露之激酶抑制劑可包括上述化合物7（其為一消旋化合物）或化合物20（其為一S型化合物）。於此特定實施例中，本揭露之激酶抑制劑可具有同時抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19與Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0034】 此外，基於前述，本揭露也可提供一種任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物作為激酶抑制劑之用途。

【0035】 而於本揭露之此用途中，關於上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物的激酶抑制功效相關說明同前方所述，因此不於此贅述。

【0036】 於本揭露之此用途中，在一特定實施例中，上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物，可為上述化合物7（其為一消旋化合物）或化合物20（其為一S型化合物）。於此特定實施例中，前述激酶抑制劑可具有同時抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19與Rho相關的蛋白激酶的功效。

【0037】 此外，本揭露還提供一種醫藥組成物，其可包括，但不限於，任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【0038】 而於本揭露之醫藥組成物中，關於上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物的所有相關敘述同前方所述，因此不於此贅述。

【0039】 在一實施例中，本揭露之醫藥組成物可包括上述化合物7，其為一消旋化合物。在另一實施例中，本揭露之醫藥組成物可包括上述化合物20，其為一S型化合物。

【0040】 又，在一實施例中，上述本揭露之醫藥組成物，還可包括一藥學上可接受之載體或鹽類，但不限於此。

【0041】 上述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲(absorption delaying)試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將藥學組合物配製成劑型(dosage form)。

【0042】 又，上述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或鋯鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡糖胺，

胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸、麩胺酸醯胺。

【0043】 再者，本揭露之醫藥組成物可被投予至一需要此醫藥組成物之一個體，但不限於此。而本揭露之醫藥組成物的給藥途徑可包括非口服、口服、經由吸入噴霧(inhalation spray)或藉由植入貯存器(implanted reservoir)的方式，但不限於此。非口服可包括，但不限於，塗擦患部、皮下(subcutaneous)、皮內(intracutaneous)、靜脈內(intravenous)、肌肉內(intramuscular)、關節內(intraarticular)動脈(intraarterial)、滑囊(腔)內(intrasynovial)、胸骨內(intrasternal)、蜘蛛膜下腔(intrathecal)、疾病部位內(intralesional)注射、眼部外用(external ophthalmic use)、眼內注射(intraocular)以及灌注技術等。

【0044】 而塗擦之局部使用的形式可包括軟膏、乳劑、液劑、凝膠等，但不限於此。又，眼部外用之使用的形式可包括，但不限於，眼用滴劑、眼用軟膏、眼用凝膠等。

【0045】 此外，上述需要被投予此醫藥組成物之個體可包括，但不限於，一脊椎動物。又，上述脊椎動物可包括魚類、兩棲類、爬蟲類、鳥類或哺乳類，但不限於此。哺乳類的例子可包括，但不限於，人類、猩猩、猴子、馬、驢、狗、貓、兔子、天竺鼠、大鼠與小鼠。在一實施例中，上述個體可為人類。

【0046】 在一實施例中，上述本揭露之醫藥組成物可用於受益於任一激酶抑制任一體內(*in vivo*)相關應用，例如受益於任一激

酶之抑制任一疾病或病徵的治療及/或預防，而於此所述之激酶的例子，可包括，但不限於，肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相關的蛋白激酶或上述之任意組合。

【0047】 又，上述體內相關應用可包括，但不限於，一眼科相關應用及/或肺部相關應用等。眼科相關應用的例子可包括，視神經的保護，及/或高眼壓、青光眼、眼中風、黃斑部病變、黃斑部水腫、糖尿病視網膜病變、角膜內皮細胞損傷、角膜纖維化或上述之任意組合的預防及/或治療等，但不限於此。其中青光眼可包括剝脫性青光眼(exfoliation glaucoma, XFG)、隅角開放性青光眼(open angle glaucoma)、隅角閉鎖性青光眼(angle-closure glaucoma)、繼發型青光眼(secondary glaucoma)、先天型青光眼(congenital glaucoma)等，但不限於此。又，上述肺部相關應用的例子可包括，但不限於，肺動脈高壓、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、病因不明性肺纖維化、肺氣腫、肺癌或上述之任意組合等的預防及/或治療。

【0048】 此外，本揭露之醫藥組成物可被調製成一醫藥製劑，但不限於此。在一實施例中，本揭露之醫藥組成物可被調製成一眼用製劑，但不限於此。上述眼用製劑的例子可包括，但不限於，眼用滴劑、眼用軟膏、眼用凝膠、眼內注射劑等。在一特定實施例中，本揭露之醫藥組成物可被調製成一眼用滴劑。

【0049】 此外，本揭露也可提供一種任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽

或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備一藥物之用途，其中上述藥物係用於受益於一激酶之抑制的一體內相關應用。上方所述激酶的例子可包括，但不限於，肌凝蛋白輕鏈激酶-4、有絲分裂原活化蛋白激酶-19、Rho相關的蛋白激酶或上述之任意組合。

【0050】 在一實施例中，於本揭露之上述用途中，所採用為化合物7，其為一消旋化合物。在一實施例中，於本揭露之上述用途中，所採用為化合物20，其為一S型化合物。

【0051】 又於本揭露之上述用途中，上述體內相關應用可包括，但不限於，一眼科相關應用及/或肺部相關應用等。眼科相關應用的例子可包括，視神經的保護，及/或高眼壓、青光眼、眼中風、黃斑部病變、黃斑部水腫、糖尿病視網膜病變、角膜內皮細胞損傷、角膜纖維化或上述之任意組合的預防及/或治療等，但不限於此。其中青光眼可包括剝脫性青光眼、隅角開放性青光眼、隅角閉鎖性青光眼、繼發型青光眼、先天型青光眼等，但不限於此。又，上述肺部相關應用的例子可包括，但不限於，肺動脈高壓、慢性阻塞性肺病、病因不明性肺纖維化、肺氣腫、肺癌或上述之任意組合等的預防及/或治療。

【0052】 在一實施例中，於本揭露之上述用途中，上方所述之體內相關應用可為青光眼的預防及/或治療。

【0053】 於本揭露之上述用途中，在另一實施例中，一藥學上可接受之載體或鹽類，可與任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍

生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物一起製備上述藥物。

【0054】 關於所述之藥學上可接受之載體或鹽類，可參見前方本揭露之醫藥組成物中之藥學上可接受之載體或鹽類的相關說明，因此不於此贅述。

【0055】 另外，本揭露也提供一種任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備降低眼壓的藥物的用途。

【0056】 在一實施例中，於本揭露之上述用途中，所採用為化合物7，其為一消旋化合物。在一實施例中，於本揭露之上述用途中，所採用為化合物20，其為一S型化合物。

【0057】 又，在一實施例中，於上述本揭露之用途中，上述降低眼壓之藥物可用於一高眼壓症或一具有高眼壓症之疾病的治療及/或預防。而關於所述高眼壓症或具有高眼壓症之疾病的相關說明與敘述，可參見前方所述，因此不於此贅述。

【0058】 在一實施例中，於上述本揭露之用途中，上述降低眼壓之藥物可為一青光眼之治療藥物。而上述青光眼可包括，但不限於，剝脫性青光眼、隅角開放性青光眼、隅角閉鎖性青光眼、繼發型青光眼、先天型青光眼等。

【0059】 又，在一實施例中，於上述本揭露之用途中，上述

降低眼壓之藥物可為一眼用製劑。而眼用製劑可包括，但不限於，眼用滴劑、眼用軟膏、眼用凝膠、眼內注射劑等。在一特定實施例中，上述降低眼壓之藥物可為一眼用滴劑。

【0060】 於本揭露之上述用途中，在另一實施例中，一藥學上可接受之載體或鹽類，可與任何上述本揭露之新穎之β胺基酸衍生物或此新穎之β胺基酸衍生物之藥學上可接受之鹽或酯、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物一起製備上述降低眼壓之藥物。

【0061】 關於所述之藥學上可接受之載體或鹽類，可參見前方本揭露之醫藥組成物中之藥學上可接受之載體或鹽類的相關說明，因此不於此贅述。

【0062】 **實施例**

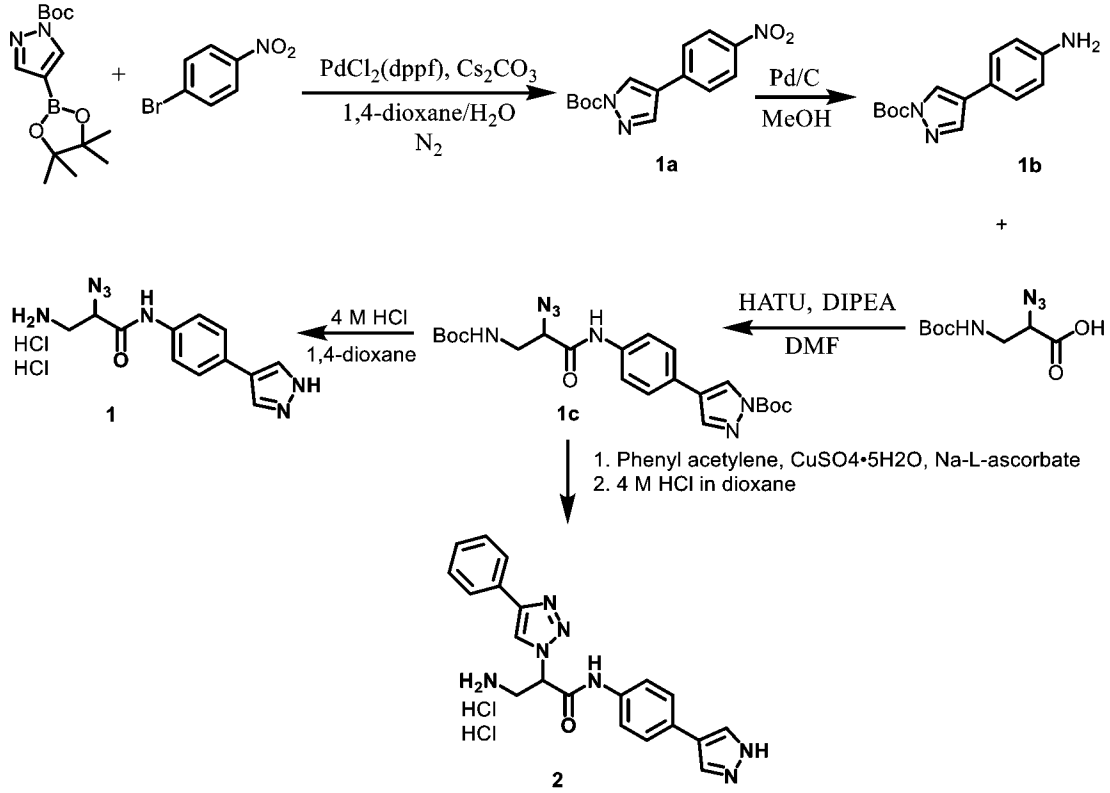
【0063】 **實施例1**

【0064】 **β胺基酸衍生物之合成**

【0065】 **1. 化合物1與化合物2之合成**

【0066】 化合物1與化合物2之合成方案如以下方案1所示。

【0067】 方案1



【0068】 (1) 合成例1

【0069】 在氬氣下，對密封管中之1-溴-4-硝基苯(1-bromo-4-nitrobenzene)(210mg, 1.04 mmol)、1-Boc-4-吡唑硼酸頻哪醇酯(1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester)(305 mg, 1.04mmol)、$PdCl_2$ (dppf)(76 mg, 103.76 μmol)與Cs_2CO_3(676 mg, 2.08 mmol)的混合物注入混合溶劑（二噁烷(dioxane)/H_2O=10/1, 6 mL），之後將前述之混合物在90℃下攪拌6小時。冷卻至室溫後，經由旋轉蒸發去除溶劑，且對殘留物加水，並以EtOAc (15 mL×3)進行萃取。將經合併之有機層以鹽水清洗、以無水Na_2SO_4乾燥並過濾。將濾液濃縮且將殘留物藉由急速層析法(flash chromatography)(EtOAc/Hex=15 %)以矽膠進行純化，以獲得叔丁基4-（3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）-4-硝基

苯基）-1H-吡唑(*tert*-butyl

4-(3-(2-(dimethylamino)ethoxy)-4-nitrophenyl)-1H-pyrazole)(**1a**)，其為白色固體(249 mg, 64 %)。

【0070】 對叔丁基4-（3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）-4-硝基苯基）-1H-吡唑 (**1a**)(360 mg)在MeOH (8 mL)中的溶液添加10% Pd/C，並將前述反應之混合物於H_2氣環境(H_2 balloon atmosphere)之室溫下攪拌1小時。將混合物過濾，並將濾液藉由旋轉蒸發以獲得叔丁基-（4-氨基-3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）苯基）-1H-吡唑(*tert*-butyl

-(4-amino-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-1H-pyrazole)(**1b**)為棕色固體 (320 mg, 97 %)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.44 (s, 1H), 8.27 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.69-7.68 (m, 4H), 1.68 (s, 9H), 1.59 (s, 9H)。

【0071】 將2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙酸

(2-azido-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid) (1.2 eq)、HATU (1.5eq)與DIPEA (2eq)溶解於DMF (0.1M)中，且加入叔丁基-（4-氨基-3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）苯基）-1H-吡唑(**1b**)(1.0 eq)，以形成一混合物並於室溫攪拌1小時。以水激發反應，並以EtOAc萃取。收集有機層並以Na_2SO_4乾燥，且將萃取液在減壓下進行濃縮。將殘留物以矽膠(EtOAc/Hex=20%)純化，並獲得所需之化合物叔丁基4-（4-（2-（2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl

4-(4-(2-azido-3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**1c**)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.41 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* =9.0 Hz, 2H), 5.07 (s, 1H), 4.27 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 1.65 (s, 9H), 1.43 (s, 9H)。

【0072】 將1,4-二噁烷中之4M HCl (20 eq)與4-（4-（2-（2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯 (**1c**)(1 eq)於室溫下攪拌1小時。經由過濾收集白色固體，並將其以1,4-二噁烷與DCM清洗。將白色固體真空乾燥以獲得N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-疊氮基丙醯胺二鹽酸鹽）

(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-azidopropanamide dihydrochloride) (**1**)。^{1}H-NMR (500 MHz, D2O) δ: 8.30 (s, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 4.76 (m, 1H), 3.57 (dd, J = 13.5, 4.5 Hz, 1H), 3.44 (dd, *J*=13.5, 7.5 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H)。

【0073】 (2) 合成例2

【0074】 將叔丁基4-（4-（2-（2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(**1c**) (1 eq)、苯基乙炔(phenyl acetylene)(1.1 eq)、硫酸銅(II)(0.2 eq)與(+)-Na-L-抗壞血酸鹽((+)-Na-L-ascorbate)(0.2 eq)於THF與

2-3滴H_2O中攪拌。將前述之混合物於室溫下隔夜攪拌，之後移除溶劑。將殘留物以矽膠(EtOAc/Hex=20%)進行純化，獲得所需之化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽

(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl) propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.98 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.83 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.58 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.46 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.0 Hz, 2H), 7.34 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.96-3.95 (m, 1H), 1.65 (s, 9H), 1.40 (s, 9H)。

【0075】 化合物**2**的製備方法與化合物**1**的製備方法相似。區別在於，化合物叔丁基4-（4-（2-（2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽被置換為化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽，以獲得產物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基）丙烯醯胺二鹽酸鹽

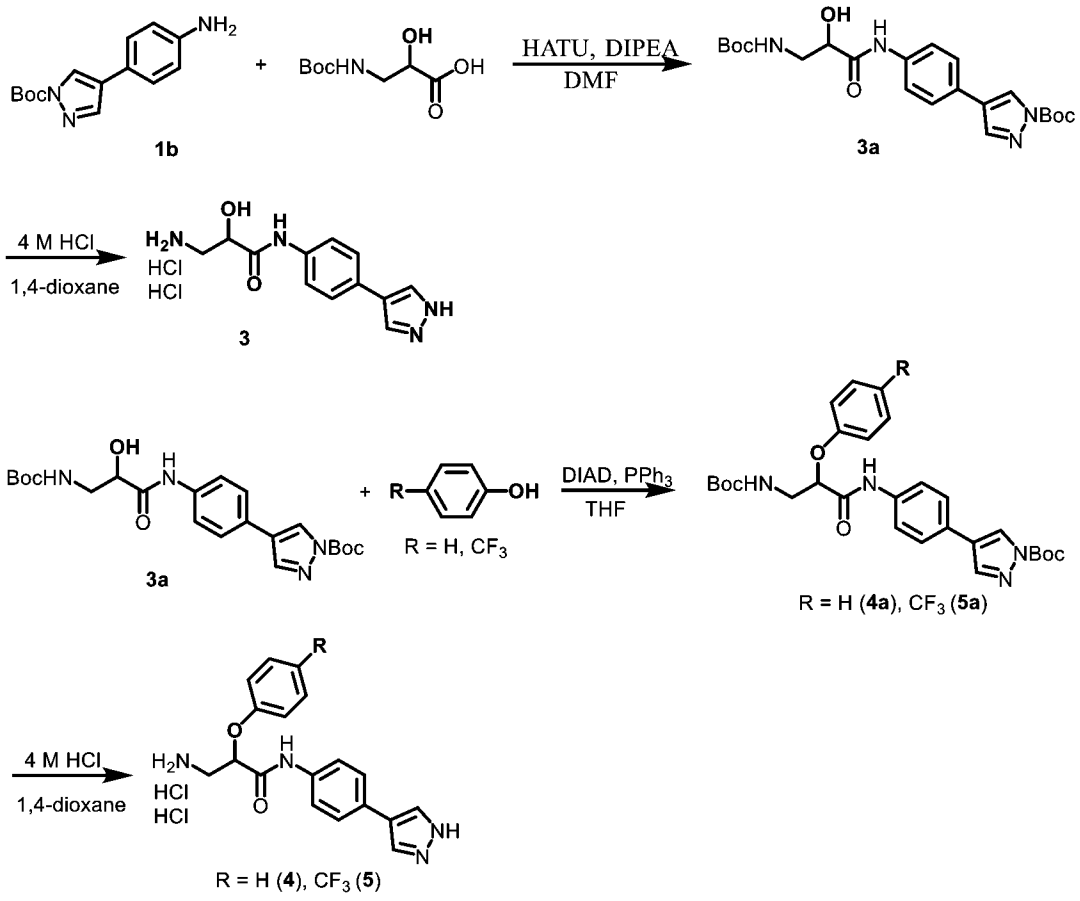
(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl) propenamide dihydrochloride)(**2**)。

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.63 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.88 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.74 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.67 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.45 (t, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.37 (t, *J*=8.5 Hz, 1H), 5.97 (t, *J*=6.0 Hz, 1H), 5.54 (s, 1H), 3.92 (d, *J*=6.0 Hz, 2H), 3.34 (s, 2H)。

【0076】 **2. 化合物3至化合物5之合成**

【0077】 化合物3至化合物5之合成方案如以下方案2所示。

【0078】 方案2



【0079】 (3) 合成例3

【0080】 化合物**3a**的製備方法與化合物**1c**的製備方法相似。區別在於，化合物2-疊氮基-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙酸被置

換為化合物叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-羥基丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-hydroxypropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**3a**)。最終產物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-羥基丙醯胺二鹽酸鹽(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-hydroxypropanamide dihydrochloride)(**3**)的合成方法與化合物**1**相似。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.20 (s, 2H), 7.70 (d, *J*=8.0, 2H), 7.56 (d, *J*=8.0, 2H), 4.64 (dd, *J*=8.5, 4.5 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J*=13.5, 4.5 Hz, 1H), 3.36-3.31 (m, 1H)。

【0081】 (4) 合成例4

【0082】 對10 mL THF中之化合物**3a** (1 eq)、苯酚(1 eq)與PPh_3 (2eq)的零度溶液，逐滴加入DIAD (1.5 eq)。將前述之混合物於室溫下攪拌2小時。經由減壓移除溶劑，並以管柱層析(column chromatography)(EtOAc/Hex=10%)純化粗產物，以獲得叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯氧基丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenoxypropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**4a**)，其為油狀物。

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.26 (s, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.58 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.48 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.35 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.09-6.99 (m, 3H), 5.03 (brs, 1H), 4.76 (t, *J*=5.0 Hz,

1H), 3.81-3.78 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 1H), 1.68 (s, 9H), 1.45 (s, 9H)。最終產物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯氧基丙醯胺二鹽酸鹽

(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenoxypropanamide dihydrochloride)(**4**)的合成方法與化合物**1**相似。^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.30 (s, 2H), 7.66 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.59 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.36 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.12 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.07 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 3.75-3.66 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 2H)。

【0083】 (5) 合成例5

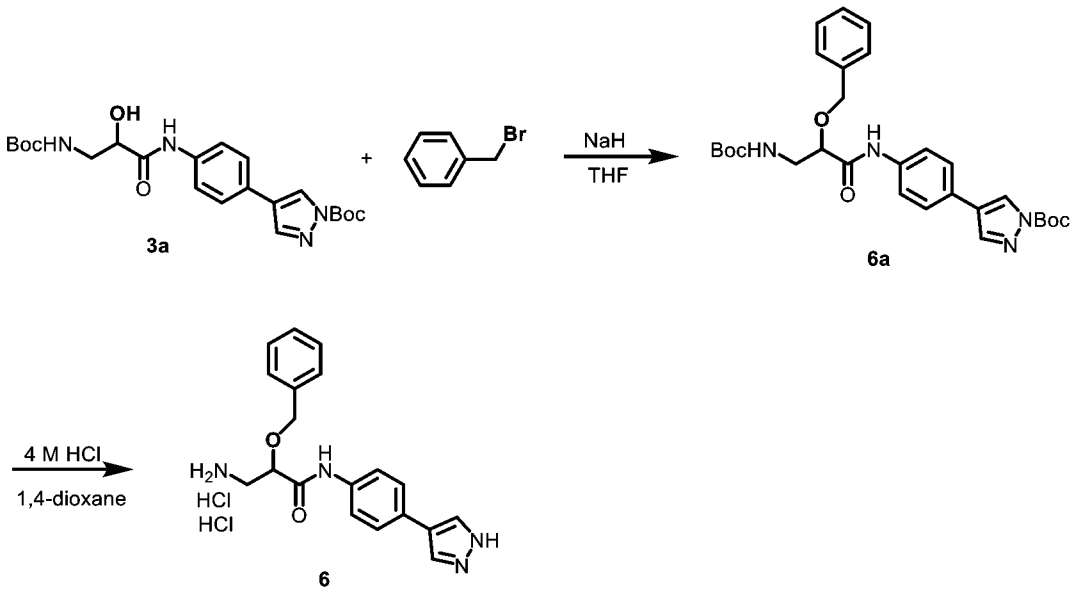
【0084】 化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-（三氟甲基）苯氧基）丙烯醯胺二鹽酸鹽

(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-(trifluoromethyl) phenoxy)propenamide dihydrochloride)(**5**)的合成方法與化合物4相似。^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.14 (br, 2H), 7.68 (d, *J*=9.0, 2H), 7.63 (d, *J*=6.5, 2H), 7.58 (d, *J*=6.5, 2H), 7.26 (d, *J*=9.0, 2H), 5.21 (m, 1H), 3.60-3.58 (m, 2H)。

【0085】 3. **化合物6之合成**

【0086】 化合物6之合成方案如以下方案3所示。

【0087】 方案3



【0088】 (6) 合成例6

【0089】 對化合物**3a** (1 eq)在10 mL THF中之零度溶液添加NaH(1.5 eq)。將前述混合物於零度下攪拌1小時，之後逐滴加入BnBr (1.5 eq)。將前述反應混合物於室溫下攪拌6小時。將反應以水激發並以EtOAc進行萃取。收集有機層並以Na_2SO_4乾燥，之後於減壓下移除溶劑。將殘留物以矽膠(EtOAc/Hex=5%至15%)進行純化，以獲得所需之化合物叔丁基4-（4-（2-（苄氧基）-3-（（叔丁氧基羰基）氨基）丙醯胺基）苯基）叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(2-(benzyloxy)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**6a**)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.44 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.56 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.48 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.41-7.35 (m, 5H), 4.93 (brs, 1H), 4.82 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 4.66 (d, *J*=11.0

Hz, 1H), 4.06 (t, *J*=5.0 Hz, 1H), 3.65-3.61 (m, 2H), 1.68 (s, 9H), 1.44 (s, 9H)。

【0090】 最終產物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（苄氧基）丙醯胺二鹽酸鹽

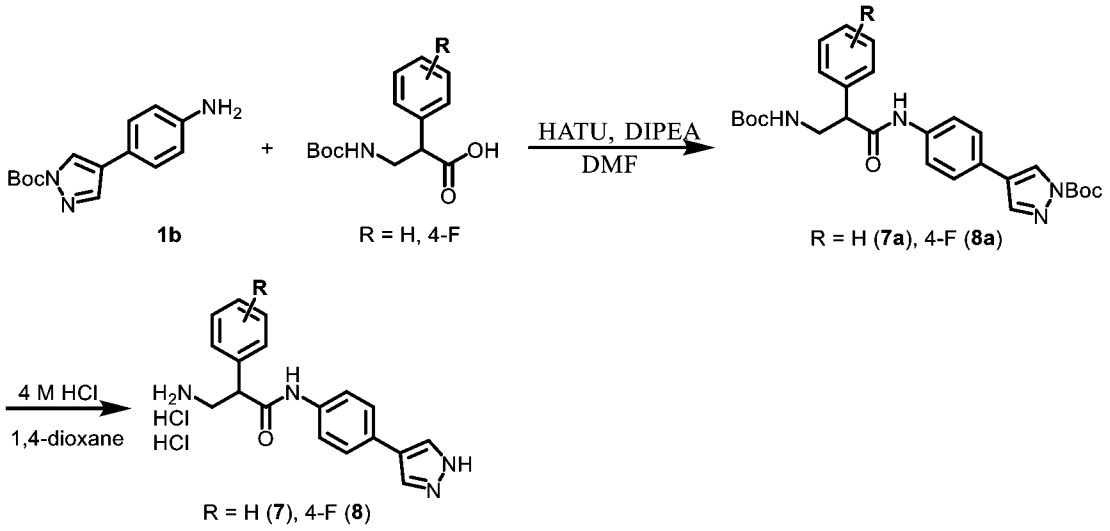
(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(benzyloxy) propanamidedihydrochloride)(**6**)的合成方法與化合物**1**相似。

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.46 (s, 2H), 7.69-7.66 (m, 4H), 7.49 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.38 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 4.78 (d, *J*=11.5 Hz, 1H), 4.75 (d, *J*=11.5 Hz, 1H), 4.36-4.34 (m, 1H), 3.36-3.31 (m, 2H)。

【0091】 **4. 化合物7與化合物8之合成**

【0092】 化合物7之合成方案如以下方案4所示。

【0093】 方案4



【0094】 (7) 合成例7

【0095】 中間化合物**7a**與**8a**的製備方法與化合物1c的製備方

法相似。

【0096】 中間化合物叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**7a**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.22 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.49 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.42 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.40 (s, 9H)。

【0097】 中間化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-氟苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-fluorophenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**8a**)為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.53-7.51 (m, 3H), 7.45 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.34 (t, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.05 (t, *J*=8.5 Hz, 2H), 5.13 (brs, NH, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.65-3.64 (m, 1H), 3.54-3.51 (m, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.47 (s, 9H)。

【0098】 最終化合物**7**與**8**的製備方法與化合物**1**的製備方法相似。

【0099】 最終化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺二鹽酸鹽(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropana

mide dihydrochloride)(**7**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.55 (br, 2H), 7.69 (d, *J*=8.5, 2H), 7.63 (d, *J*=8.5, 2H), 7.47-7.34 (m, 5H), 4.15-4.17 (m, 1H), 3.61 (dd, *J*=12.5, 9.5 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J*=12.5, 5.5 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H)。

【0100】 最終化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-氟苯基）丙醯胺二鹽酸鹽

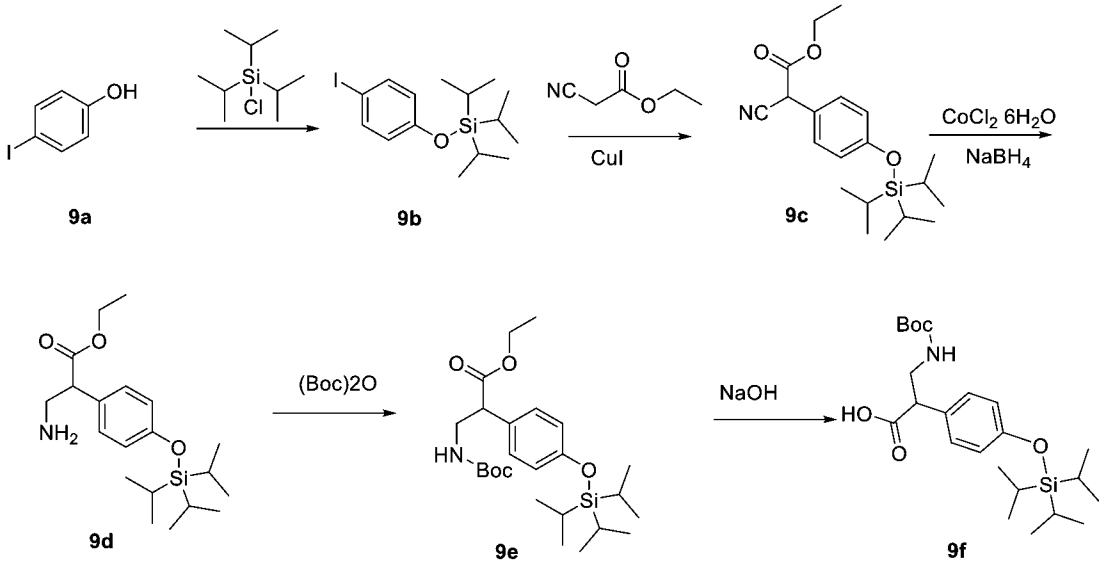
(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-fluorophenyl) propanamide dihydrochloride)(**8**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.07 (s, 2H), 7.42 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.34 (dd, *J*=5.5, 8.5 Hz, 2H), 7.26 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.08 (t, *J*=8.5 Hz, 2H), 4.06 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J*=7.5, 13.0 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J*=7.5, 13.0 Hz, 1H)。

【0101】 **5. 化合物9之合成**

【0102】 (8) 合成例8

【0103】 化合物**9f**之合成方案如以下方案5所示。

【0104】 方案5



【0105】 對碘酚(**9a**)(100 g, 454.5 mmol)在DCM(1000 mL)中的溶液添加咪唑(imidazole)(68 g, 999.9 mmol)，然後逐滴加入TIPSC1(87.3 g, 454.5 mmol)。將前述混合物攪拌16小時，然後倒入冰/水中，以DCM進行萃取。以鹽水清洗有機層，且將其以Na_2SO_4乾燥並濃縮。將殘留物藉由矽膠管柱層析法純化(洗提劑：乙酸乙酯/石油醚=1/50)，獲得化合物**9b**(170g，99.1%)，其為無色油。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.05-1.08 (d, 18H), 1.20-1.28 (m, 3H), 6.64-6.66 (m, 2H), 7.47-7.49 (m, 2H)。

【0106】 對化合物**9b** (140 g, 372.3 mmol)在二噁烷(1500 mL)中的溶液添加2-氰基乙酸乙酯(ethyl 2-cyanoacetate)(63.1 g, 558.8 mmol)、吡啶甲酸(picolinic acid)(13.8 g, 111.7 mmol)、Cs_2CO_3(242 g, 744.6 mmol)與CuI (21.2 g, 111.7 mmol)。將前述混合物於90℃攪拌2小時並過濾。將有機層濃縮並藉由矽膠管柱層析進行純化(洗提溶劑：乙酸乙酯/石油醚=1/20)，以獲得化合物**9c** (44 g, 32.7 %)，其為白色固體。

【0107】 對化合物**9c** (22 g, 60.9 mmol)在MeOH/THF(2:1, 660 mL)中的溶液於-20℃添加$CoCl_26H_2O$ (44 g, 184.9 mmol) 與$NaBH_4$ (33 g, 868.4 mmol)。將前述混合物攪拌30分鐘並過濾以獲得濾液。再將前述濾液加入有機物$(Boc)_2O$ (40 g, 183.5 mmol)，並在室溫攪拌0.5小時。接著將前述混合物倒入冰/水中，並以EtOAc進行萃取。以鹽水清洗有機層，且將其以Na_2SO_4乾燥並濃縮。將殘留物以矽膠管柱層析進行純化(洗提溶劑：乙酸乙酯/

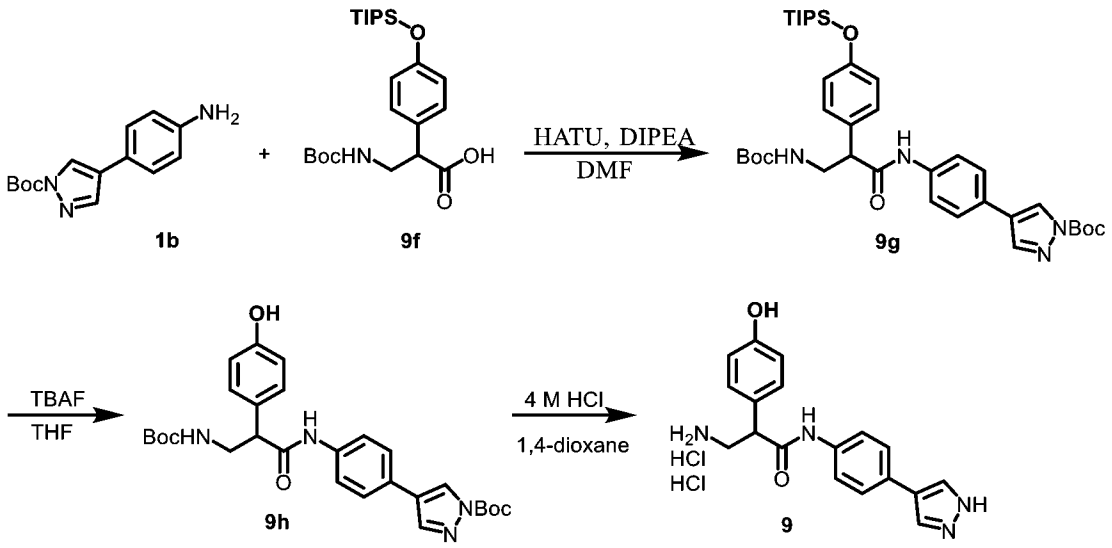
石油醚= 1/30），以獲得化合物**9e** (10.5 g, 35.9 %)，其為黃色油。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ: 1.53-1.09 (t, 18H), 1.17-1.28 (m, 6H), 1.42 (s, 9H), 3.46-3.56 (m, 2H), 3.77-3.80 (t, 1H), 4.11-4.18 (m, 2H), 4.82 (s, 1H), 6.81-6.83 (d, 2H), 7.09-7.11 (d, 2H)。

【0108】 對化合物**9e** (10 g, 21.5 mmol)在EtOH/H_2O (10:1, 220 mL)的溶液添加NaOH(2 g, 49.5 mmol)，並在室溫下攪拌1小時。將前述混合物以1 N HCl 中和並以EtOAc進行萃取。以鹽水清洗有機層，且將其以Na_2SO_4乾燥並濃縮。將殘留物以矽膠管柱層析進行純化（洗提溶劑：乙酸乙酯/石油醚=1/10），以獲得化合物**9f** (2.5 g, 26.6 %)，其為白色固體。^{1}H-NMR (DMSO-d6, 400 MHz): δ: 1.08-1.10 (d, 18H), 1.22-1.32 (m, 3H), 1.37 (s, 9H), 3.23-3.28 (m, 1H), 3.42-3.46 (t, 1H), 3.69-3.73 (t, 1H), 6.85-6.87 (d, 3H), 7.16-7.18 (d, 2H)。

【0109】 (9) 合成例9

【0110】 化合物9之合成方案如以下方案6所示。

【0111】 方案6



【0112】 中間化合物**9g**的製備方法與化合物**1c**的製備方法相似。

【0113】 中間化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（三異丙基甲矽烷基）氧基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**9g**)為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.49 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.44 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.30 (brs, NH, 1H), 7.19 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.87 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 5.17 (brs, NH, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.64-3.62 (m, 1H), 3.56-3.53 (m, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.30-1.20 (m, 3H), 1.09 (d, *J*=7.0 Hz, 18H)。

【0114】 對叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（三異丙基甲矽烷基）氧基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-

吡唑-1-羧酸鹽(**9g**)(1030 mg, 1.52 mmol)在THF(10 mL)中且經攪拌的溶液添加在THF溶液中之1M TBAF(3.03 mL, 3.03 mmol)。將所產生之混合物在室溫下攪拌1小時。以水激活反應並以EtOAc進行萃取。收集有機層並以Na_2SO_4乾燥，且將萃取物在減壓下濃縮。將殘留物以製備逆相高效液相色層分析(preparative reverse HPLC) (80% ACN, 20% H_2O)進行純化，之後冷凍乾燥以獲得叔丁4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-羥苯基）丙醯胺基）苯基）叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-hydroxyphenyl) propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**9h**)(600 mg, 76 %)，其為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.50 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.45-7.43 (m, 3H), 7.15 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.81 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 5.26 (brs, NH, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.62 (s, 1H), 3.55-3.53 (m, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.62 (brs, OH, 1H), 1.43 (s, 9H)。

【0115】 最終化合物**9**的製備方法與化合物**1**的製備方法相似。

【0116】 最終化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-羥基苯基）丙醯胺二鹽酸鹽(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-hydroxyphenyl) propanamide dihydrochloride)(**9**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.06 (s, 2H), 7.39 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.24

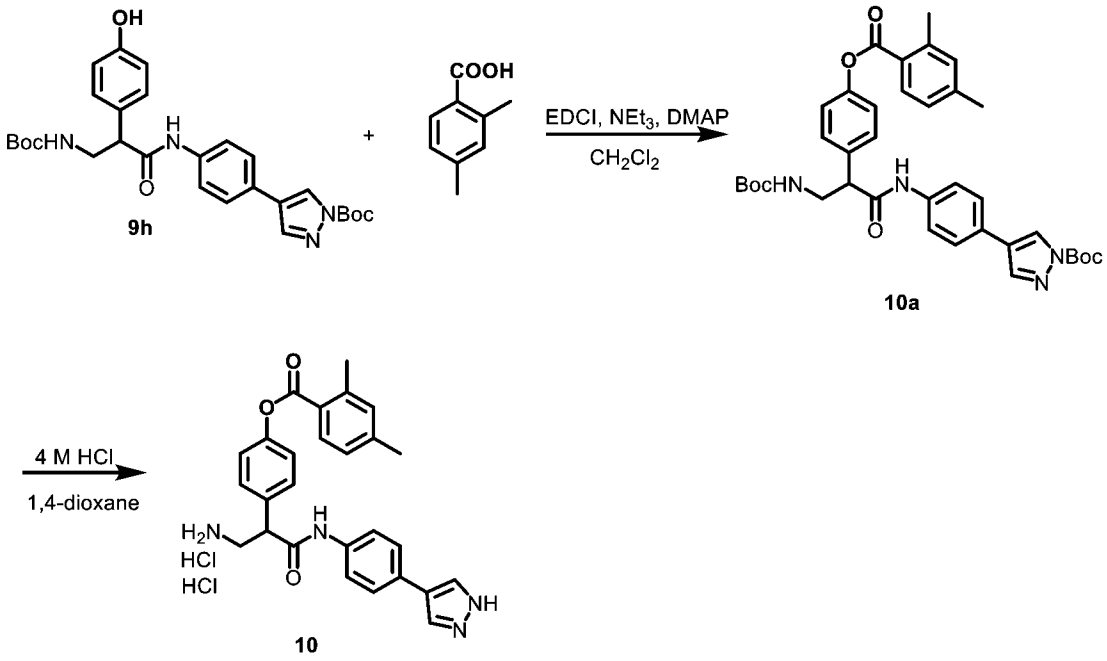
(d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.20 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.82 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 3.97 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J*=7.5, 13.0 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J*=7.5, 13.0 Hz, 1H)。

【0117】 **6. 化合物10之合成**

【0118】 (10) 合成例10

【0119】 化合物10之合成方案如以下方案7所示。

【0120】 方案7



【0121】 對叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-羥苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-hydroxyphenyl) propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**9h**)(356 mg, 0.68 mmol)、2,4-二甲基苯甲酸(2,4-dimethylbenzoic acid) (103 mg, 0.68 mmol)與NEt_3(143 μL, 1.02 mmol)在CH_2Cl_2 (20

mL)中且經攪拌的溶液添加EDCI(196 mg, 1.02 mmol)與DMAP (25 mg, 0.21 mmol)。將所產生的混合物攪拌16小時。以飽和檸檬酸激活反應，並以EtOAc進行萃取。收集有機層並以Na_2SO_4乾燥，且在減壓下移除溶劑。將殘留物以製備逆相高效液相色層分析(100% ACN)進行純化，之後冷凍乾燥以獲得叔丁基4-(4-(3-((叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（2,4-二甲基苯甲醯基）氧基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**10a**)(355 mg, 80%)為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 8.26 (s, 1H), 8.06 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.52-7.42 (m, 5H), 7.21 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 5.15 (brs, NH, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.68-3.67 (m, 1H), 3.58-3.55 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.67 (s, 9H), 1.44 (s, 9H)。

【0122】 於20 mL小瓶中裝入叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（2,4-二甲基苯甲醯基）氧基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**10a**)(350 mg, 0.54 mmol)與在二噁烷中之4 M HCl溶液(2.7 mL)。將所產生之混合物在室溫下攪拌1小時。在減壓下

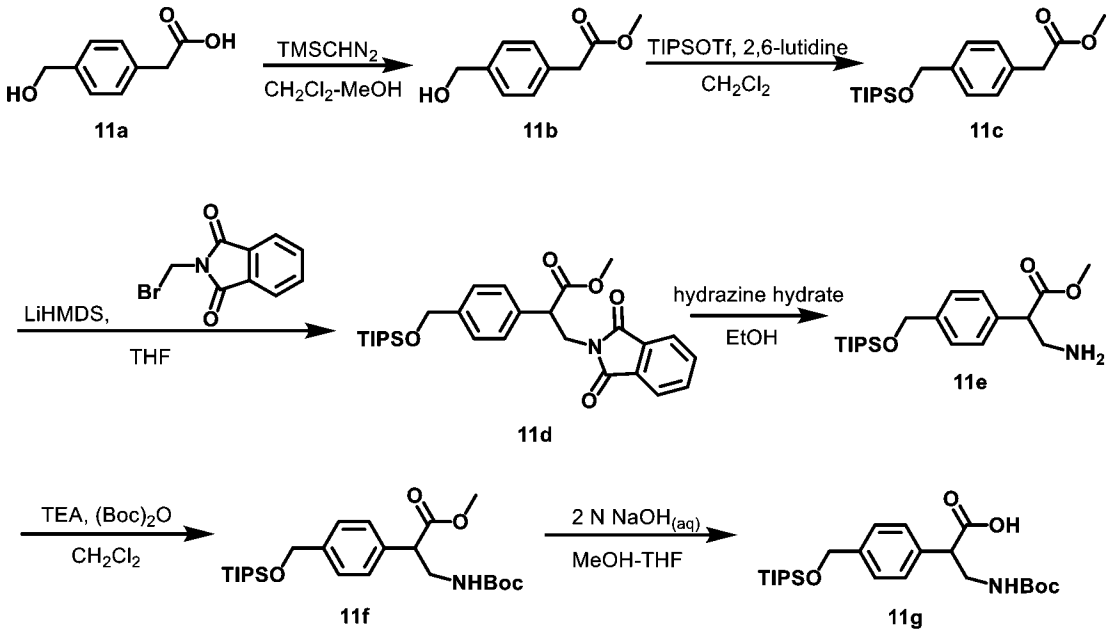
移除溶劑以獲得所需的化合物4-（1-（（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）氨基）-3-氨基-1-氧丙烷-2-基）苯基2,4-二甲基苯甲酸酯二鹽酸鹽(4-(1-((4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-yl)phenyl 2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride)**(10)**，其為白色粉末(271 mg, 96 %)。^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 10.47 (s, 1H), 8.08 (brs, 3H), 8.02 (s, 2H), 7.94 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.53 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.50 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.28 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.19 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 4.18 (dd, *J*=5.5, 8.5 Hz, 1H), 3.15-3.06 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)。

【0123】 **7. 化合物11之合成**

【0124】 (11) 合成例11

【0125】 化合物**11g**之合成方案如以下方案8所示。

【0126】 方案8



【0127】 對2-（4-（羥甲基）苯基）乙酸(2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetic acid)(5233 mg, 31.49 mmol)在CH_2Cl_2(25 mL)與MeOH (6 mL)中的零度溶液逐滴添加TMS重氮甲烷(diazomethane)（23.6 mL之於己烷中之 2 M溶液，47.23 mmol）。於15分鐘後，藉由添加HOAc(1 mL)以使反應淬滅(quenched)。將前述之反應混合物以EtOAc (100mL)稀釋，並以飽和$NaHCO_3$ (2×25 mL)與鹽水(25 mL)清洗。將有機層乾燥(Na_2SO_4)、過濾與濃縮。藉由急速層析法（0至33百分比EtOAc/己烷）純化殘留物，以獲得甲基2-(4-(羥甲基)苯基)乙酸鹽(methyl 2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetate)(**11b**)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ: 7.33 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.27 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 4.68 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (s, 2H)。

【0128】 對甲基2-（4-（羥甲基）苯基）乙酸鹽(**11b**) (5674 mg, 31.49 mmol)在CH_2Cl_2 (50 mL)中的零度溶液，添加2,6-二甲基吡啶(2,6-lutidine)(5.47 mL, 47.23 mmol)與TIPS-OTf(14.48 g, 47.23 mmol)。移除冰浴，使溶液回溫至室溫並攪拌。於2小時之後，藉由添加$NH_4Cl_{(aq)}$(50 mL)以使反應淬滅。將前述之反應混合物以CH_2Cl_2 (100 mL)稀釋，並以H_2O(2 x 50 mL)與鹽水 (50 mL)清洗。將有機層乾燥(Na_2SO_4)、過濾與濃縮。藉由急速層析法（0至5百分比EtOAc/己烷）純化殘留物，以獲得甲基2-（4-（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）乙酸鹽(methyl

2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)acetate)(**11c**)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.31 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 1.21-1.15 (m, 3H), 1.10-1.06 (m, 18H)。

【0129】 對甲基2-（4-（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）乙酸鹽(**11c**) (10.60 g, 31.49 mmol)在THF (50 mL)中之-78℃溶液，逐滴添加LiHMDS (47.30 mL, 47.23 mmol)。於30分鐘後，於相同溫度逐滴添加在THF(50 mL)中之溴甲基鄰苯二甲醯亞胺(bromo-methyl phthalimide)(11.34 g, 47.23 mmol)。移除-78℃冰浴，將溶液回溫至室溫並攪拌。2小時後，藉由加入$NH_4Cl_{(aq)}$(40mL)以使反應淬滅，並以EtOAc(100mL)進行萃取。將有機層進行乾燥(Na_2SO_4)、過濾並濃縮。藉由急速層析法（0至10百分比EtOAc/己烷）純化殘留物，以獲得甲基3-（1,3-二氧代異吲哚啉-2-基）-2-（4-（（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽(methyl 3-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy) methyl)phenyl) propanoate)(**11d**)。^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3): δ 7.79-7.76 (m, 2H), 7.69-7.67 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 4H), 4.77 (s, 2H), 4.31 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 4.26-4.15 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 1.17-1.06 (m, 3H), 1.05-1.02 (m, 18H)。

【0130】 對甲基3-(1,3-二氧代異吲哚啉-2-基)-2-(4-((((三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽(**11d**) (4.39 g, 8.86

mmol)在MeOH(30 mL)與EtOH(50 mL)的攪拌溶液中加入水合肼(hydrazine hydrate)(2.22 g, 44.29 mmol)，並將溶液回流2小時。 過濾固體，並蒸發溶劑。藉由急速層析法（0至50百分比EtOAc/己烷）純化殘留物，以獲得甲基3-氨基-2-（4-（（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽(methyl 3-amino-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoate)(**11e**)。

【0131】 對甲基3-氨基-2-（4-（（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽(**11e**)(3.19 g, 8.74 mmol)在CH_2Cl_2(50 mL)中且經攪拌的溶液中加入TEA(2.44 mL, 17.47 mmol)與$(Boc)_2O$ (17.47 mmol)。 將此溶液在室溫下攪拌4小時，然後倒入$CH_2Cl_2/NaHCO_{3(aq)}$中。將水層以CH_2Cl_2進一步萃取、乾燥(Na_2SO_4)、過濾並蒸發。藉由急速層析法（0至4百分比EtOAc/己烷）純化殘留物，以獲得甲基3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽(methyl 3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoate)(**11f**)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.32 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.22 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 4.86-4.82 (m, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.88-3.83 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.51-3.48 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.21-1.14 (m, 3H), 1.10-1.08 (m, 18H)。

【0132】 對甲基3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（三

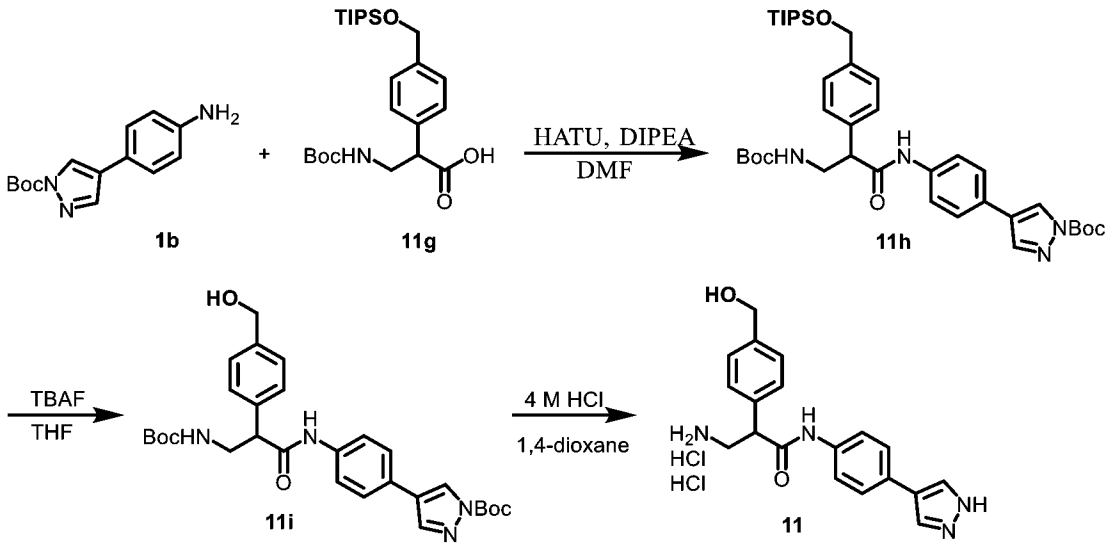
異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸鹽**(11f)**(2.07 g, 4.44 mmol)在THF/MeOH (1:1, 40 mL)中的溶液加入NaOH(8.88 mL, 17.76 mmol)，並在室溫下攪拌2小時。將混合物以1N HCl中和並以EtOAc萃取。將有機層以鹽水清洗，以Na_2SO_4乾燥並濃縮。將殘留物以矽膠管柱層析進行純化（洗提溶劑：EtOAc/己烷=1/3）以獲得化合物3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙酸

(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanoic acid)**(11g)**(1.84 g, 92%)，其為白色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.28 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 6.77 (brs, 0.5H), 4.92 (brs, 0.5H), 4.82 (s, 2H), 3.91-3.80 (m, 1H), 3.59-3.50 (m, 2H), 1.46-1.42 (m, 9H), 1.21-1.14 (m, 3H), 1.10-1.08 (m, 18H)。

【0133】 (12) 合成例12

【0134】 化合物**11**之合成方案如以下方案9所示。

【0135】 方案9



【0136】 最終化合物11的合成方法與化合物9相似。

【0137】 化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（三異丙基甲矽烷基）氧基）甲基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**11h**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.25 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.50 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.45 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.37 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.33-7.31 (m, 3H), 5.15 (brs, 1H), 4.83 (s, 2H), 3.90 (brs, 1H), 3.68 (brs, 1H), 3.58-3.55 (m, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.26-1.14 (m, 3H), 1.10-1.08 (m, 18H)。

【0138】 化合物叔丁基4-（4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（羥甲基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl

4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**11i**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.51 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.46-7.44 (m, 3H), 7.39-7.37 (m, 4H), 5.15 (brs, 1H), 3.92 (brs, 1H), 3.67-3.66 (m, 1H), 3.56-3.54 (m, 1H), 1.67-1.64 (m, 10H), 1.43 (s, 9H)。

【0139】 最終化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-（羥甲基）苯基）丙烯醯胺二鹽酸鹽

(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-(hydroxymethyl) phenyl)propenamide dihydrochloride)(**11**)為白色粉末。

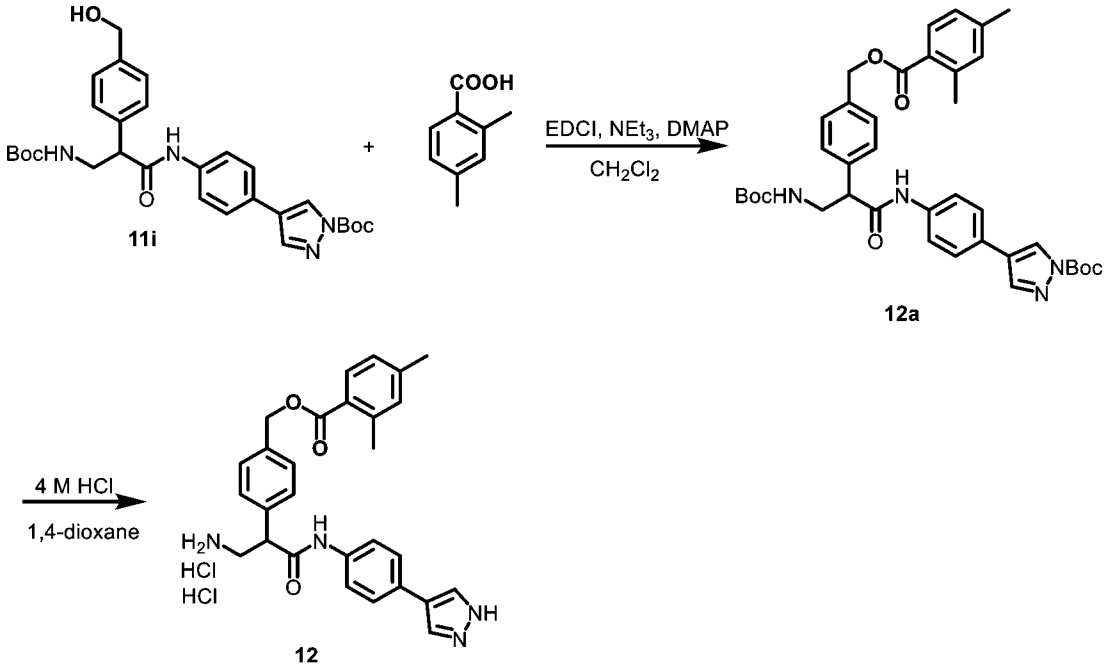
^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.05 (s, 2H), 7.44 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.35 (s, 4H), 7.27 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.08 (t, *J*=6.5 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J*=6.5, 13.0 Hz, 1H), 3.36 (dd, *J*=6.5, 13.0 Hz, 1H)。

【0140】 **8. 化合物12之合成**

【0141】 (13) 合成例13

【0142】 化合物**12**之合成方案如以下方案10所示。

【0143】 方案10



【0144】 最終化合物12的合成方法與化合物10相似。

【0145】 化合物叔丁基4-（4-（3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（（（（2,4-二甲基苯甲醯基）氧基）甲基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)methyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**12a**)為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 8.25 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.86 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.46-7.44 (m, 4H), 7.41-7.37 (m, 3H), 7.06-7.03 (m, 3H), 5.31 (s, 2H), 5.14 (brs, 1H), 3.93 (brs, 1H), 3.68-3.67 (m, 1H), 3.59-3.55 (m, 1H), 2.60 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 1.67 (s, 9H), 1.43 (s, 9H)。

【0146】 化合物2-（4-（1-（（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）氨基）-3-氨基-1-氧丙烷-2-基）苄基2,4-二甲基苯甲酸酯二鹽酸鹽

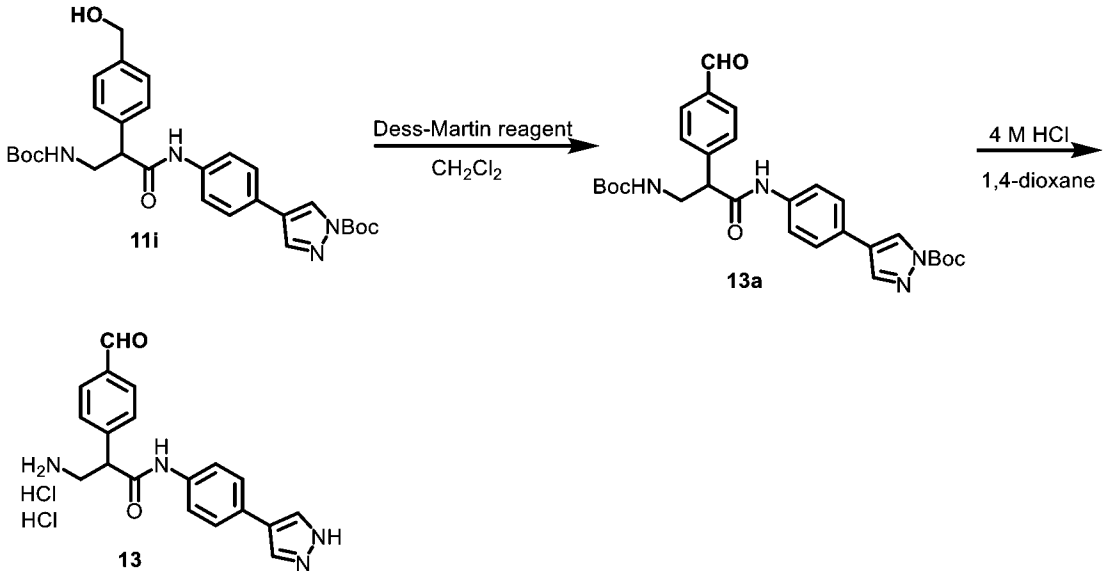
(4-(1-((4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-yl) benzyl 2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride) (**12**)為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 10.40 (s, NH, 1H), 8.03 (brs, NH, 3H), 8.00 (s, 2H), 7.75 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.51 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.47-7.44 (m, 4H), 7.12 (s, 1H), 7.09 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 4.13 (dd, *J*=5.5, 9.0 Hz, 1H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.29 (s, 3H)。

【0147】 **9. 化合物13之合成**

【0148】 (14) 合成例14

【0149】 化合物13之合成方案如以下方案11所示。

【0150】 方案11



【0151】 對叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-（羥甲基）苯基）丙醯胺基）苯基）-1-H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl

4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**11i**)(100 mg, 0.19 mmol)在CH_2Cl_2(10mL)中且經攪拌的溶液加入Dess-Martin試劑(166 mg, 0.37 mmol)。將所得溶液在室溫下攪拌1小時。在減壓下蒸發溶劑，並以管柱層析（EtOAc/己烷=25%至50%）純化粗產物，以獲得叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-甲醯基苯基）丙醯胺基）苯基）叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-formylphenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**13a**)，其為白色粉末。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 10.01 (s, CHO, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.88 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.62 (brs, 1H), 7.58-7.53 (m, 4H), 7.46 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 5.12 (brs, 1H), 4.13-4.05 (m, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.60-3.56 (m, 1H), 1.66 (s, 9H), 1.43 (s, 9H)。

【0152】 在4 mL小瓶中裝入叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-（4-甲醯基苯基）丙醯胺基）苯基）叔丁基-1-H-吡唑-1-羧酸鹽(**13a**)(52 mg, 0.10 mmol)與在二噁烷(1.0 mL)中之4 M HCl。將所得混合物在室溫下攪拌1小時。於減壓下移除溶劑，以獲得所需化合物N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-（4-甲醯基苯基）丙醯胺二鹽酸鹽(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-formylphenyl)propanamide dihydrochloride)(**13**)(44 mg, 90%)。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 9.79 (s, CHO, 1H), 7.94 (s, 2H), 7.84 (d,

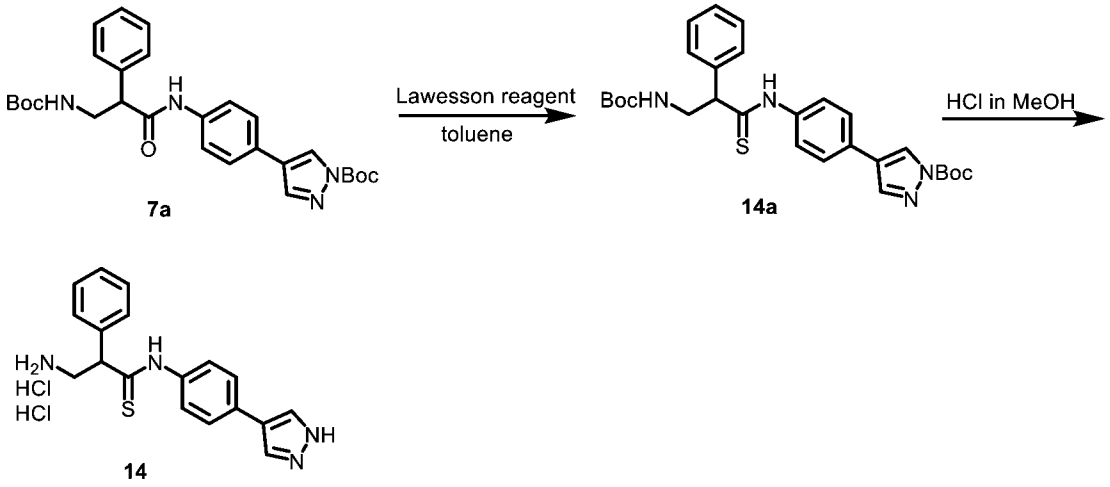
J=8.5 Hz, 2H), 7.53 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.39 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.25 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 4.19 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 3.60 (dd, J=7.0, 12.5 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J*=7.0, 12.5 Hz, 1H)。

【0153】 **10. 化合物14之合成**

【0154】 (15) 合成例15

【0155】 化合物14之合成方案如以下方案12所示。

【0156】 方案12



【0157】 將叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽**(7a)**(506 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq)與Lawesson試劑(808 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq)在甲苯(5 mL)中的混合物於N_2氣環境(N_2 atmosphere)下加熱至120℃持續16小時。將前述反應混合物冷卻並濃縮，以獲得粗化合物叔丁基4-（4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙烷硫代醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl) amino)-2-phenylpropanethioamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-

carboxylate)(**14a**)（520 mg，產率：100%），其無需進一步純化即可用於下一步驟。LCMS (ES, m/z): [M +H]+=523.3。

【0158】 將叔丁基4-（4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙烷硫代醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(**14a**)(520 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq)溶於1mL MeOH，加入HCl/ MeOH (3 M, 5 mL)於室溫攪拌3小時。將前述反應混合物濃縮。將殘留物藉由快速層析法（DCM/MeOH從100%至10%）純化，以獲得粗產物(110 mg)，又將其以DCM和MeOH結晶，並以1N HCl調整pH值至5.0，以獲得N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙硫醯胺二鹽酸鹽

(N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanethioamide dihydrochloride)（化合物**14**）（75 mg，產率：兩步驟23%），其為黃色固體。LCMS(ES, m/z): $[M+H]^+$=323.2。

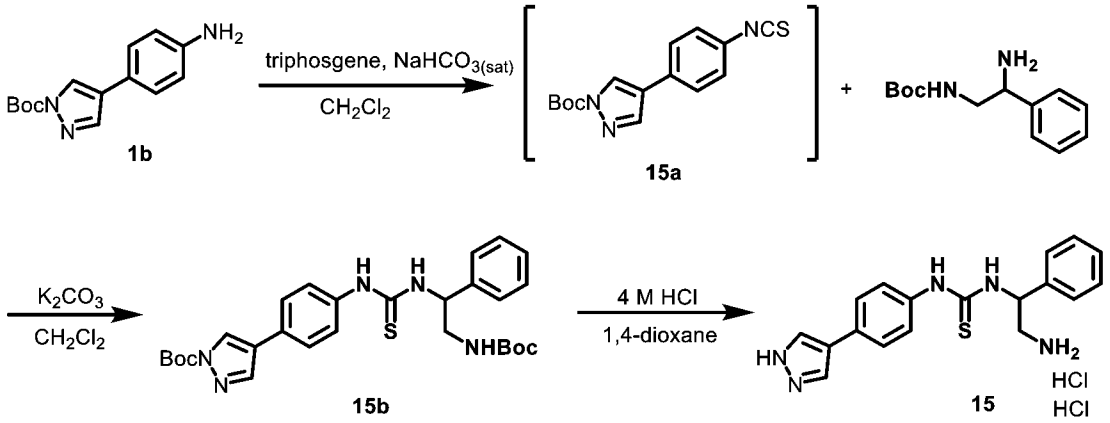
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 12.08 (s, 1H), 8.06-7.99 (m, 5H), 7.77 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.63-7.59 (m, 4H), 7.41-7.31 (m, 3H), 4.54-4.50 (m, 1H), 3.88-3.78 (m, 1H), 3.31-3.24 (m, 1H)。

【0159】 11. 化合物15之合成

【0160】 (16) 合成例16

【0161】 化合物15之合成方案如以下方案13所示。

【0162】 方案13



【0163】 對叔丁基-（4-氨基-3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）苯基）-1H-吡唑

(tert-butyl-(4-amino-3-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-1H-pyrazole)(200 mg, 0.85 mmol, 1.0 eq)在CH_2Cl_2 (4mL)之溶液加入$NaHCO_3$飽和溶液(2 mL, 0.4M)。接著緩慢加入硫光氣(thiophosgene)(97 mg, 0.85 mmol, 1.0 eq)，並攪拌3小時。將有機層以無水硫酸鈉乾燥，並於減壓下移除溶劑，以獲得粗產物**15a**。於殘留物15a中加入在CH_2Cl_2(4.0 mL)中之叔丁基（2-氨基-2-苯基乙基）氨基甲酸酯(*tert*-butyl (2-amino-2-phenylethyl)carbamate)(220 mg，0.85 mmol，1.0 eq)與K_2CO_3(235 mg, 1.70 mmol, 2.0 eq)。以水激活反應，並以CH_2Cl_2萃取。收集有機層並以Na_2SO_4乾燥，且將萃取液在減壓下濃縮。將殘留物以矽膠純化(EtOAc/Hex =20%)，以獲得化合物叔丁基4-（4-（3-（2-（2-（（叔丁氧基羰基）氨基）-1-苯基乙基）硫脲基）苯基）叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1-phenylethyl)thioureido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate) **(15b)**(353 mg,

85%)，其為淡黃色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ: 8.30 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.57 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.38-7.34 (m, 4H), 7.30-7.24 (m, 3H), 5.63 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.55-3.44 (m, 2H), 1.68 (s, 9H), 1.31 (s, 9H)。

【0164】 在20 mL小瓶中裝入化合物叔丁基4-（4-（3-（2-（2-（（叔丁氧基羰基）氨基）-1-苯基乙基）硫脲基）苯基）叔丁基-1H-吡唑-1-羧酸鹽**(15b)**(353 mg, 0.66 mmol)與4M HCl於二噁烷(3.3 mL)中。將所得混合物在室溫下攪拌1小時。於減壓下除去溶劑，以獲得化合物1-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-（2-氨基-1-苯基乙基）硫脲二鹽酸鹽

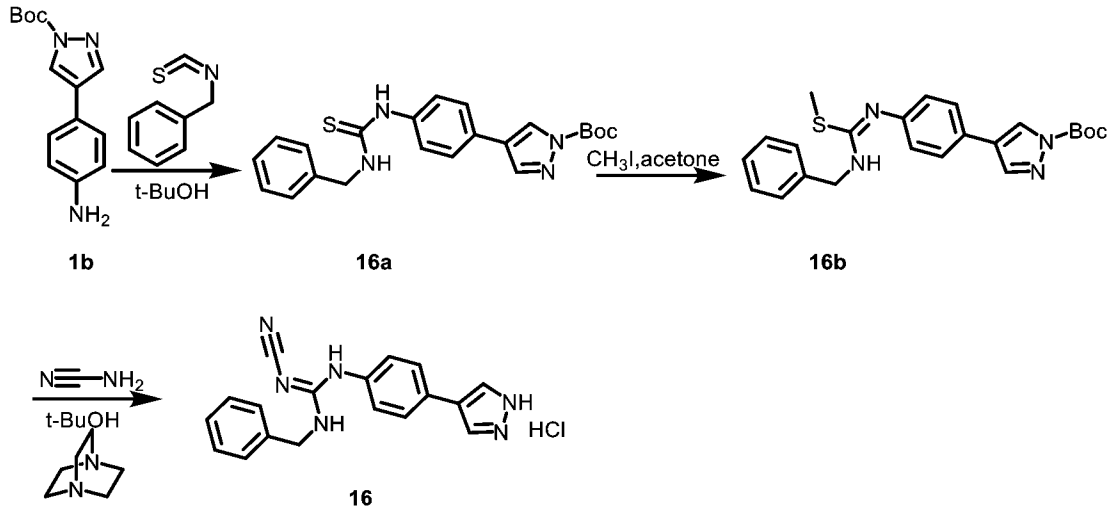
(1-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-(2-amino-1-phenylethyl) thiourea dihydrochloride)(**15**)(244 mg, 90 %)，其呈淡黃色粉末狀。^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 8.56 (brs, 2H), 7.65 (d, *J*=8.0, 2H), 7.60-7.58 (m, 2H), 7.48-7.39 (m, 4H), 7.38-7.37 (m, 1H), 6.08 (dd, *J*=9.0, 5.0 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J*=13.0, 9.0 Hz, 1H), 3.36 (dd, *J*=13.0, 5.0 Hz, 1H)。

【0165】 12. 化合物16之合成

【0166】 (17) 合成例17

【0167】 化合物16之合成方案如以下方案14所示。

【0168】 方案14



【0169】 將叔丁基-（4-氨基-3-（2-（二甲基氨基）乙氧基）苯基）-1H-吡唑(1b)(400 mg, 1.54 mmol, 1.0 equiv)與（異硫氰酸根合甲基）苯((isothiocyanatomethyl)benzene)(276 mg, 1.85 mmol, 1.2 eq)於叔丁醇(t-BuOH)(10 mL)中的混合物在N_2環境下於85℃攪拌隔夜。將前述之反應混合物冷卻並濃縮。將殘留物以矽膠管柱純化，並以乙酸乙酯/石油醚(1：1)活化，以獲得叔丁基4-（4-（3-苄硫脲基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-benzylthioureido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**16a**)（410 mg，產率：65%），其為黃色固體。LCMS(ES, m/z): $[M+H]^+$＝409.3。

【0170】 將叔丁基4-（4-（3-苄硫脲基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(**16a**)(410 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq)與CH_3I(214 mg, 1.51 mmol, 1.5 eq)於丙酮(15 mL)中的混合物在N_2環境下於30℃攪拌3小時。將前述之反應混合物過濾。收集濾餅(filter cake)，以獲得叔丁基4-（4-（（（（苄基氨基）（甲硫基）亞甲基）氨基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl

4-(4-(((benzylamino)(methylthio)methylene)amino)phenyl)-1H-pyrazole -1-carboxylate)(**16b**)（370 mg，產率：87%），其為白色固體。LCMS (ES, m/z): $[M+H]^+$=423.3。

【0171】 將叔丁基4-（4-（（（（苄基氨基）（甲硫基）亞甲基）氨基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(16b) (370 mg, 0.88 mmol, 1.0 eq)、氰胺(cyanamide)(110 mg, 2.63 mmol, 3.0 eq) 與1,4-二氮雜雙環[2.2.2]辛烷(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)(98 mg, 0.88 mmol, 1.0 eq)於叔丁醇(10 mL)中之混合物於在N_2環境下於 90℃隔夜攪拌，之後於130℃攪拌3小時。將前述之反應混合物冷卻並濃縮。將殘留物以二氯甲烷(10 mL)處理並過濾。藉由Prep-HPLC (H_2O:CH_3CN=7:3)將濾餅純化，以獲得1-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-苄基-2-氰基胍鹽酸鹽

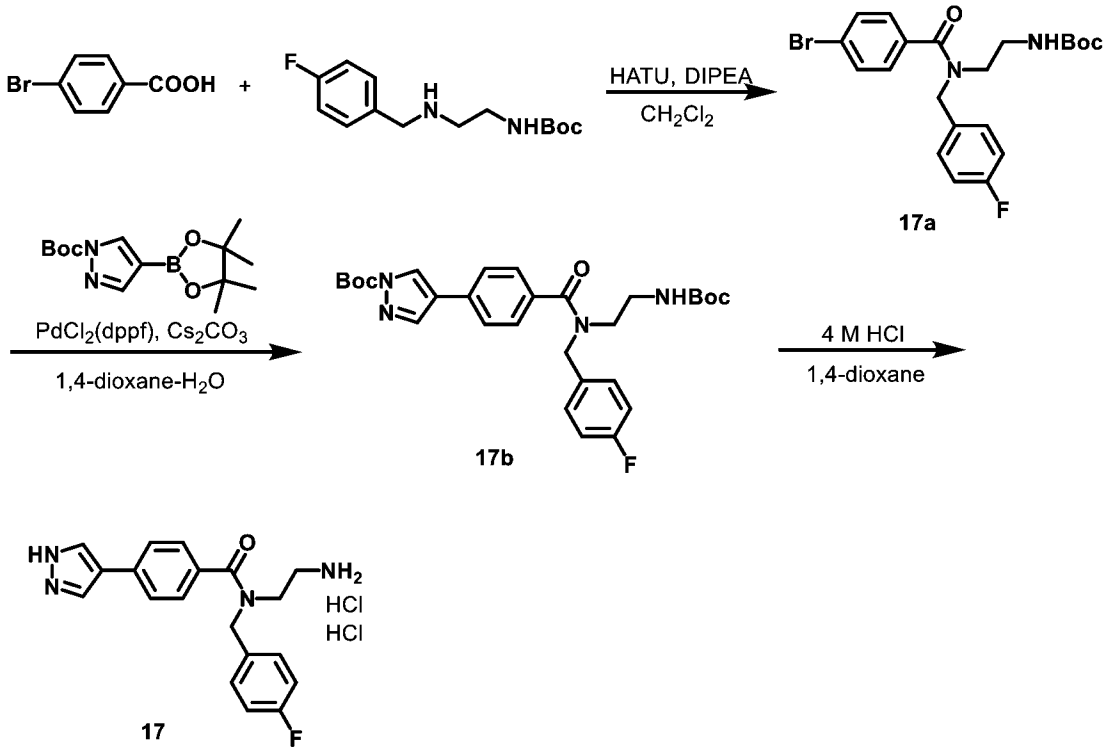
(1-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-benzyl-2-cyanoguanidine hydrochloride)(**16**)（53 mg，產率：19%），其為白色固體。LCMS (ES, m/z): $[M+H]^+$= 317.2。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 9.08 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.57 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.32 (t, J=7.4 Hz, 2H), 7.28-7.23 (m, 3H), 7.17 (d, J=8.8 Hz, 2H), 4.36 (d, J=5.6 Hz, 2H)。

【0172】 13. 化合物17之合成

【0173】 (18) 合成例18

【0174】 化合物17之合成方案如以下方案15所示。

【0175】 方案15



【0176】 對4-溴苯甲酸(4-bromobenzoic acid)(322mg, 1.60 mmol)與叔丁基（2-（（4-氟苄基）氨基）乙基）氨基甲酸酯(*tert*-butyl (2-((4-fluorobenzyl)amino)ethyl)carbamate) (430 mg, 1.60 mmol)在CH_2Cl_2(5 mL)中且經攪拌的溶液加入DIPEA(698 μL, 4.01 mmol)與HATU(732 mg, 1.92 mmol)。將前述之反應混合物在室溫下攪拌2小時。藉由減壓移除溶劑，藉由管柱層析將殘留物純化，以獲得叔丁基（2-（4-溴-N-（4-氟苄基）苯甲醯胺基）乙基）氨基甲酸酯(*tert*-butyl (2-(4-bromo-N-(4-fluorobenzyl)benzamido)ethyl)carbamate)(**17a**)(537 mg, 75 %)為一種油。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 7.53 (s, 1H), 7.31-7.29 (m, 2H), 7.10-7.04 (m, 4H), 5.01-4.75 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.58-3.19 (m, 4H), 1.44 (s, 9H)。

【0177】 將叔丁基（2-（4-溴-N-（4-氟苄基）苯甲醯胺基）

乙基）氨基甲酸酯**(17a)**(537 mg, 1.19 mmol)、叔丁基4-（4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼硼烷-2-基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(350 mg, 1.19 mmol)、$PdCl_2$(dppf)(87 mg，0.12 mmol）與Cs_2CO_3(775 mg, 2.38 mmol)的混合物裝入一密封試管，然後在氬氣下注入混合溶劑（二噁烷/H_2O =10/1, 6 mL），並將混合物在90℃下攪拌2小時。冷卻至室溫後，藉由旋轉蒸發移除溶劑，並對殘留物加水，且以EtOAc(15 mL×3)萃取。將合併的有機層以鹽水清洗，以無水Na_2SO_4乾燥並且過濾。將濾液濃縮並藉由急速層析法(EtOAc/Hex=25%至67%)於矽膠純化殘留物，以獲得叔丁基4-（4-（（2-（（叔丁氧基羰基）氨基）乙基）（4-氟苄基氨基甲醯基）苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(tert-butyl 4-(4-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)(4-fluorobenzyl)carbamoyl)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)**(17b)**，其為白粉末狀 (385 mg, 60 %)。^{1}H-NMR (CDCl3, 500 MHz) 8.32 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.47 (s, 2H), 7.14-7.04 (m, 4H), 5.07-4.78 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.60-3.33 (m, 4H), 1.68 (s, 9H), 1.45 (s, 9H)。

【0178】 對叔丁基4-（4-（（2-（（叔丁氧基羰基）氨基）乙基）(4-氟苄基氨基甲醯基)苯基)-1H-吡唑-1-羧酸鹽**(17b)**(300 mg, 0.56 mmol)與1,4-二噁烷(1 mL)的混合物加入在1,4-二噁烷(2.78 mL)中之4 M HCl。將前述之反應混合物在室溫下攪拌1小

時。將反應混合物濃縮。將殘留物以DCM(6 mL)處理並過濾。收集濾餅，以獲得N-（2-氨基乙基）-N-（4-氟苄基）-4-（1H-吡唑-4-基）苯甲醯胺二鹽酸鹽

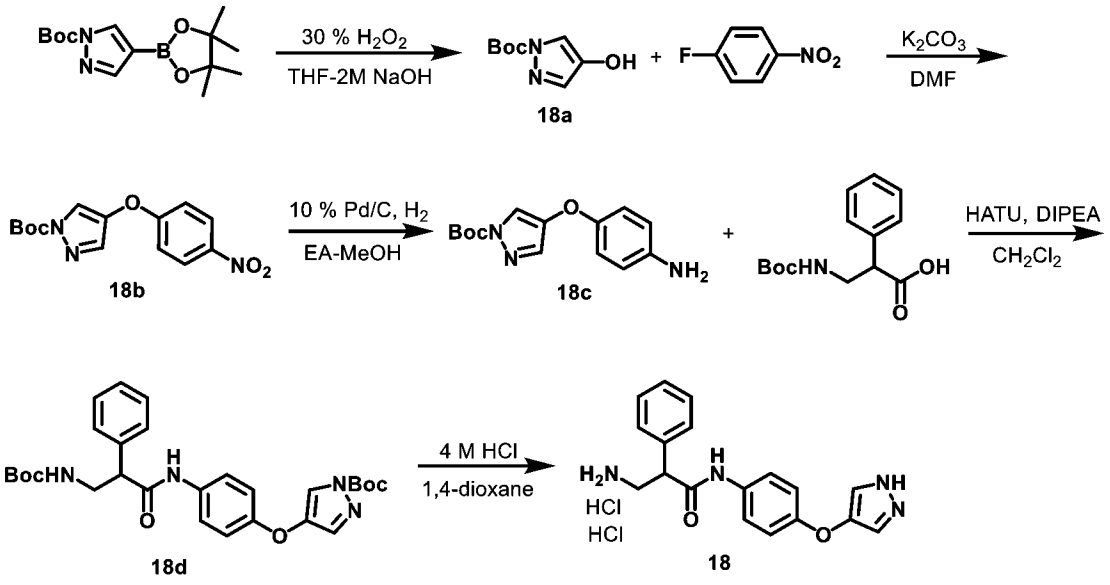
(N-(2-aminoethyl)-N-(4-fluorobenzyl)-4-(1H-pyrazol-4-yl) benzamide dihydrochloride)(17, 200 mg, 87 %)，其為淺黃色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 7.99 (s, 2H), 7.40-7.32 (m, 4H), 7.04-6.97 (m, 4H), 4.41 (s, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.06 (s, 2H)。

【0179】 14. 化合物18之合成

【0180】 (19) 合成例19

【0181】 化合物18之合成方案如以下方案16所示。

【0182】 方案16



【0183】 對4-（4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼硼烷-2-基）-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯(*tert*-butyl

4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(1540 mg, 5.24 mmol)在THF(15 mL)於0℃且經攪拌的溶液加入2 M $NaOH_{(eq)}$(5.24 mL, 10.47 mmol)，接著加入30%過氧化氫(1.19 mL, 10.47 mmol)，並將前述之反應混合物先於0℃攪拌30分鐘再於室溫下攪拌1小時。將反應混合物冷卻至0℃，並以DCM稀釋，且加入2M $HCl_{(eq)}$直至達到pH值為2。收集有機層，乾燥並於減壓下去除溶劑，以獲得叔丁基4-羥基-1H-吡唑-1-羧酸鹽(tert-butyl 4-hydroxy-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**18a**)(965 mg, 100 %)，其為黃色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.28 (s, OH, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 1.52 (s, 9H)。

【0184】 對叔丁基4-羥基-1H-吡唑-1-羧酸鹽(18a)(965 mg, 5.24 mmol)與1-氟-4-硝基苯(1-fluoro-4-nitrobenzene)(739 mg, 5.24)在DMF(10 mL)中且經攪拌的溶液加入K_2CO_3(1447 mg, 10.47 mmol)。將前述之反應混合物在90℃下攪拌12小時。在減壓下移除溶劑，藉由管柱層析（EtOAc/己烷=10%）將殘留物純化，以獲得叔丁基4-（4-硝基苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-nitrophenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**18b**)(479 mg, 30 %)，其為黃色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ: 8.22 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.10 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 1.67 (s, 9H)。

【0185】 對叔丁基4-（4-硝基苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(**18b**)(140 mg, 0.46 mmol)於MeOH (5 mL)與EtOAc (5 mL)

中的溶液中加入10%Pd/C(49 mg, 0.046 mmol)。將前述之反應混合物於H_2氣環境之室溫下攪拌2小時。將混合物過濾，並藉由旋轉蒸發濾液，以獲得叔丁基4-（4-氨基苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-aminophenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**18c**)(118 mg, 93 %)，其為棕色固體。

【0186】 對3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙酸(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanoic acid) (114 mg, 0.43 mmol)與叔丁基4-（4-氨基苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽 (118 mg, 0.43 mmol)在CH_2Cl_2 (25mL)中且經攪拌的溶液，加入DIPEA(187 μL, 1.07 mmol)與HATU(196 mg, 0.51 mmol)。將前述之反應混合物在室溫下攪拌2小時。藉由減壓移除溶劑，然後將殘留物以製備逆相高效液相色層分析(80% ACN, 20% H_2O)純化，之後冷凍乾燥，以獲得叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**18d**)(110 mg, 49 %)，其為白色粉末。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.79 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.42 (d, = 8.0 Hz, 2H), 7.39-7.29 (m, 5H), 6.98 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 5.15 (brs, 1H), 3.89 (t, J=5.0 Hz, 1H), 3.70-3.58 (m, 1H), 3.56-3.54 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.51 (s, 9H)。

【0187】 對叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）

-2-苯基丙醯胺基）苯氧基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(**18d**)(110 mg, 0.21 mmol)與1,4-二噁烷(1 mL)的混合物，加入在1,4-二噁烷(1.05 mL)中之4M HCl。將前述之反應混合物在室溫下攪拌1小時。將反應混合物濃縮。將殘留物以DCM(5 mL)處理並過濾。收集濾餅，以獲得N-（4-（（（1H-吡唑-4-基）氧基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺二鹽酸鹽

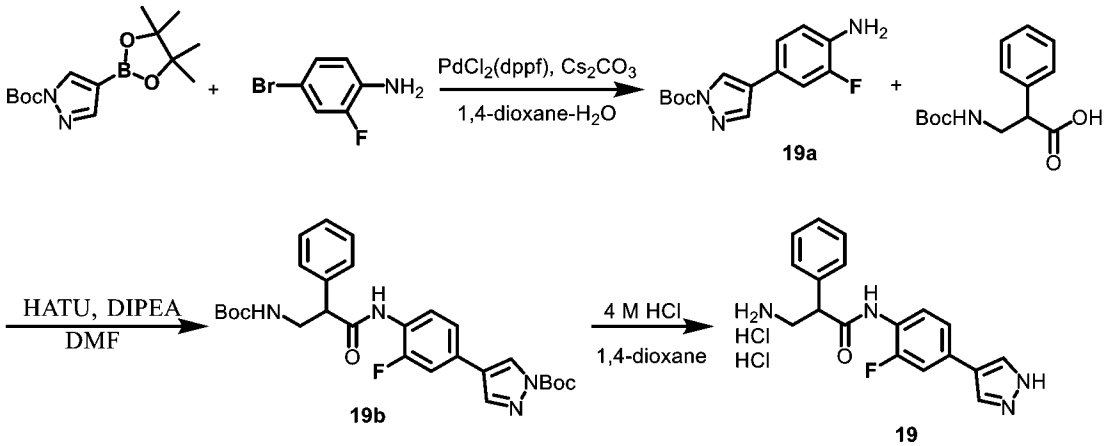
(N-(4-((1H-pyrazol-4-yl)oxy)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(**18**)(82 mg, 22 %)，其為白色固體。^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.84 (s, 2H), 7.54 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.53-7.40 (m, 4H), 7.37-7.34 (m, 1H),7.02 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 4.13-4.10 (m, 1H), 3.62-3.57 (m, 1H), 3.24 (dd, *J*=5.5, 12.5 Hz, 1H)。

【0188】 15. 化合物19之合成

【0189】 (20) 合成例20

【0190】 化合物19之合成方案如以下方案17所示。

【0191】 方案17



【0192】 對在密封管中之4-溴-2-氟苯胺

(4-bromo-2-fluoroaniline)(1211 mg, 6.37 mmol)、1-Boc-4-吡唑硼酸頻哪醇酯(1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester) (1875 mg, 6.37 mmol)、$PdCl_2$(dppf)(467mg，0.64mmol)與Cs_2CO_3（4153 mg，12.75 mmol）的混合物，在氬氣下注入混合溶劑（二噁烷/H_2O=9/1, 36 mL），之後將混合物在80℃下攪拌2小時。於冷卻至室溫後，經由旋轉蒸發去除溶劑，且對殘留物加水，並以EtOAc (30 mL×3)進行萃取。將經合併之有機層以鹽水清洗、以無水Na_2SO_4乾燥並過濾。將濾液濃縮且將殘留物藉由急速層析法（EtOAc/Hex=15%至17%）於矽膠進行純化以獲得叔丁基4-（4-氨基-3-氟苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl 4-(4-amino-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate) **(19a)**(1362 mg, 77%)，其為油。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.17 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.15 (dd, *J*=2.0, 12.0 Hz, 1H), 7.11 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.80 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 1.67 (s, 9H)。

【0193】 對3-（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙酸(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanoic acid) (346 mg, 1.31 mmol)與叔丁基4-（4-氨基-3-氟苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽**(19a)** (362 mg, 1.31 mmol)在DMF（2 mL）中且經攪拌的溶液，加入DIPEA（569 μL，3.26 mmol）與HATU（596 mg，1.57 mmol）。將前述之反應混合物在室溫下攪拌2小時。藉由減壓移除溶劑，接著將殘留物以製備逆相高效液相色層分析(80% ACN, 20% H_2O)純化，之後冷凍乾燥，以獲得叔丁基4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）-3-氟苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(*tert*-butyl

4-(4-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate)(**19b**)(321 mg, 47%)，其為白色粉末狀。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.32 (t, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.42-7.33 (m, 5H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.19 (d, *J*=11.5 Hz, 1H), 5.12 (brs, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.71-3.68 (m, 1H), 3.60-3.58 (m, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.43 (s, 9H)。

【0194】 對溶於 1,4-二噁烷(1 mL)之叔丁基4-(4-(3-(((叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）-3-氟苯基）-1H-吡唑-1-羧酸鹽(19b)(315 mg, 0.60 mmol)，加入在1,4-二噁烷(4.0 mL)中之4M HCl。將前述之反應混合物在室溫下超音波處理30分鐘。藉由過濾收集白色粉末、以DCM洗滌並乾燥，以獲得3-氨基-N-(2-氟-4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-2-苯基丙醯胺二鹽酸鹽

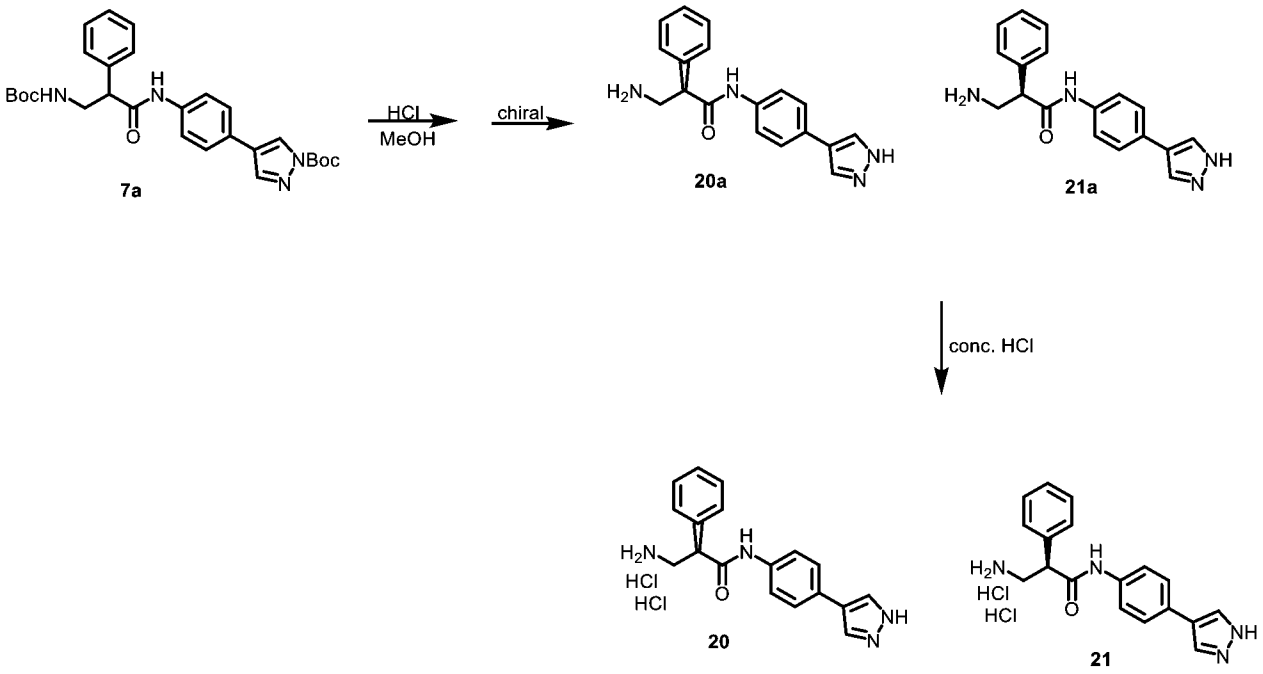
(3-amino-N-(2-fluoro-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(**19**)(230 mg, 96 %)。^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O) δ: 8.05 (s, 2H), 7.42-7.38 (m, 6H), 7.28 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 4.18 (t, *J*=7.0 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J*=7.0, 13.0 Hz, 1H), 3.39 (dd, *J*=7.0, 13.0 Hz, 1H)。LCMS (ES, m/z): $[M-2HCl+H]^+$=326.1, $[M-2HCl+Na]^+$=348.1。

【0195】 16. 化合物20與化合物21之合成

【0196】 (21) 合成例21

【0197】 化合物20與21之合成方案如以下方案18所示。

【0198】 方案18



【0199】 對4-（4-（3-（（（叔丁氧基羰基）氨基）-2-苯基丙醯胺基）苯基）-1H-吡唑-1-甲酸叔丁酯(tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate) (15 g, 29.6 mmol, 1.0 eq) 在MeOH(150 mL)中的溶液加入HCl/MeOH(150 mL)。將前述混合物於室溫隔夜攪拌。將混合物濃縮並將殘留物溶於H_2O(50 mL)中，以$NaHCO_3$水溶液調整pH值至9。將混合物過濾，將濾餅真空乾燥，以獲得N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺 (N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide)(10 g, 100 %)，其為白色固體。藉由手性拆分(chiral resolution)純化固體，以獲得(S)-N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺**(20a)**與(R)-N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）

-3-氨基-2-苯基丙醯胺(**21a**)

【0200】 分離條件:

管柱: ChiralPak AD-H Daicel chemical Industries, Ltd, 250*30mm I.D., 10 μm

移動相 A：Supercritical CO_2, 移動相B：MeOH (0.1%NH_3H_2O)

A:B = 60:40於50 mL/分鐘

管柱溫度: 38℃

噴嘴壓力：100Bar；噴嘴溫度：60℃；蒸發溫度：20℃；微調溫度(Trimmer Temp)：25℃；波長：220 nm

【0201】 對H_2O溶液(10 mL)中之(S)- N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺的加入濃HCl(2 mL)，並濃縮以獲得(S)-N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺二鹽酸鹽 ((S)-N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride)(**20**)(2.1 g)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): 10.55 (s, 1H), 8.20 (s, 3H), 8.13 (s, 2H), 7.65-7.29 (m, 9H), 4.22-4.19 (m, 1H), 3.51 (s, 1H), 3.04-3.01 (m, 1H)。LCMS: $[M+H]^+$=307.1。

【0202】 對H_2O溶液(10 mL)中之（R）-N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺的加入濃HCl(2 mL)，並濃縮以獲得(R)- N-（4-（1H-吡唑-4-基）苯基）-3-氨基-2-苯基丙醯胺二鹽酸鹽 (**21**)(2.1 g)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6): 10.50

(s, 1H), 8.16 (s, 3H), 8.11 (s, 2H), 7.64-7.29 (m, 9H), 4.20-4.16 (m, 1H), 3.53-3.48 (m, 1H), 3.06-3.00 (m, 1H)。LCMS: $[M+H]^+$=307.1。

【0203】 **實施例2**

【0204】 體外功效測試

【0205】 A. 對Rho相關的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase, ROCK)之抑制功效測試

【0206】 測試上方所合成之各化合物對於ROCK的抑制效果

【0207】 A-1. 方法

【0208】 1. 以DMSO將10 mM之測試化合物稀釋為1 mM，接著再稀釋為300 nM。Netarsudil (AR-13324)為市售降眼壓藥物，AR-13503為AR-13324之活性代謝物。

【0209】 2. 將上述300 nM之測試化合物進行系列稀釋，以分別獲得濃度為100 nM、33 nM、11 nM、3.7 nM、1.2 nM以及0.4 nM的測試化合物。

【0210】 3. 將1 μL之上述經系列稀釋的測試化合物加入49 μL之經調整之ROCK反應緩衝溶液(Modified ROCK reaction buffer)（含0.1 M KCl、0.01 M $MgCl_2$、0.1 mM EGTA與2.25 μg/mL ROCK1之0.05 M Trizma®hydrochloride buffer (pH 7.5)）以獲得實驗組樣本。取1 μL DMSO加入49 μL之經調整之ROCK反應緩衝溶液以獲得正控制組樣本（最大值 = 100%）。取1 μL DMSO加入49 μL之緩衝溶液（含0.1 M KCl, 0.01 M $MgCl_2$

與0.1 mM EGTA之0.05 M Trizma® hydrochloride buffer (pH 7.5)）以獲得載劑控制組樣本（最小值=0%）。

【0211】 4. 將20 μL之上述配製樣本加入平底之96孔盤，並於每孔中加入20 μL ROCK ATP緩衝溶液。

【0212】 5. 將上述96孔盤放置於迴旋式震盪器上，於室溫下反應90分鐘。

【0213】 6. 接著，將40 μL Kinase-Glo luminescent kinase assay solution (Promega, RV6712)加入上述96孔盤，並將96孔盤置於迴旋式震盪器上，於室溫下反應10分鐘。

【0214】 7.以SpectraMax M5 microplate reader測定96孔盤之各孔的冷光數值，並以下方公式計算ROCK抑制率(%)。

最大值 = 在無任何測試化合物存在下，利用上述方法所測得之值（酵素與基質完全反應的狀況下所測得之值為最大值）

最小值 = 在無酵素存在下，利用上述方法所測得之值（無酵素與基質反應所測得之值為最小值）

抑制率(%) =（實驗組（添加測試化合物之組所測得的值）-最小值）/（最大值-最小值）*100%

【0215】 A-2. 結果

【0216】 結果如表2所示。

【0217】 表2

化合物	ROCK1 IC_{50}(nM)
AR-13324	+++++

AR-13503（AR-13324之活性代謝物）	++++++
化合物1	+++
化合物2	++++
化合物3	+++
化合物4	+++++
化合物5	+++++
化合物6	++++
化合物7	+++++
化合物8	+++++
化合物9	+++++
化合物10	+++
化合物11	+++++
化合物12	++++
化合物13	++++++
化合物14	+++++
化合物15	+++
化合物16	+
化合物17	+++
化合物18	+
化合物19	++++
化合物20	+++++
化合物21	+++

註：++++++代表IC_{50}<1 nM；+++++代表IC_{50}=1-10 nM；++++代表IC_{50}=10~100 nM；+++代表IC_{50}=100-1000 nM；++代表IC_{50}>1,000 nM；+代表IC_{50}>10,000 nM

【0218】 B. 對肌凝蛋白輕鏈激酶-4 (myosin light chain kinase 4, MYLK-4)之抑制功效測試

【0219】 實驗流程係參考ThermoFisher Scientific所提供之LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay Screening Protocol and Assay Conditions。

【0220】 B-1. 材料製備

【0221】 將配製於100% DMSO中之測試化合物儲存溶液 (1 mM)，進行3倍系列稀釋10次，以備測定其對MYLK-4的IC_{50}。

【0222】 激酶/抗體混合物(Kinase/Antibody Mixture)，預先以激酶緩衝液(Kinase Buffer)稀釋為2X工作濃度。

【0223】 B-2. 分析方法

【0224】 1. 於白色384微孔平盤(Greiner, Cat.NO. 784207)中加入激酶緩衝液3.84 μL，接著加入上述激酶/抗體混合物8.0 μL，再加入追踪劑(AlexaFluor labeled Tracer) 4.0 μL，之後加入上述經稀釋之適當濃度測試化合物160 nL，並使培養盤震盪30秒。

【0225】 2. 接著將培養盤放置在室溫下培養60分鐘，再以螢光盤分析器(fluorescence plate reader)讀取並分析數據。並以下公式計算各孔洞中之反應液的發射比。

【0226】 發射比(emission eatio, ER)= AF647發射(665 nm)/ 銪發射(europium emission) (615 nm)

【0227】 此外，於上述分析中同時設置有LanthaScreen Eu激酶之結合分析的對照組：抑制0%對照組(0% displacement control)，反應中不含已知抑制劑，作為最大發射比(maximum emission ratio)；抑制100%對照組(100% displacement control)，包含最高濃度之已知抑制劑，作為最小發射比(minimum emission ratio)；其中，已知抑制劑為Sunitinib。

【0228】 LanthaScreen Eu Kinase之結合分析的反應成份如表3所示。已知抑制劑Sunitinib之IC_{50}為19.0 nM，符合預期IC_{50}範圍。

【0229】 表3、LanthaScreen Eu激酶之結合分析的反應成份

反應成份	濃度(nM)/IC_{50} (nM)
激酶(MYLK4)	5
抗體(Eu-anti-GST)	2
追踪劑(Tracer 222)	100 (Kd為173 nM)
緩衝溶液A (包括HEPES、BRIJ-35、$MgCl_2$及EGTA)	50 mM HEPES (pH 7.5)、0.01% BRIJ-35、10 mM $MgCl_2$及1 mM EGTA

【0230】 3. 測試化合物於不同濃度對MYLK-4的抑制率可依據以下公式獲得：

【0231】 抑制%= [($ER_{抑制0\%對照組}$ - $ER_{樣本}$)/($ER_{抑制0\%對照組}$ - $ER_{抑}$

制100%對照組)]*100

【0232】 4. 根據上方所得測試化合物於不同濃度對MYLK-4的抑制率，計算出測試化合物於MYLK-4的IC_{50}。

【0233】 B-3. 結果

【0234】 結果如表4所示。

【0235】 表4、測試化合物之MYLK-4 IC_{50}

化合物	MYLK4 IC_{50}(nM)
AR-13324	++
AR-13503	+++
化合物1	+++
化合物2	+++
化合物5	+++
化合物6	+++
化合物7	++++
化合物8	++++
化合物10	++
化合物11	+++
化合物12	+++
化合物13	+++
化合物14	+++
化合物15	+++
化合物16	+

化合物17	+
化合物19	+++
化合物20	++++
化合物21	+++

註：++++++代表IC_{50}<1 nM；+++++代表IC_{50}=1-10 nM；++++代表IC_{50}=10-100 nM；+++代表IC_{50}=100-1000 nM；++代表IC_{50}>1,000 nM；+代表IC_{50}>10,000 nM

【0236】 C. 對YSK-4之抑制功效測試

【0237】 實驗流程係參考ThermoFisher Scientific所提供之Z'-LYTE Screening Protocol and Assay Conditions。

【0238】 C-1. 材料製備

【0239】 將配製於100% DMSO中之測試化合物儲存溶液 (1 mM)，進行3倍系列稀釋10次，以用於測定測試化合物對YSK-4的IC_{50}。

【0240】 胜肽/激酶抗體混合物(Peptide/Kinase Mixture)，預先以激酶緩衝液(Kinase Buffer)稀釋為2X工作濃度。

【0241】 ATP溶液，預先以激酶緩衝液(50 mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA)稀釋為4X工作濃度。

【0242】 顯影劑溶液為新穎PKC脂質混合物(Novel PKC Lipid Mix)，其含有2 mg/mL Phosphatidyl Serine、0.2 mg/mL

DAG於20 mM HEPES, pH 7.4與0.3% CHAPS，預先以顯影緩衝液稀釋10倍。

【0243】 C-2. 分析方法

【0244】 1. 於黑色384孔盤(Corning, Cat.NO. 4514)中加入上述經稀釋之適當濃度測試化合物100 nL、激酶緩衝液2.4 μL，接著加入上述胜肽/激酶混合物5 μL，再加入ATP溶液2.5 μL，並使培養盤震盪30秒。

【0245】 2. 接著將培養盤放置在室溫下培養60分鐘。

【0246】 3. 之後加入顯影劑溶液5 μL，並於黑暗中使培養盤震盪30秒，再以螢光盤分析器(fluorescence plate reader)讀取並分析數據。

【0247】 此外，針對激酶製作以下對照組，並將其與激酶置於於同一培養盤上：

【0248】 (1) 0%磷酸化對照組（100%抑制對照組）

【0249】 最大發射比由0%磷酸化對照組（100%抑制對照組）所建立，其不包含ATP，且因此不顯示激酶活性。該對照組在顯影反應中產生100%經裂解的胜肽。

【0250】 (2) 100%磷酸化對照組

【0251】 由與胜肽基質序列相同的合成磷酸化胜肽作為100%磷酸化對照組。此對照組在顯影反應中產生非常低百分比的裂解胜肽。

【0252】 依據0%磷酸化對照組與100%磷酸化對照組計算在特定反應孔(實驗組)中達到的磷酸化百分比。

【0253】 Z'-LYTE Screening Kinase之結合分析反應所使用的Z'-LYTE substrate種類為Ser/Thr 07胜肽，ATP反應濃度為5 μM (YSK4的Km)。本分析中作為對照用的已知抑制劑為Staurosporine。於系統中IC_{50}為12.7 nM，符合預期IC_{50}範圍。將各孔洞所測得之數值，依據下方公式計算出測試化合物於不同濃度對YSK-4的抑制率，並依此計算出測試化合物於YSK-4的IC_{50}。

【0254】 對背景螢光的校正= 螢光強度$_{樣本}$ −螢光強度$_{TCFI控制組}$

【0255】 發射比=香豆素(Coumarin)發射(445 nm)/螢光素發射(520 nm)（使用針對背景螢光之校正值）

%磷酸化=1- (發射比x $F_{100\%}$− $C_{100\%}$)/{ ($C_{0\%}$ − $C_{100\%}$) + [發射比 x ($F_{100\%}$ − $F_{0\%}$)]}*100

%抑制=(1 −%磷酸化$_{樣本}$/%磷酸化$_{0\%抑制對照組}$)*100

C100%：100%磷酸化對照組之平均香豆素發射訊號

C0%：0%磷酸化對照組之平均香豆素發射訊號

F100%：100%磷酸化對照組之平均螢光素發射訊號

F0%：0%磷酸化對照組之平均螢光素發射訊號

DRI：顯應反應干擾(Development Reaction Interference)

TCFI：測試化合物的螢光干擾(Test Compound Fluorescence Interference)

【0256】 C-3. 結果

【0257】 結果如表5所述。

【0258】 表5、測試化合物之YSK4 IC_{50}

化合物	YSK4 IC_{50} (nM)
AR-13324	n.a.
AR-13503	n.a.
化合物1	+
化合物2	+
化合物5	+
化合物6	+
化合物7	++
化合物8	++
化合物10	+
化合物11	++
化合物12	++
化合物13	++
化合物14	++
化合物15	+
化合物16	+
化合物17	+
化合物19	++

註：++++++代表IC_{50}<1 nM；+++++代表IC_{50}=1-10 nM；++++代表IC_{50}=10-100 nM；+++代表IC_{50}=100-1000 nM；++代表IC_{50}>1,000 nM；+代表IC_{50}>10,000 nM

【0259】整合前述結果可知，本揭露上述合成之化合物對於

ROCK、MYLK-4與YSK4，均具有抑制功效，且具有加成性標靶抑制作用，特別是化合物7與化合物20。

【0260】 又，由於目前已知經由抑制之ROCK表現可達成保護視神經（參見，如Rothschild et al., ROCK-1 mediates diabetesinduced retinal pigment epithelial and endothelial cell blebbing: Contribution to diabetic retinopathy. Scientific Reports. (2017) 7: 8834.與Tanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. (2018) 125:1741-1756.）與減緩或治療高眼壓（參見，如Tanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. (2018) 125:1741-1756）、青光眼壓（參見，如Tanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. (2018) 125:1741-1756）、眼中風（參見，如Yi et al., Protective Effects of Intravitreal Injection of the Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 in a Rodent Model of Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy (rAION). J Ophthalmol. (2020) 2020: 1485425.與Nourinia R, et al. ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. Br J Ophthalmol 2018;102:1-5.）、黃斑部病變（參見，如Sadiq et al. Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr (2020) 6:29.）、黃斑部水腫（參見，如

Sadiq et al. Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr (2020) 6:29.）、糖尿病視網膜病變（參見，如Nourinia R, et al. ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. Br J Ophthalmol 2018;102:1-5）、角膜內皮細胞損傷(Fuchs endothelial corneal dystrophy, FECD)(參見,如Okumura et al.The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing Invest Ophthalmol Vis Sci. (2013) 54:2439-2502.）、角膜纖維化（參見，如Słoniecka et al., Substance P induces fibrotic changes through activation of the RhoA/ROCK pathway in an in vitro human corneal fibrosis model. J Mol Med (Berl). 2019; 97(10): 1477-1489）等之功效，因此具有抑制ROCK之功效的本揭露上述合成之化合物，也可應用於眼科相關應用，如視神經的保護，及/或高眼壓、青光眼、眼中風、黃斑部病變、黃斑部水腫、糖尿病視網膜病變、角膜內皮細胞損傷及/或角膜纖維化的預防及/或治療等。

【0261】 此外，目前也已知經由抑制之ROCK表現可達成減緩或治療肺動脈高壓（參見，如Zhang et al., Effects of Fasudil on Patients with Pulmonary Hypertension Associated with Left Ventricular Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Prospective Intervention Study. Can Respir J. (2018) 2018: 314825）、慢性阻塞性肺病(COPD)（參見，如Liu

et al., Influence of Rho kinase inhibitor Fasudil on late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients with pulmonary artery hypertension. Bosn J Basic Med Sci. (2014) 14(1):40-4）、病因不明性肺纖維化（參見，如Knipe et al., The Rho Kinase Isoforms ROCK1 and ROCK2 Each Contribute to the Development of Experimental Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. (2018) 58(4): 471-481.）、肺氣腫（參見，如Bewley et al., Differential Effects of p38, MAPK, PI3K or Rho Kinase Inhibitors on Bacterial Phagocytosis and Efferocytosis by Macrophages in COPD. PLoS One. (2016) 11(9): e0163139.）、肺癌（參見，如Vigil et al., ROCK1 and ROCK2 are Required for Non-Small Cell Lung Cancer Anchorage-Independent Growth and Invasion. Cancer Res. (2012) 15: 72(20).）等之功效，因此具有抑制ROCK之功效的本揭露上述合成之化合物，也可應用於肺部相關疾病與症狀，如肺動脈高壓、慢性阻塞性肺病、病因不明性肺纖維化、肺氣腫及/或肺癌的預防及/或治療等。

【0262】 **實施例3**

【0263】 於正常兔之降眼壓模型之最大效應(maximal effect, Emax)劑量評估

【0264】 A. 化合物20

【0265】 1. 方法

【0266】 動物：雄性紐西蘭白兔（n=7/每組）；

【0267】 測試化合物配方：0.01%化合物20；0.03%化合物20；0.1%化合物20；

【0268】 投藥：對每隻實驗動物於右眼（投藥眼）滴入50 μL測試化合物並於左眼（對照眼）滴入50 μL載劑(vehicle)（不含測試化合物）。將上述3種配方每天投藥一次，連續3天。

【0269】 在第1天與第3天投藥前（0小時）以及投藥後2、4、6與8小時以Tono-Vet (iCare)測量每隻動物之眼壓。

【0270】 2. 結果

【0271】 結果如第1A圖與第1B圖，以及表6與表7所示。

【0272】 表6、第1天投藥之眼壓測定結果

化合物20濃度	降眼壓幅度 (ΔIOP) (mmHg)	最大眼壓下降幅度	T_{max} （小時）
0.10%	-5.3±0.6	32.2%	8
0.03%	-4.3±1.2	28.3%	8
0.01%	-2.9±1.1	18.7%	6

最大眼壓下降幅度%=（對照眼之眼壓-投藥眼之眼壓）/對照眼之眼壓*100

【0273】 表7、第3天投藥之眼壓測定結果

化合物20濃度	降眼壓幅度 (ΔIOP) (mmHg)	最大眼壓下降幅度	Tmax （小時）

0.10%	-5.2±1.3	32.6%	6
0.03%	-5.1±1.2	30.5%	8
0.01%	-2.7±0.8	15.4%	6

最大眼壓下降幅度%=（對照眼之眼壓-投藥眼之眼壓）/對照眼之眼壓*100

【0274】 第1A圖與表6顯示於第1天投藥之眼壓測定結果。第1B圖與表7顯示於第3天投藥之眼壓測定結果。

【0275】 結果顯示，化合物20在降眼壓效果方面呈現劑量依賴作用(dose dependent effect)，其中投予0.03%化合物20之組與投予0.1%化合物20之組的降眼壓幅度與趨勢相近。

【0276】 又，連續給藥3天，投予0.03%化合物20之組有些許藥效累積的現象（第3天比第1天之降眼壓幅度平均增加近1 mmHg）（參見表6與表7），但投予0.03%化合物20之組的降眼壓幅度與投予0.1%化合物20之組的降眼壓幅度相近（參見表7）。此結果顯示，化合物20於濃度0.03%應已接近此模型之眼壓測試極限，因此其所顯示之藥效(Emax)累積差異不大。

【0277】 本實驗所呈現之數據，係已去除不合格之數據（已去除第1天兩眼之眼壓差≥2 mmHg (n=1)與第3天給藥前兩眼之眼壓差>5 mmHg之白兔(n=1)），並去除反彈性高眼壓之數據(n=3)。每組n值≥3；另外投予0.01%化合物20之組的n值為6。

【0278】 由上述結果可知，濃度0.03%應已為化合物20於正常眼壓兔之模型中的最大效應(maximal effect, Emax)劑量。

【0279】 B. 化合物4、5、7、8、11、12與14

【0280】 以與對於化合物20之類似方法，確認化合物4、5、7、8、11、12與14於正常眼壓兔之模型中的最大效應劑量。

【0281】 結果顯示化合物4、5、7與8之最大效應劑量皆為1%，而化合物11、12與14之最大效應劑量分別為0.5%、0.25%與0.5%。

【0282】 **實施例4**

【0283】 於正常眼壓兔之模型中之降眼壓功效評估

【0284】 A. 化合物20

【0285】 1. 材料與方法

【0286】 實驗動物：紐西蘭大白兔，雄性，體重大於2公斤。紐西蘭大白兔係購自惠鈞養殖場。經過一週檢疫期後，以溫度16-22℃及30-70%相對濕度(Relative Humidity, RH)、8小時白天/16小時黑夜之環境條件，飼養於瑞德生物科技有限公司。

【0287】 實驗方法：

【0288】 (1) 降眼壓功效評估

【0289】 於將12隻紐西蘭大白兔(2.0-4.0 kg)秤重並分組後（每組n=3-6），將大白兔以包巾固定。待大白兔呈現穩定狀態後，拉開其右眼下眼瞼，將50 μL的測試樣本（含0.1%或0.03%化合物20之眼滴劑），滴入大白兔右眼的結膜囊內，闔上眼瞼，維持大白兔安定狀態至少2分鐘，並避免大白兔甩頭導致眼藥流出眼部；左眼給予載劑（不含測試化合物），作為對照組。以0.02% AR-13324作為比較基準(benchmark)，以評估測試化合物的藥效競爭性。眼壓偵測時間點為給藥前（0小時）及給藥後1、2、4、6與8小時。

【0290】(2) 刺激性評估

【0291】眼壓測量完畢後即進行兔眼外觀拍照，並依據經濟合作暨發展組織(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)所規定之眼刺激性試驗準則(OECD/OCDE 405)評估測試物質對大白兔眼睛角膜、虹膜或結膜造成的刺激狀態(adverse event)。

【0292】OECD/OCDE 405對於角膜、虹膜或結膜之評分方式如表8所示。

【0293】表8、眼刺激等級

不透明度	密度分數（應從最稠密的區域中讀取讀數）*
無潰瘍或渾濁	0
散亂或分散的不透明區域（正常光澤略微變暗）；虹膜之細節清晰可見	1
容易辨認的半透明區域；虹膜的細節稍微模糊	2
納克洛斯區(Nacrous Area)（角膜呈現珠光白）；沒有可見的虹膜細節；瞳孔大小幾乎無法識別	3
不透明角膜；虹膜無法通過不透明辨別	4

可能的最大值：4

*應注意角膜混濁區域

【0294】 (3)角膜觀察

【0295】 以0.1%化合物20之眼滴劑為測試樣本，實驗方法與上方「(1) 降眼壓功效評估」中所記載之實驗方法相同。進行7日連續投藥（每日一次），之後以裂隙燈觀察角膜狀態。

【0296】 (4) 候選藥物於投藥後存在於房水(aqueous humor, AH)之含量分析

【0297】 將正常兔投予化合物20，並於不同時間點確認化合物於房水中之含量。

【0298】 2. 結果

【0299】 降眼壓功效評估之結果如第2圖所示。

【0300】 依據第2圖可知，含0.1%化合物20之眼滴劑與含0.03%化合物20之眼滴劑的最大效應(Emax)顯示於投藥後6-8小時，而其最大降眼壓幅度為約4.4-4.9 mmHg，且眼刺激性輕微。

【0301】 又，此結果也顯示，於正常眼壓兔之模型中含0.03%化合物20之眼滴劑已達最大降眼壓作用。

【0302】 眼刺激性評估結果如第3A圖、第3B圖與第3C圖所示。

【0303】 由第3A圖與第3B圖可知，化合物20在最大效應劑量(0.1%)下之眼刺激性仍低於AR-13324(0.02%)。

【0304】 此外，第3C圖顯示，連續給藥7天，角膜仍無破損與混濁。

【0305】 化合物20於投藥後存在於虹膜與睫狀體及房水之含

量分析結果如第4圖所示。針對虹膜與睫狀體，化合物20之濃度係以單位ng/g進行測定；針對房水，化合物20之濃度係以單位ng/mL進行測定。

【0306】 依據第4圖可知，於投藥後化合物20在房水中之含量可達ROCK抑制需求。

【0307】 B.化合物4、5、7、8、11、12與14

【0308】 1. 方法

【0309】 (1) 降眼壓功效評估

【0310】 以與對於化合物20之類似方法，確認化合物4、5、7、8、11、12、14、20與21（使用最大效應劑量）於正常眼壓兔之模型中的降眼壓功效。

【0311】 (2) 安全邊際(safety margin)測試

【0312】 以化合物 7 為代表，將含 2%化合物 7 之眼滴劑投予兔眼（一天 3 劑，每次間隔 3 小時，並於給藥前以及每次給藥後 1 小時觀察）。另含 0.04%化合物 7 之眼滴劑投予兔眼（一天 1 劑，並於給藥前以及給藥後 1 小時與 6 小時觀察）。依據上述經濟合作暨發展組織所規定之眼刺激性試驗準則 OECD/OCDE 405，對化合物 7 之眼刺激性進行評估。

【0313】 2. 結果

【0314】 降眼壓功效評估之結果如表9所示。

【0315】 表9、降眼壓功效評估結果

化合物	**眼壓差(mmHg)/劑量/達最大效應之時間點**
AR-13324	4.5/1%/6小時

化合物4	4.2/1%/2小時
化合物5	1.5/1%/6小時
化合物7	5.1/1%/4小時
化合物8	5.2/1%/6小時
化合物11	2.0/0.5%/1小時
化合物12	2.0/0.25%/6小時
化合物14	2.5/0.5%/6小時
化合物20	4.9/0.03%/8小時
化合物21	1.3/0.03%/8小時

【0316】 安全邊際(safety margin)測試結果如第5圖與表10所示。

【0317】 表10、安全邊際測試結果

安全邊際	AR-13324	化合物7
治療指數(therapeutic index, TI)	2	3
OECD分數		
	AR-13324（治療指數：2）	化合物7（治療指數：3）
紅眼	1	1
結膜水腫	1	0
過度分泌	2	1

(Discharge)		
整體	4	2

【0318】 由第5圖與表10可知，AR-133247於治療指數為2時，OECD405整體分數為4，而化合物7於治療指數為3時，OECD405整體分數為2，因此化合物7之安全邊際優於AR-13324。

【0319】 **實施例5**

【0320】 獼猴動物模式

【0321】 1. 材料與方法

【0322】 將含0.1%或0.03%化合物20之眼滴劑投予正常獼猴。以0.02% AR-13324作為基準，以評估測試化合物的藥效競爭性。以氣動式眼壓測定儀(Model 30™ Pneumatonometer)測定動物眼壓。眼壓測定前需要先進行動物麻醉。分別在局部(topical)給藥後（一天一次）於所設定之時間點測定動物眼壓。

【0323】 2. 結果

【0324】 結果如第6圖所示。

【0325】 依據第6圖可知，化合物20可在正常眼壓獼猴達到與AR-13324相當或更優之降眼壓作用，且無明顯紅眼症等副作用。

【0326】 **實施例6**

【0327】 於高滲透壓食鹽水(hypertonic saline)所誘導之高眼壓兔模型（急性高眼壓模型）中的降眼壓功效評估

【0328】 1. 材料與方法

【0329】 實驗動物：紐西蘭大白兔，雄性，體重2.0-3.0 kg。

紐西蘭大白兔於試驗前購自台灣合格之實驗動物兔場，飼養於國立交通大學動物中心。

【0330】 測試樣本：含0.1%化合物20之眼滴劑

【0331】 負對照組(negative control) 1：生理食鹽水

【0332】 負對照組2：不含測試物質的載劑（含有5% 甘露醇(mannitol)、20mM 硼酸(boric acid)與0.125%壬苯醇醚-9(nonoxynol-9)）

【0333】 實驗方法：將雄性紐西蘭大白兔於秤重與分組後進行麻醉。將160 μL高滲透壓食鹽水(5% NaCl)注入於麻醉狀況下的大白兔左右眼玻璃體內，以使兔眼成為高眼壓狀態。接著，將50 μL生理鹽水(0.9% NaCl)、含0.1%化合物20之眼滴劑、用於製備化合物20之眼滴劑的載劑（不含化合物20）與含0.02% AR-13324之眼滴劑，分別滴入各組別的兔左右眼內。眼壓偵測(IOP)時間點為麻醉前（0小時）以及投藥後0.5、1、1.5、3與5小時。以生理食鹽水與不含測試物質之載劑作為負對照組，以含0.02% AR-13324之眼滴劑作為基準(benchmark)，以評估化合物20於高滲透壓食鹽水誘導高眼壓兔之模型中的降眼壓功效。

【0334】 2. 結果

【0335】 結果如第7圖與表11所示。

【0336】 表11、於高眼壓兔模型中之降眼壓測試結果

短暫性高眼壓兔				
	劑量	最大眼壓差 (mm Hg)	最大眼壓差(%)	AUC

生理食鹽水	-	-	-	139.7
AR-13324	0.02%	-7.7±4.2	-20.8%	132.9
用於製備化合物20之眼滴劑的載劑	-	+7.2±5.2	+16.2%	NA
化合物20	0.1%	-18.0±6.8	-40.4%	99.1

最大眼壓差：於記錄到最大反應之時間點，個體之眼壓讀數與負對照組1（生理食鹽水）之平均眼壓讀數之差異(J Ocul Pharmacol Ther. 2010 Apr;26(2):125-132)

【0337】 結果顯示，於高滲透壓食鹽水誘導高眼壓兔之模型中，含0.1%化合物20之眼滴劑可降低眼壓約18.0±6.8 mmHg，而含0.02% AR-13324之眼滴劑降低眼壓約7.7±4.2 mmHg。顯示化合物20的降眼壓功效相較於AR-13324明顯較佳(t-test，$p<0.05$)。而載劑相較於生理食鹽水於統計上(t-test)並無明顯差異。AR-13324相較於生理食鹽水或載劑，在統計上(t-test)也無顯著差異。

【0338】 **實施例7**

【0339】 於磁珠誘導高眼壓兔之模型（眼壓> 30 mmHg的高眼壓模型）中的降眼壓功效評估

【0340】 剝脫性青光眼(exfoliation glaucoma, XFG) 被認為比原發性隅角開放性青光眼(primary open angle glaucoma)更嚴重。剝脫性青光眼與原發性隅角開放性青光眼之最大眼壓(38.2

vs 26.9 mmHg)、最小眼壓(24.7 vs 18.4 mmHg)與平均眼壓變化(13.5 vs 8.5 mmHg)在統計學上具顯著差異。又，目前並無已知的飲食療法、藥物或其他干預措施可以防止剝脫性綜合徵(exfoliation syndrome)的發生或減慢其發展(Progress in Retinal and Eye Research Vol. 19, No. 3, pp. 345 to 368, 2000)。由上述可知，剝脫性青光眼之眼壓可以達到>30 mmHg，且目前對其並無有效藥物，因此，於此提供眼壓> 30 mmHg的高眼壓模型以評估本揭露之化合物應用於剝脫性青光眼與眼壓> 30 mmHg的高眼壓之治療的可行性。

【0341】 A. 化合物20

【0342】 1. 材料與方法

【0343】 實驗動物：紐西蘭大白兔，雄性，體重2.0-3.0 kg。紐西蘭大白兔於試驗前購自惠鈞養殖場，飼養於國立交通大學動物中心。

【0344】 測試樣本：含0.03%或0.1%化合物20之眼滴劑

【0345】 負對照組1：不含測試化合物20的載劑（含有5% 甘露醇、20mM 硼酸與0.125%壬苯醇醚-9）

【0346】 負對照組2：不含測試化合物AR-13324的載劑（含有4.7% D-甘露醇與0.05%硼酸）

【0347】 實驗方法：將雄性紐西蘭大白兔於秤重與分組後以Zoletil 50 0.2 mL/kg進行麻醉紐西蘭大白兔。將50 μL磁珠溶液（50 mg/mL，磁珠粒徑10 μm）注入於麻醉狀況下的大白兔左右眼前眼房內，以使兔眼成為高眼壓狀態。眼前房注射結束後，立即在眼周套入強力鋁鐵磁鐵環處理10-20分鐘，以使磁珠完全堵住眼

房水排水組織。以抗生素消毒眼球後，提供保濕眼膏進行眼球恢復，並待眼壓升高。約3天後，眼壓可以達到>30 mmHg的高眼壓，並可以持續至少10天。在眼壓達到目標眼壓>30 mmHg的高眼壓後，將含0.03%或0.1%化合物20之眼滴劑（右眼）、用於製備化合物20之眼滴劑的載劑（不含化合物20）（左眼）、含0.02% AR-13324之眼滴劑（右眼）與用於製備AR-13324眼滴劑的載劑（不含AR-13324）（左眼），分別滴入一滴（約35 μL）於各組別的兔左右眼內。眼壓偵測(IOP)時間點為給藥前（0小時）以及給藥後2、4、6與8小時，實驗連續進行2天。以含0.02% AR-13324之眼滴劑作為基準，以評估化合物20於磁珠誘導高眼壓兔之模型（眼壓> 30 mmHg的高眼壓模型）中的降眼壓功效。

【0348】 2. 結果

【0349】 結果如表12與第8圖所示。

【0350】 表12、化合物 20於磁珠誘導高眼壓兔之模型中的降眼壓測試結果

化合物	劑量	最大眼壓差(mmHg)
AR-13324	0.02%	4.3±1.4
化合物 20	0.03%	5.7±0.6
	0.1%	12.1±1.4

【0351】 結果顯示，於磁珠誘導高眼壓兔之模型（眼壓> 30 mmHg 的高眼壓模型）中，含 0.03%化合物 20 之眼滴劑可降低眼壓約 5.7±0.6 mmHg（降低約 15.3%），而含 0.1%化合物 20 之

眼滴劑可降低眼壓約 12.1±1.4 mmHg（降低約 28.8%）。亦即含 0.03%化合物 20 之眼滴劑與含 0.1%化合物 20 之眼滴劑的降眼壓功效均優於含 0.02% AR-13324 之眼滴劑（降低眼壓約 4.3±1.4 mmHg（降低約 11.0%）），且含 0.1%化合物 20 之眼滴劑的降眼壓功效甚至可為含 0.02% AR-13324 之眼滴劑的 2 倍以上。

【0352】 B. 化合物 7

【0353】 以與對於化合物 20 之類似方法，確認化合物 7（使用最大效應劑量 0.5%與 1%）於正常眼壓兔之模型中的降眼壓功效。

【0354】 結果如表 13 所示。

【0355】 表 13、化合物 7 於磁珠誘導高眼壓兔之模型中的降眼壓測試結果

化合物	劑量	最大眼壓差(mmHg)
AR-13324	0.02%	3.6±2.1
化合物 7	0.5%	6.7±1.6
	1%	11.8±0.8

【0356】 依據表12可知，於磁珠誘導高眼壓兔之模型（眼壓>30 mmHg的高眼壓模型）中，含0.5%化合物7之眼滴劑與含1%化合物7之眼滴劑的降眼壓功效也均優於含0.02% AR-13324之眼滴劑，其中含1%化合物7之眼滴劑的降眼壓功效甚至可為含0.02% AR-13324之眼滴劑的3倍以上。

【0357】 **實施例8**

【0358】 1. MYLK-4於細胞之表現

【0359】 (1) 方法

【0360】 人小梁網(Human Trabecular Meshwork, HTM)細胞(Cat.NO.6590)獲自ScienCell Research Laboratories。將HTM細胞維持於小梁網細胞培養基（Trabecular Meshwork Cell Medium, TMCM）（Cat.NO.6591）中。TMCM是由500 mL基礎培養基、10 mL FBS(Cat.NO.0010)、5 mL小梁網細胞生長補充劑（TMCGS，Cat.NO.6592）與5 mL青黴素/鏈黴素溶液(P/S，Cat.NO. 503)所調配而成。當細胞生長達到70-80%飽合後，以50 μg/mL地塞米松(dexamethasone)(Cat.NO.4902, Sigma)對HTM細胞進行隔夜處理。

【0361】 通過西方墨點法分析細胞裂解物中之MYLK4與GAPDH的表現。首先收集細胞，並以1x RIPA（50 mM Tris-HCl，pH 7.4、150 mM NaCl、0.25%脫氧膽酸、0.1%NP-40、1 mM EDTA，磷酸酶抑製劑和蛋白酶抑製劑混合物）沖洗。接著，以SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳)分離細胞裂解物，並轉移到PVDF membtane (iBlot™2 Transfer Stacks，聚偏二氟乙烯膜，Invitrogen)。將薄膜以一級抗體（小鼠抗MYLK4抗體(1:1,000，Cat.NO.SAB1412951)與小鼠抗GAPDH抗體(1:1,000，Cat.NO.G8795)）進行免疫墨漬。其中以GAPDH作為裝載對照組(loading control)。之後將薄膜以1X TBST清洗3次。

接著，將薄膜與二級抗體(Cat.NO.111-0350003, Cat.NO.111-035-164)在室溫下培養1小時。藉由增強的化學發光(WBKLS0500, Millipore)檢測系統(Fisher Scientific, US)使薄膜可視化。

【0362】 (2) 結果

【0363】 結果如第 9 圖所示。

【0364】 依據第 9 圖可知，經地塞米松處理之 HTM 細胞（疾病狀態細胞）之 MYLK-4 表現量較正常 HTM 細胞高。

【0365】 2. MYLK-4於磁珠誘導的疾病標的組織表現

【0366】 (1) 方法

【0367】 將50 μL磁珠溶液（50 mg/mL，磁珠粒徑10 μm）注入於麻醉狀況下的大白兔左右眼之眼前房內，以使兔眼成為高眼壓狀態。以未經磁珠溶液處理之大白兔作為對照組。之後將兔子犧牲，取出眼球，並進行組織病理分析。

【0368】 組織病理判讀方法：

【0369】 顯微鏡：MoticEasyScan

【0370】 顯微攝影系統：MoticEasyScan

【0371】 判讀方法：

【0372】 委託遠見生物科技股份有限公司進行兔眼球石蠟組織切片之免疫組織化學染色(immunohistochemical, IHC staining)，除針對眼球小梁網(trabecular meshwork)進行結果判讀外，並提供判讀結果評分表及各不同倍率的顯微攝影照片 。

【0373】 取下之眼球組織經福馬林固定後，脫水並進行石蠟包埋，再製成 3 μm 厚的石蠟組織切片。IHC 染色之生物標記為MYLK-4及MLC-2。

【0374】 根據檢體所製成之組織病理切片，分別在20倍、40倍、100倍、200倍及400倍顯微鏡下進行組織病灶觀察及記錄。根據病灶嚴重度、分佈範圍及所佔組織的百分比例，參照INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria)建議之5級分制評級法進行病灶評分：0級分代表無明顯病理變化、病灶佔總體組織1%以下；1級分代表病症極微 (minimal, 1-5%)；2級分代表病症輕微(mild, 6 -25%)；3級分代表病症中度(moderate, 26-50%)；4級分代表病症中高度(moderately severe, 51-75%)；5級分代表病症嚴重(severe/high, >76%)。

【0375】 (2) 結果

【0376】 免疫組織化學染色結果如第10圖所示，而評分結果如表14所示。

【0377】 表14、免疫組織化學染色之評分結果

組別	分數
對照組	0
高眼壓組	3.3±0.6

【0378】 依據圖 10 及表 14 可知，無論是疾病狀態細胞（經地塞米松處理之 HTM 細胞），或者是疾病動物標的組織（經磁珠誘導之兔眼），MYLK-4 的表現量均高於正常細胞與組織，因此推定具 MYLK-4 抑制功效之本揭露化合物除了經由 ROCK 抑制作用，還可藉由抑制 MYLK-4 而有效降低眼壓。

【0379】 整合前述實驗結果可知，相較於AR-13324僅以ROCK為標靶，本揭露之化合物20可同時以ROCK、MYLK-4與YSK-4為標靶。又，於高滲透壓食鹽水誘導高眼壓兔之模型（急性高眼壓模型）與磁珠誘導高眼壓兔之模型（眼壓> 30 mmHg的高眼壓模型）中，本揭露之化合物20的降眼壓功效皆優於AR-13324。此外，本揭露之化合物20在最大效應劑量下，相較於AR-13324具有較低之刺激性。

【0380】 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

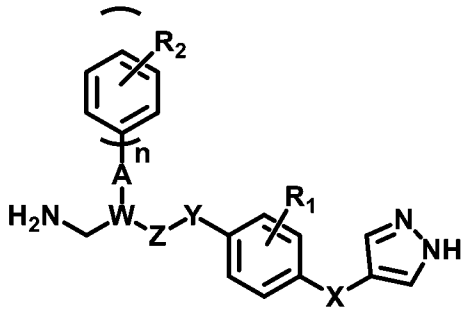
【符號說明】

【0381】 無

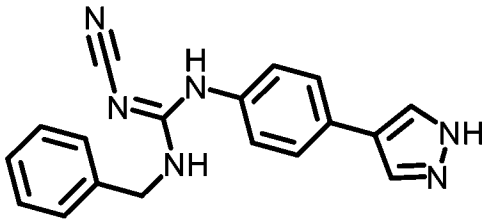
第 109143679 號　修正日期:111.6.17　修正本

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物：

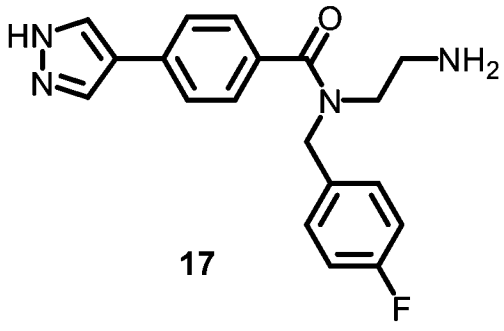


式(I)；



16

化合物16；



17

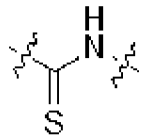
化合物17，

其中，該式(I)所示之化合物、化合物16與化合物17為β胺基酸衍生物，又

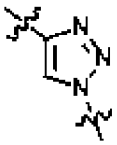
於該式(I)中：

X為單鍵或O；

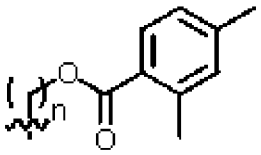
Y為NH；

Z為C=O、C=S或  ；

W為CH；

A為單鍵、O、OH、OCH_2、  或N_3；

R_1為H或F；

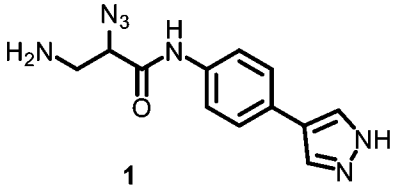
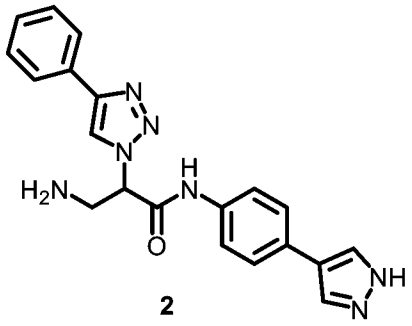


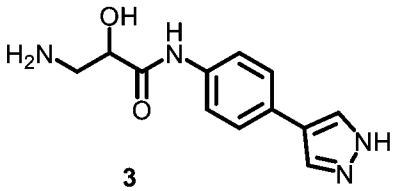
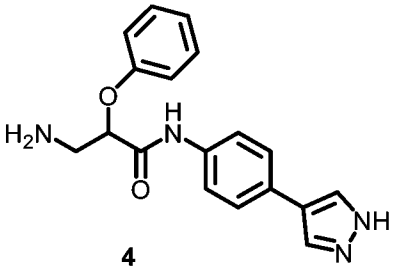
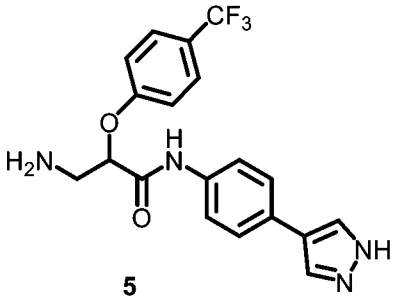
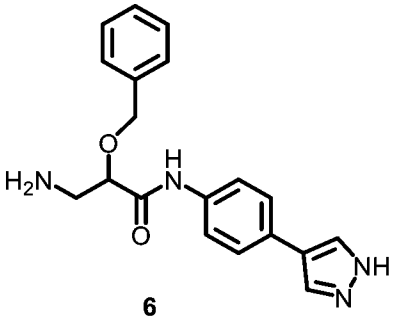
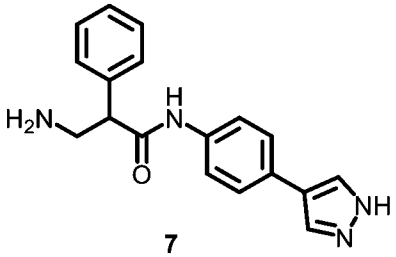
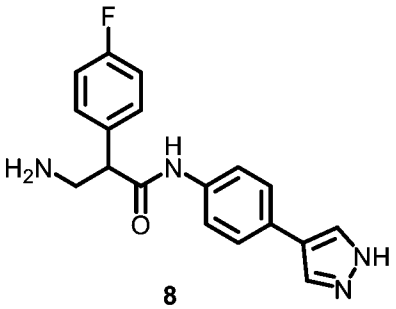
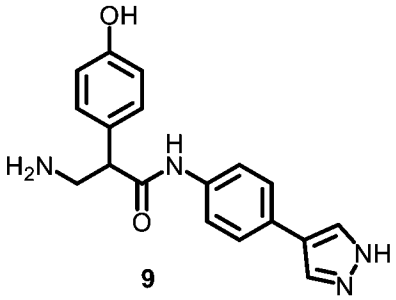
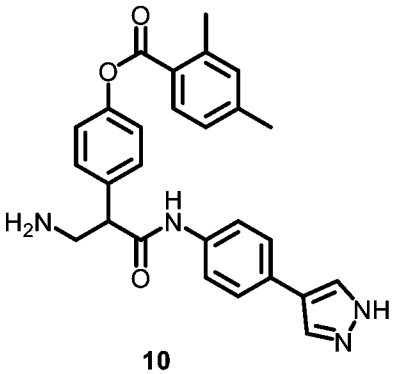
R_2為H、F、OH、CF_3、CH_2OH、CHO或 ；

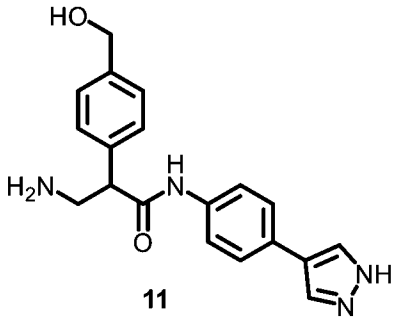
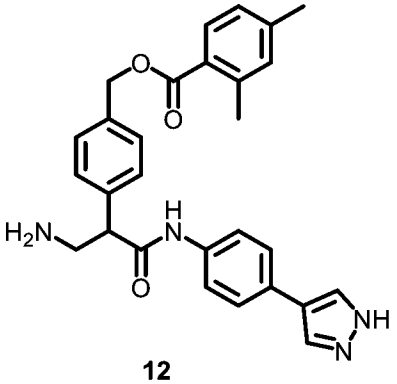
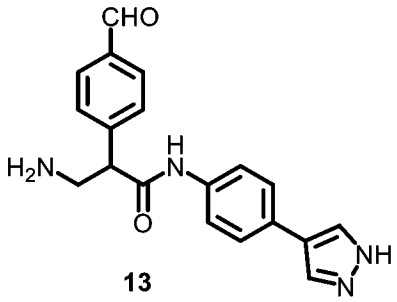
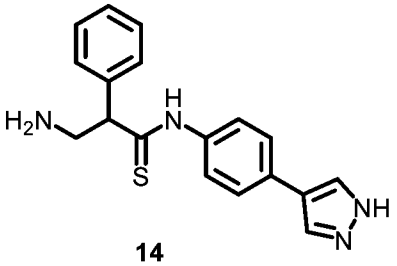
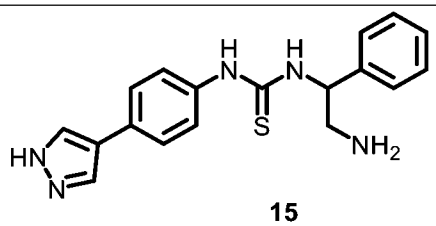
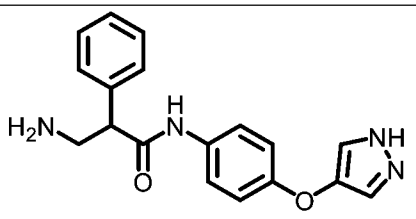
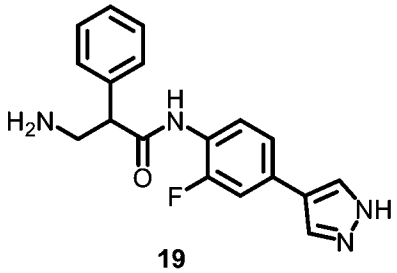
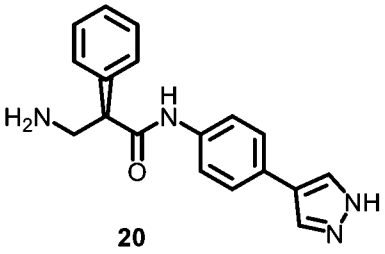
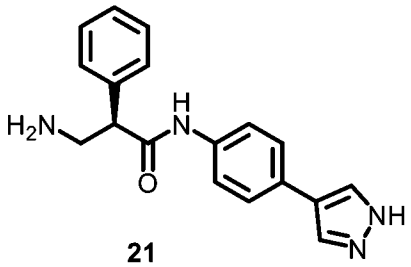
且

n為0或1。

【請求項2】 如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4

結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10
結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12

結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18
結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20
結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

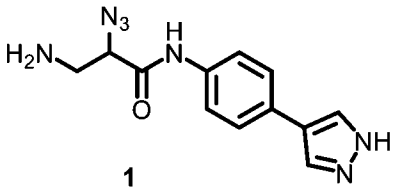
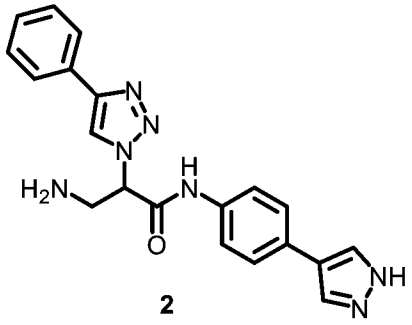
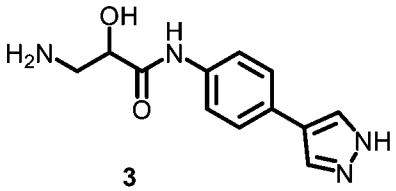
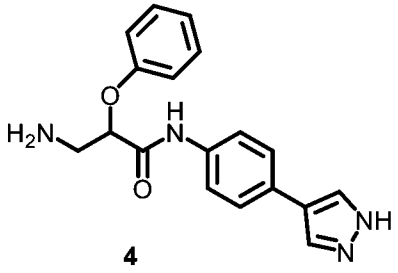
。

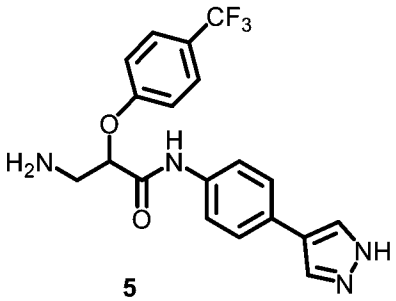
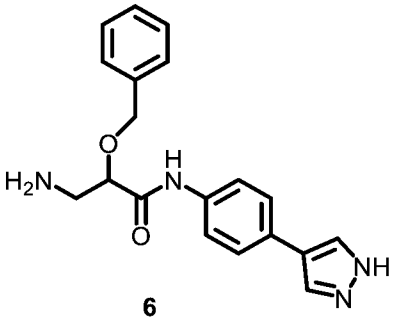
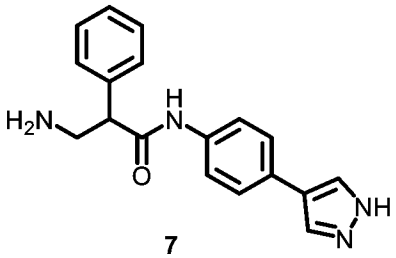
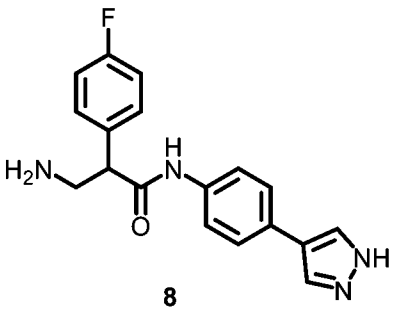
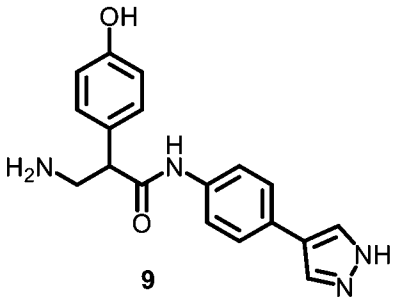
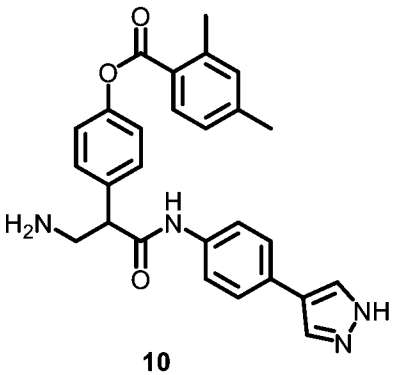
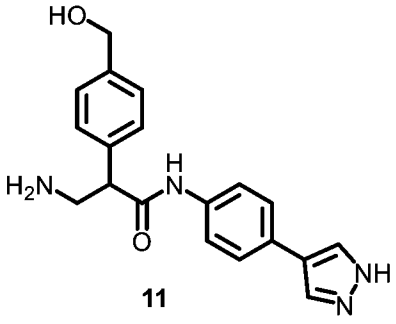
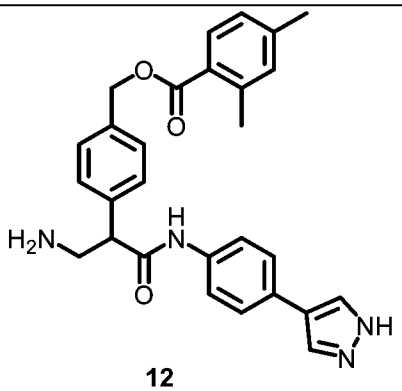
【請求項3】 如請求項2之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

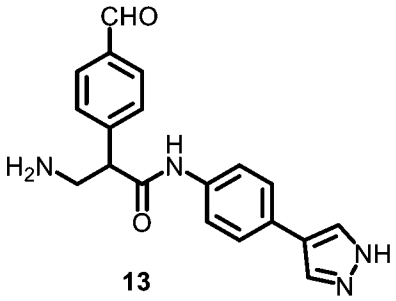
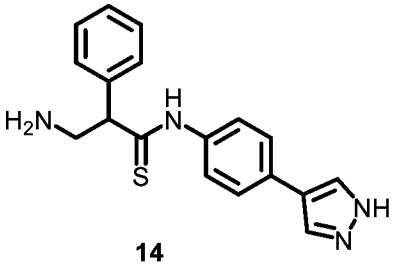
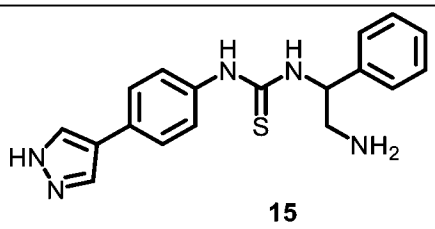
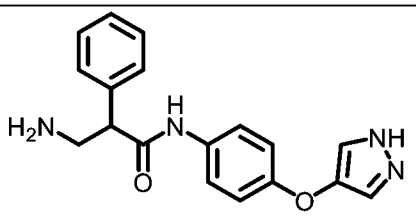
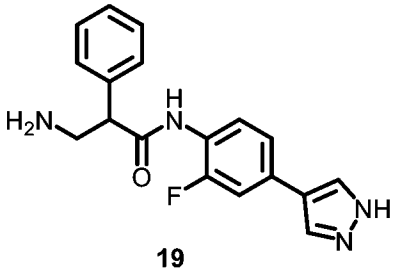
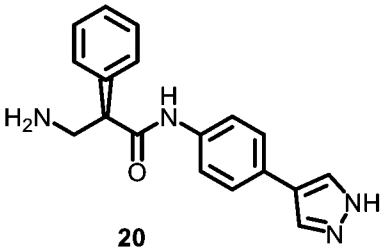
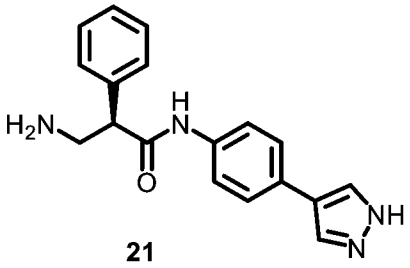
【請求項4】 一種激酶抑制劑，包括：

如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【請求項5】 如請求項4之激酶抑制劑，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4
結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6

結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10
結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12
結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14

結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18
結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20
結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

。

【請求項6】 如請求項5之激酶抑制劑，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

【請求項7】 如請求項4之激酶抑制劑，其中該式(I)所示之化合物具有抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4 (myosin light chain kinase 4, MYLK-4)及/或有絲分裂原活化蛋白激酶-19 (mitogen-activated

protein kinase 19, MAPK19, YSK-4)之能力。

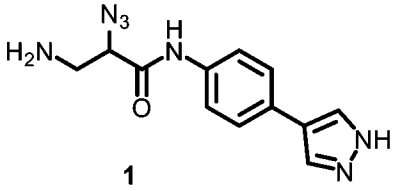
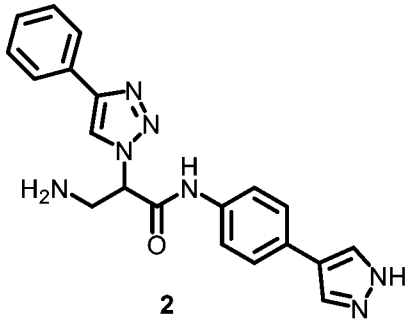
【請求項8】 如請求項7之激酶抑制劑，其中該式(I)所示之化合物更具有抑制一Rho相關的蛋白激酶(Rho-associated protein kinase, ROCK)之能力。

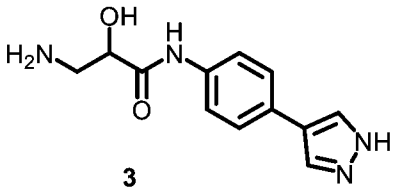
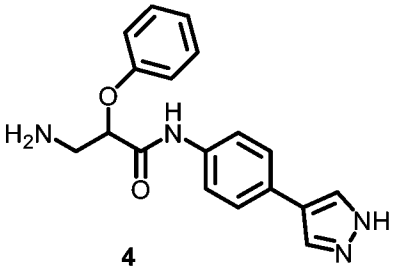
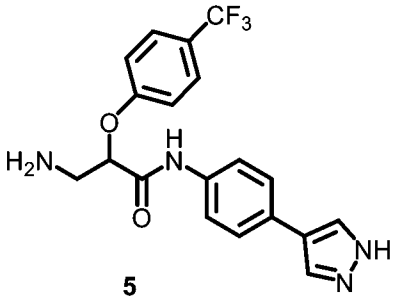
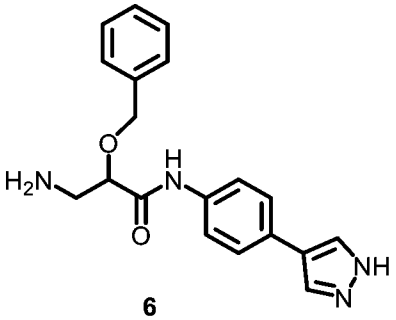
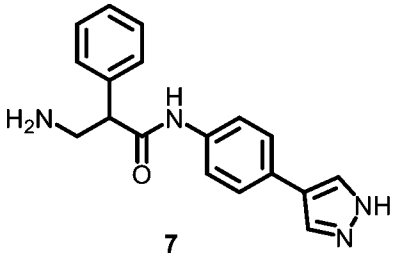
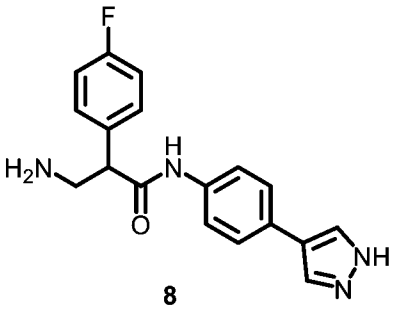
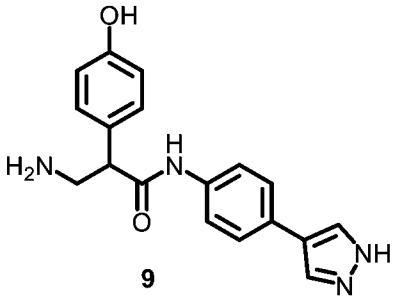
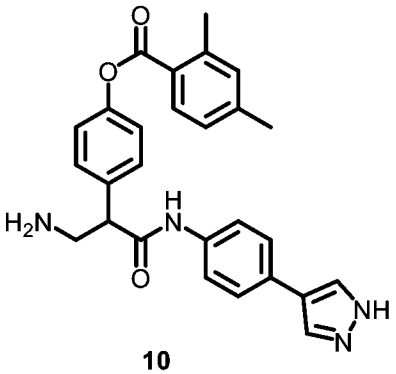
【請求項9】 如請求項8之激酶抑制劑，其中該Rho相關的蛋白激酶包括Rho相關的蛋白激酶-1(Rho-associated protein kinase-1, ROCK-1)。

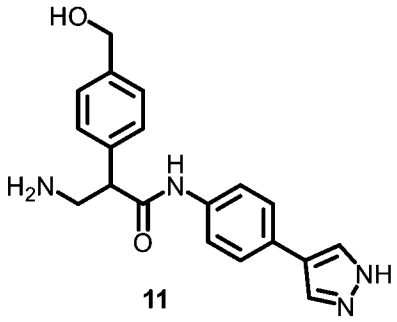
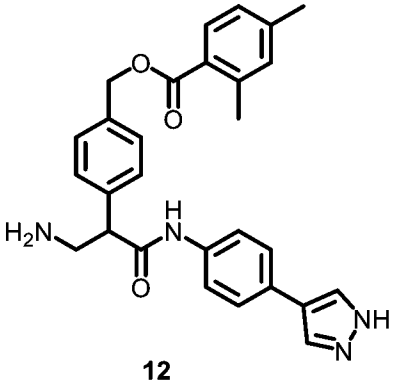
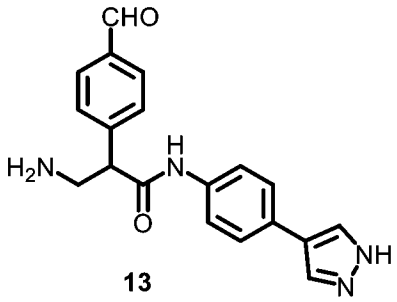
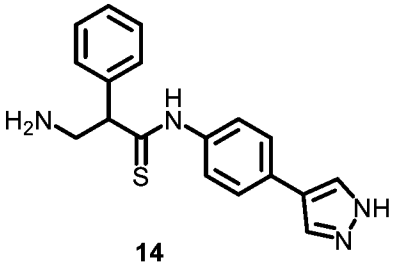
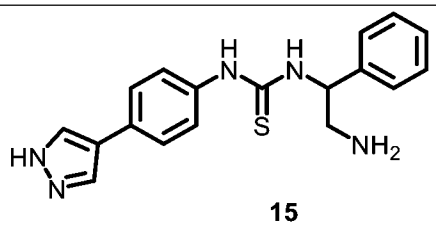
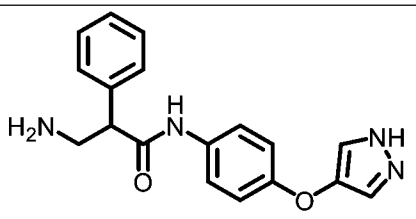
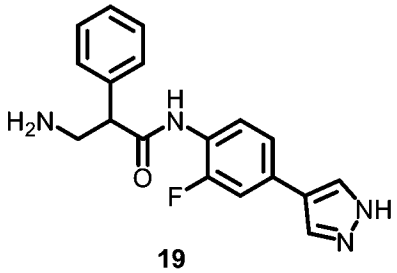
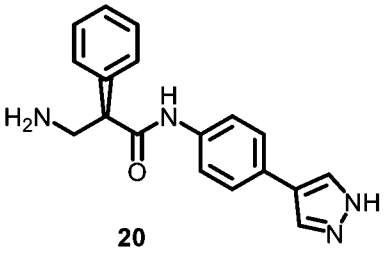
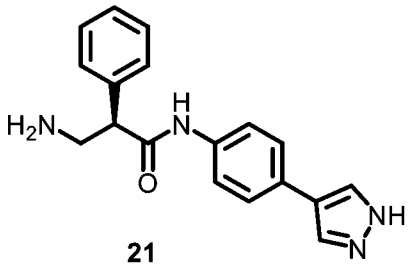
【請求項10】 一種醫藥組成物，包括；

一有效量之如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物。

【請求項11】 如請求項10之醫藥組成物，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4

結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10
結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12

結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18
結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20
結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

。

【請求項12】 如請求項11之醫藥組成物，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

【請求項13】 如請求項10之醫藥組成物，更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。

【請求項14】 如請求項10或11之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係用於受益於一激酶之抑制的一體內相關應用，且該激酶係則自由以下所組成之群組的至少一個：

肌凝蛋白輕鏈激酶-4；

有絲分裂原活化蛋白激酶-19；與

Rho相關的蛋白激酶。

【請求項15】 如請求項14之醫藥組成物，其中該體內相關應用包括一眼科相關應用或肺部相關應用。

【請求項16】 如請求項15之醫藥組成物，其中該眼科相關應用包括視神經的保護，及/或高眼壓、青光眼、眼中風、黃斑部病變、黃斑部水腫、糖尿病視網膜病變、角膜內皮細胞損傷及/或角膜纖維化的預防及/或治療。

【請求項17】 如請求項15之醫藥組成物，其中該肺部相關應用包括肺動脈高壓、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、病因不明性肺纖維化、肺氣腫及/或肺癌的預防及/或治療。

【請求項18】 如請求項10或11之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係用於降低眼壓。

【請求項19】 如請求項10或11之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係用於一高眼壓症(ocular hypertension)或一具有高眼壓症之疾病的治療及/或預防。

【請求項20】 如請求項19之醫藥組成物，其中該高眼壓症係為具有25 mmHg以上之眼壓的高眼壓症。

【請求項21】 如請求項10或11之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係用於青光眼(glaucoma)的治療及/或預防。

【請求項22】 如請求項21之醫藥組成物，其中該青光眼包括剝脫性青光眼(exfoliation glaucoma, XFG)。

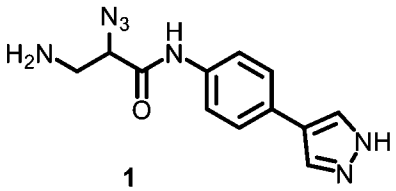
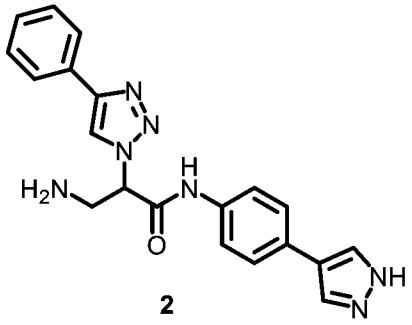
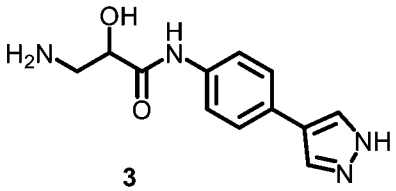
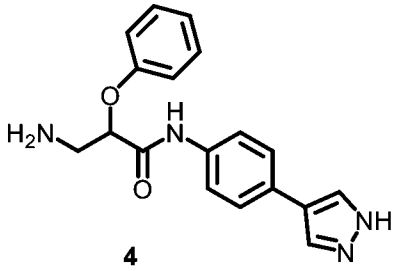
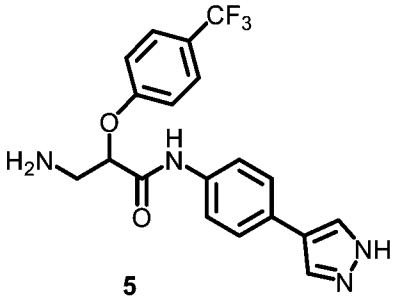
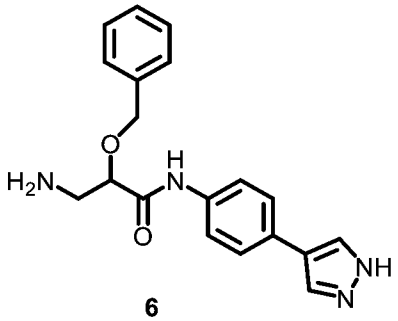
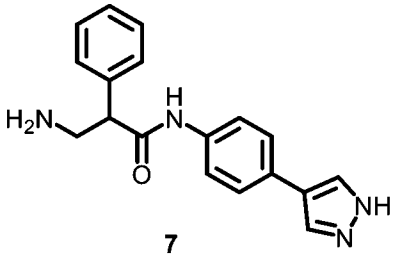
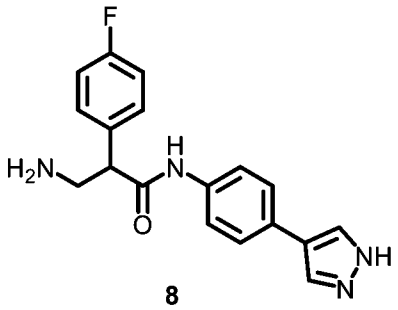
【請求項23】 如請求項10或11之醫藥組成物，其中該醫藥組成物係被調製成一眼用製劑。

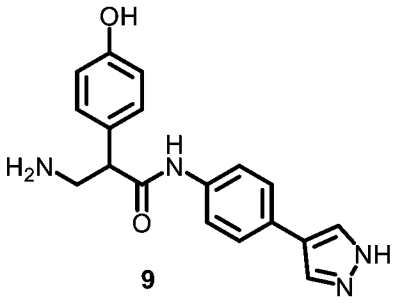
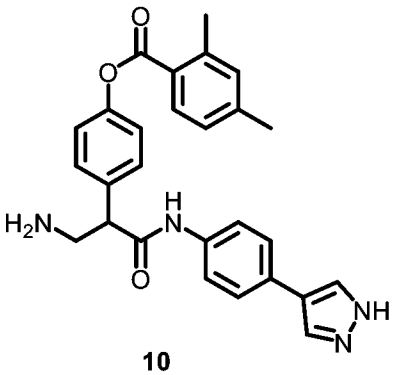
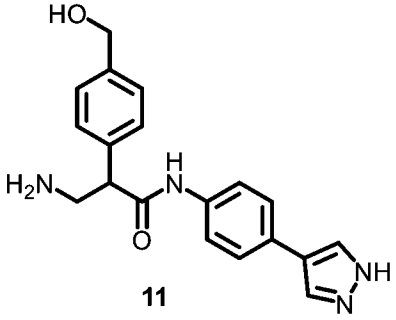
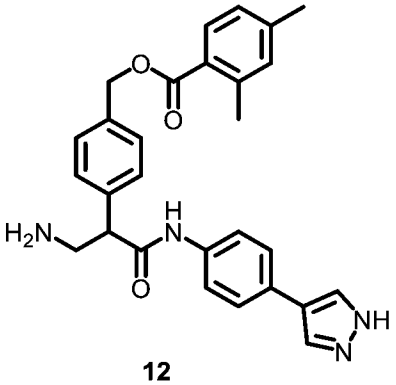
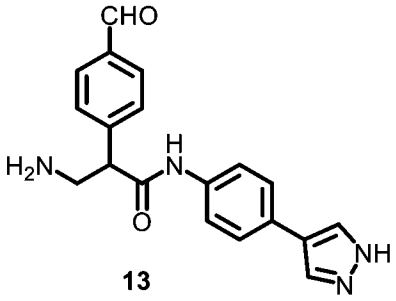
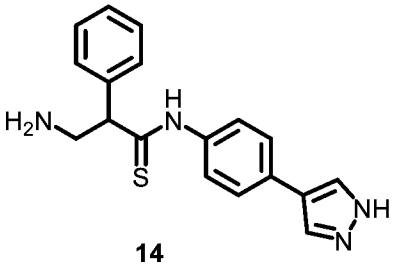
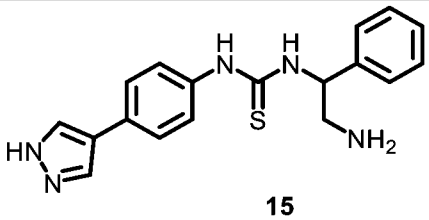
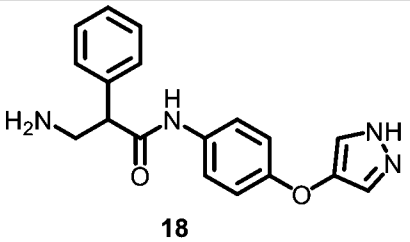
【請求項24】 如請求項23之醫藥組成物，其中該眼用製劑包括眼用滴劑、眼用軟膏、眼用凝膠或眼內注射劑。

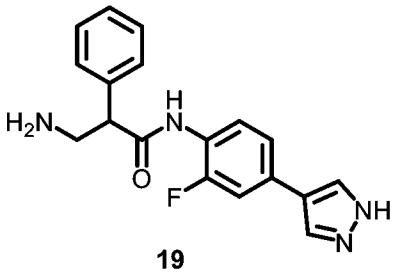
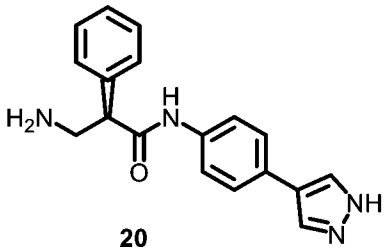
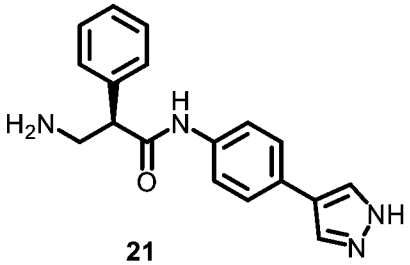
【請求項25】 一種如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備激酶抑制劑之用途。

【請求項26】 如請求項25之用途，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2

結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4
結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10

結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12
結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18
結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20

結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

。

【請求項27】 如請求項26之用途，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

【請求項28】 如請求項25或26之用途，其中該激酶抑制劑具有抑制肌凝蛋白輕鏈激酶-4及/或有絲分裂原活化蛋白激酶-19之能力。

【請求項29】 如請求項28之用途，其中該激酶抑制劑更具有抑制一Rho相關的蛋白激酶之能力。

【請求項30】 如請求項29之用途，其中該Rho相關的蛋白激酶包括Rho相關的蛋白激酶-1。

【請求項31】 一種如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物用於製備一藥物之用途，其中該藥物係用於受益於一激酶之抑制的一體內相關應用，且

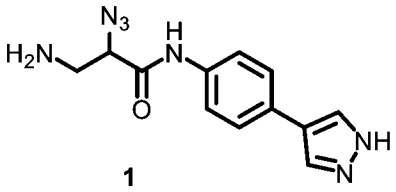
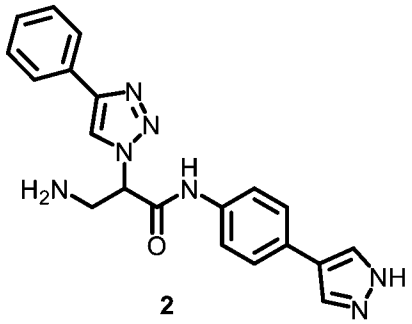
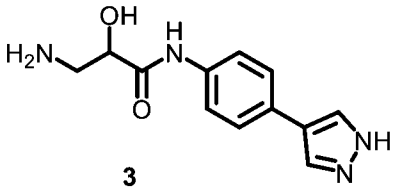
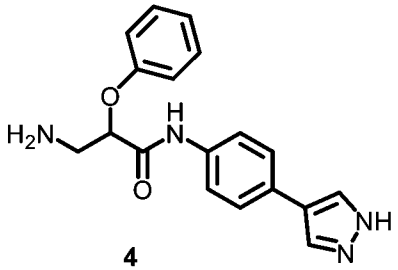
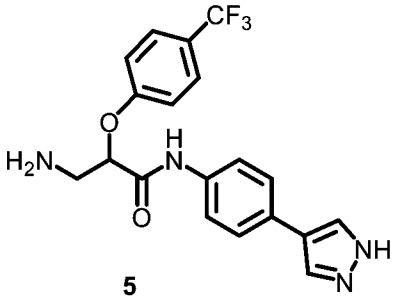
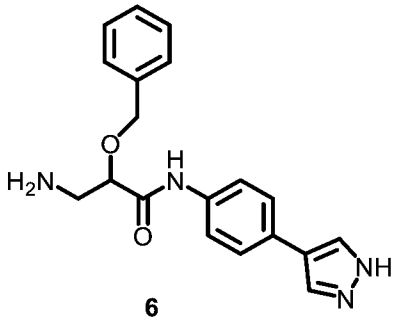
該激酶係擇自由以下所組成之群組的至少一個：

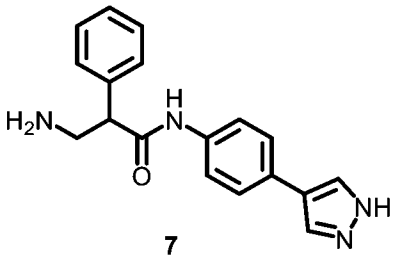
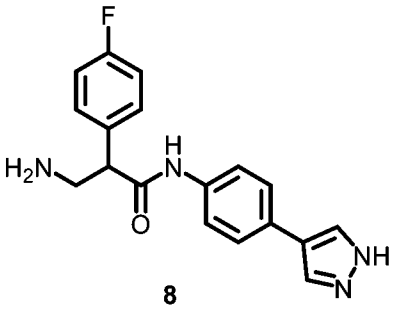
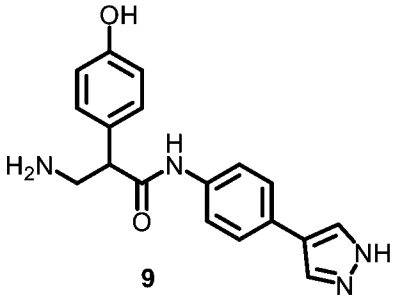
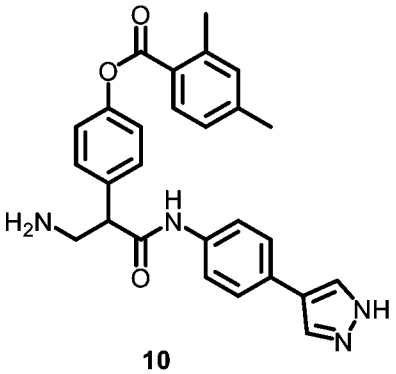
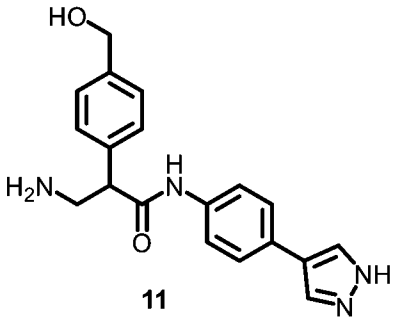
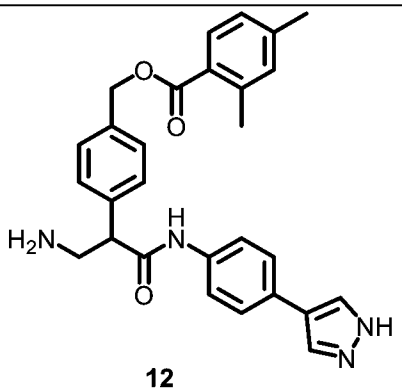
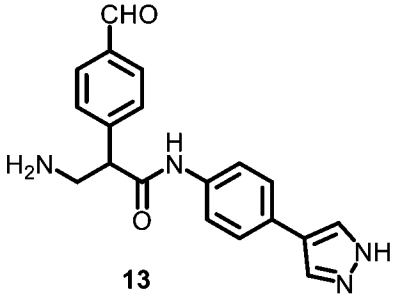
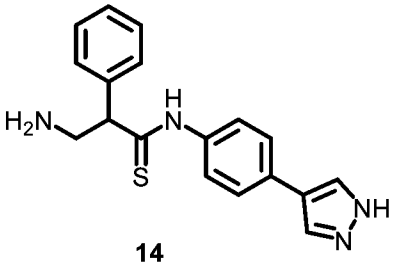
肌凝蛋白輕鏈激酶-4；

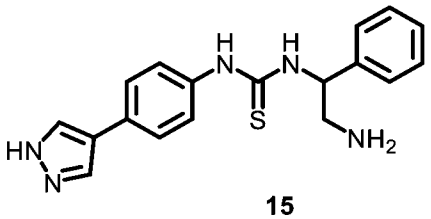
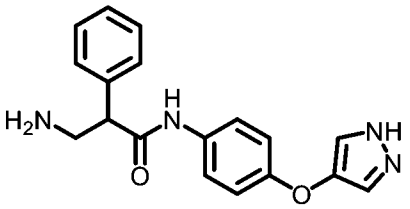
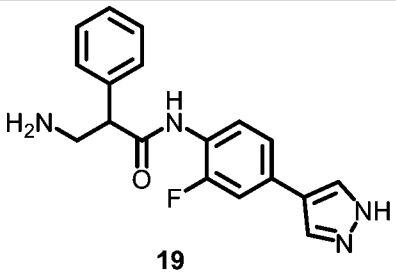
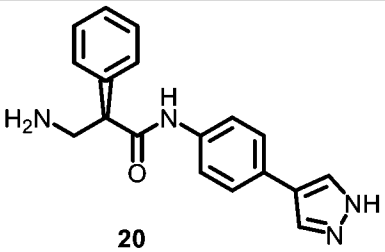
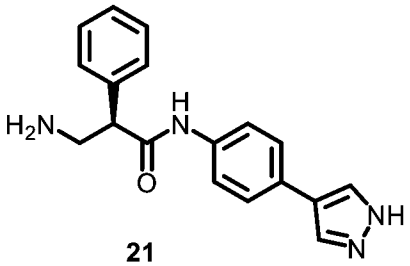
有絲分裂原活化蛋白激酶-19；與

Rho相關的蛋白激酶。

【請求項32】 如請求項31之用途，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4
結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6
化合物編號	化合物7	化合物8

結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10
結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12
結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18

結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20
結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

。

【請求項33】 如請求項32之用途，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

【請求項34】 如請求項31或32之用途，其中該體內相關應用包括一眼科相關應用或肺部相關應用。

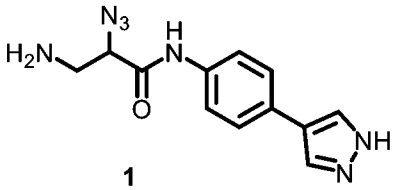
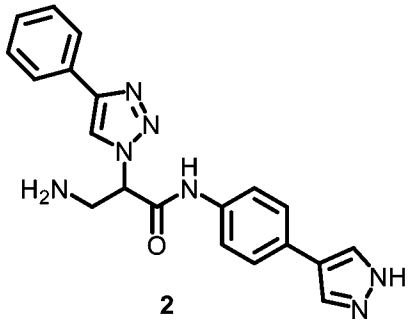
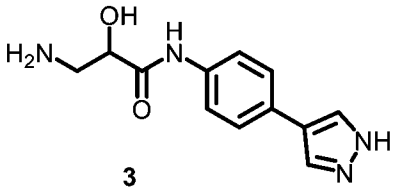
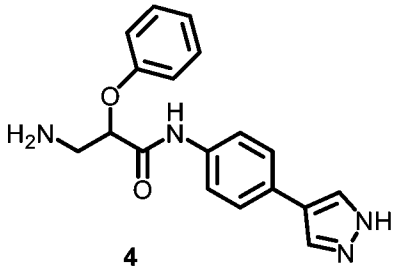
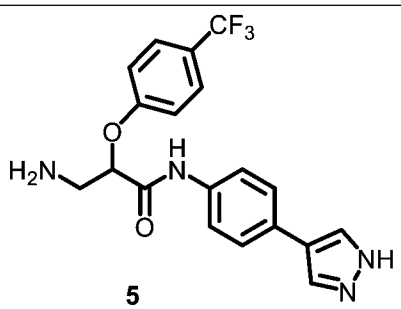
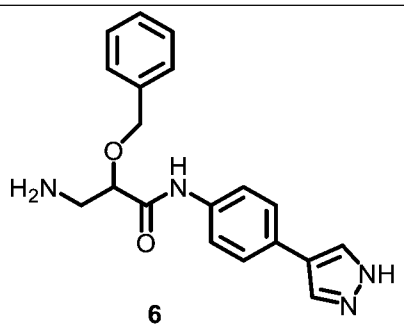
【請求項35】 如請求項34之用途，其中該眼科應用包括視神經的保護，及/或高眼壓、青光眼、眼中風、黃斑部病變、黃斑部水腫、糖尿病視網膜病變、角膜內皮細胞損傷及/或角膜纖維化的預防及/或治療。

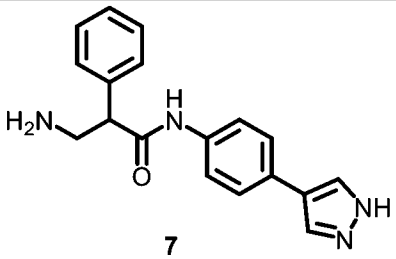
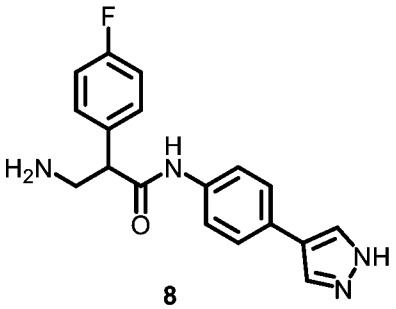
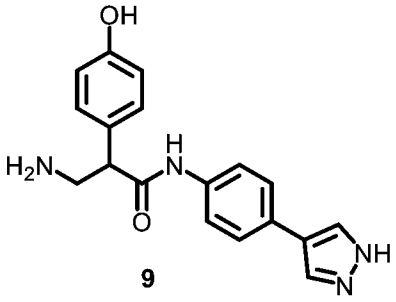
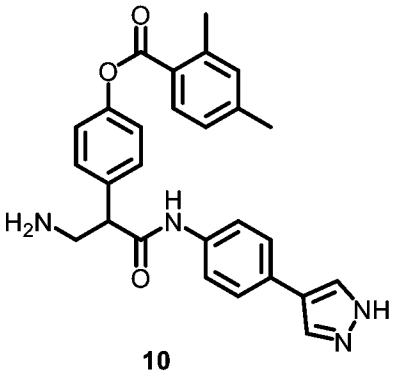
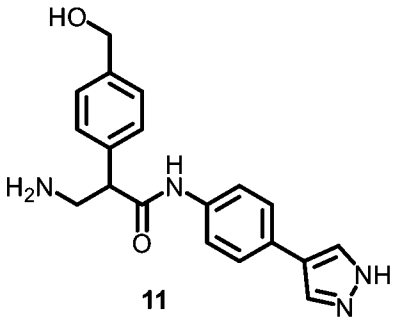
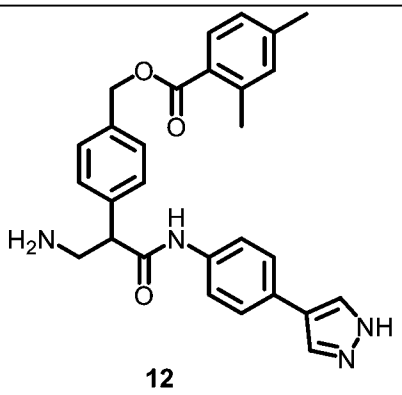
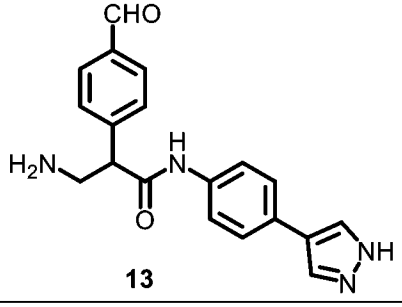
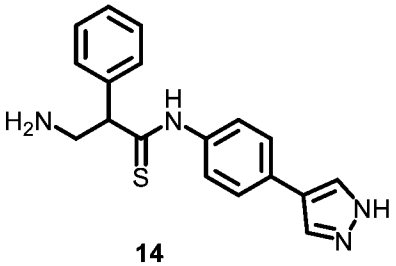
【請求項36】 如請求項34之用途，其中該肺部相關應用包括肺動脈高壓、慢性阻塞性肺病、病因不明性肺纖維化、肺氣腫及/或肺

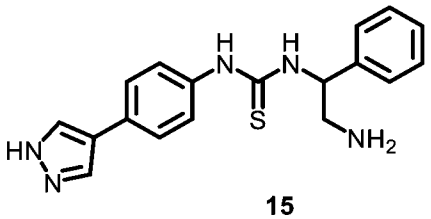
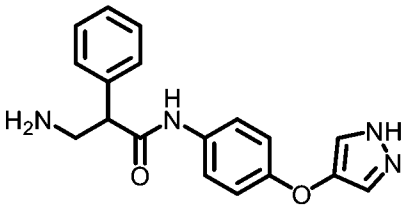
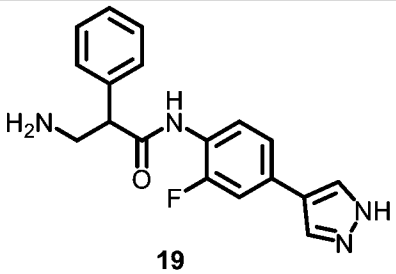
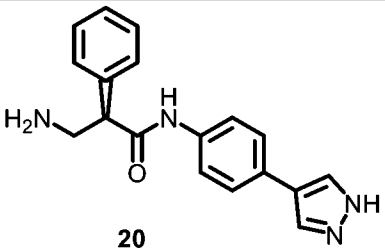
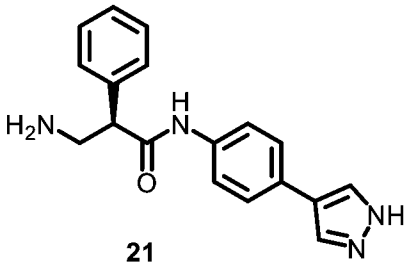
癌的預防及/或治療。

【請求項37】 一種如請求項1之式(I)所示之化合物、化合物16或化合物17，或其藥學上可接受之鹽、水合物，或其個別光學異構物、個別對掌異構物之混合物或消旋化合物之用途，其係用於製備降低眼壓之藥物。

【請求項38】 如請求項37之用途，其中該式(I)所示之化合物擇自由以下所示之化合物1至化合物15與化合物18至化合物21所組成的群組：

化合物編號	化合物1	化合物2
結構式	 1	 2
化合物編號	化合物3	化合物4
結構式	 3	 4
化合物編號	化合物5	化合物6
結構式	 5	 6

化合物編號	化合物7	化合物8
結構式	 7	 8
化合物編號	化合物9	化合物10
結構式	 9	 10
化合物編號	化合物11	化合物12
結構式	 11	 12
化合物編號	化合物13	化合物14
結構式	 13	 14
化合物編號	化合物15	化合物18

結構式	 15	 18
化合物編號	化合物19	化合物20
結構式	 19	 20
化合物編號	化合物21	
結構式	 21	

。

【請求項39】 如請求項38之用途，其中該式(I)所示之化合物為該化合物7或該化合物20。

【請求項40】 如請求項37或38之用途，其中該降低眼壓之藥物係用於一高眼壓症或一具有高眼壓症之疾病的治療及/或預防。

【請求項41】 如請求項40之用途，其中該高眼壓症係為具有約21 mmHg以上之眼壓的高眼壓症。

【請求項42】 如請求項40之用途，其中該高眼壓症係為具有25 mmHg以上之眼壓的高眼壓症。

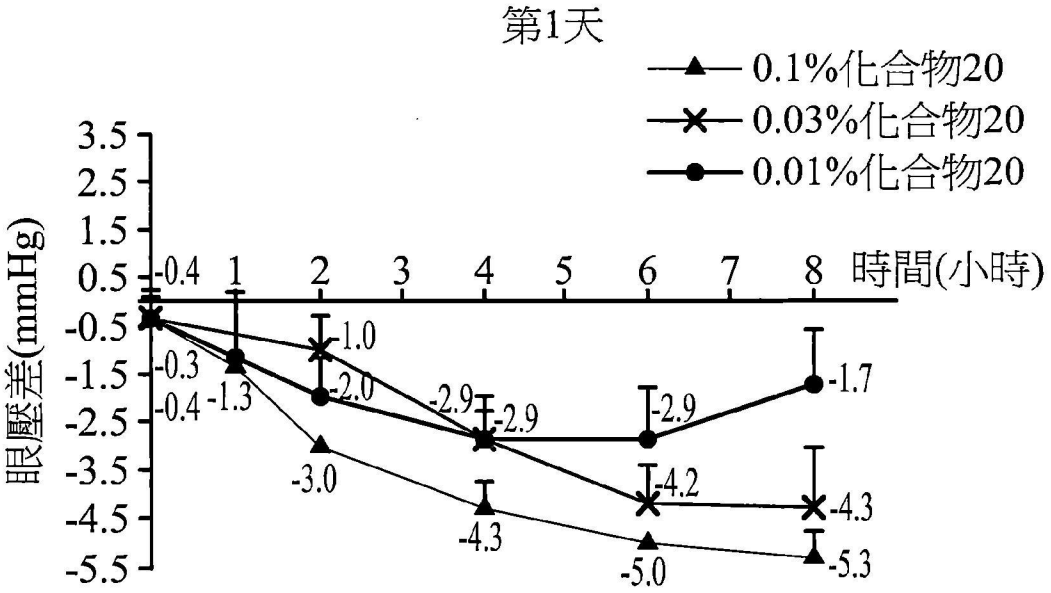
【請求項43】 如請求項37或38之用途，其中該降低眼壓之藥物為一青光眼之治療藥物。

【請求項44】 如請求項43之用途，其中該青光眼包括剝脫性青光眼。

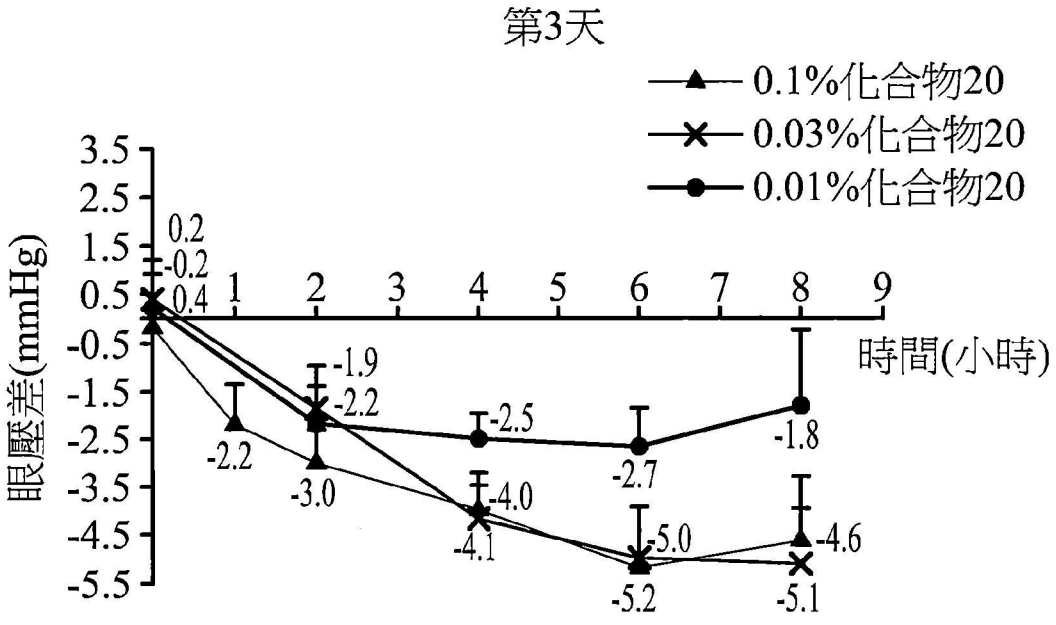
【請求項45】 如請求項37或38之用途，其中該藥物為一眼用製劑。

【請求項46】 如請求項45之用途，其中該眼用製劑包括眼用滴劑、眼用軟膏、眼用凝膠或眼內注射劑。

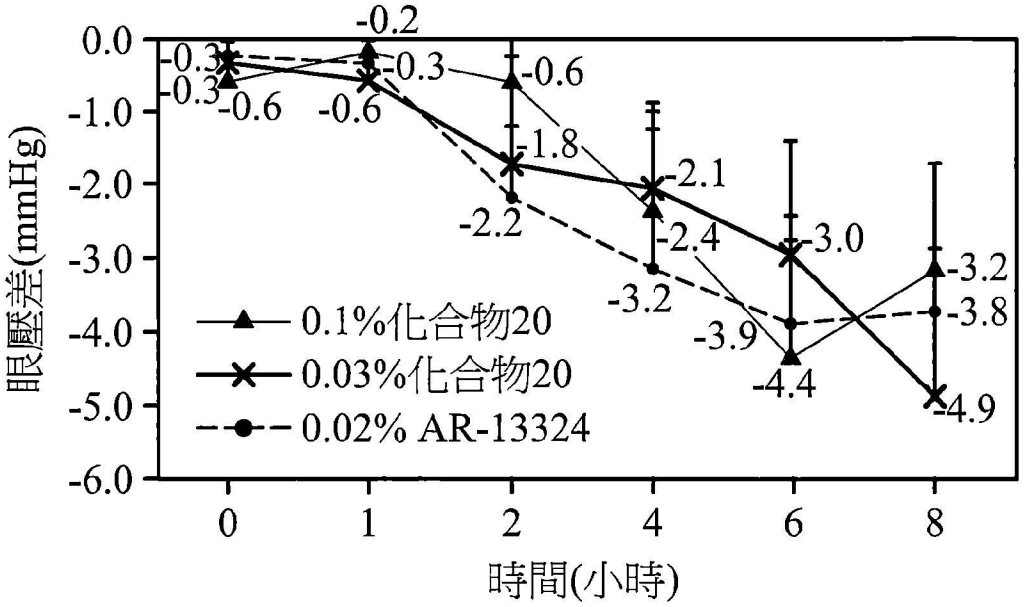
【發明圖式】



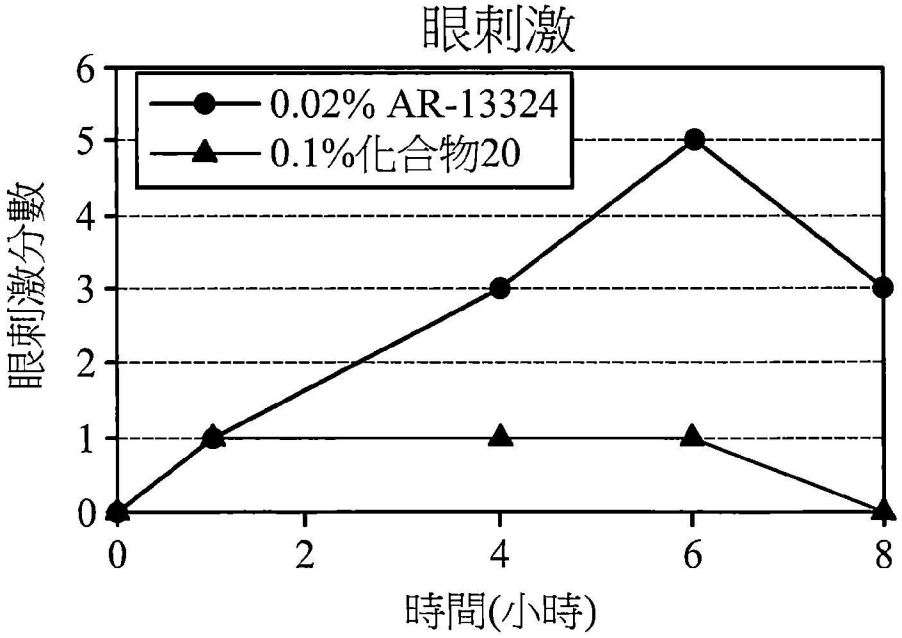
第 1A 圖



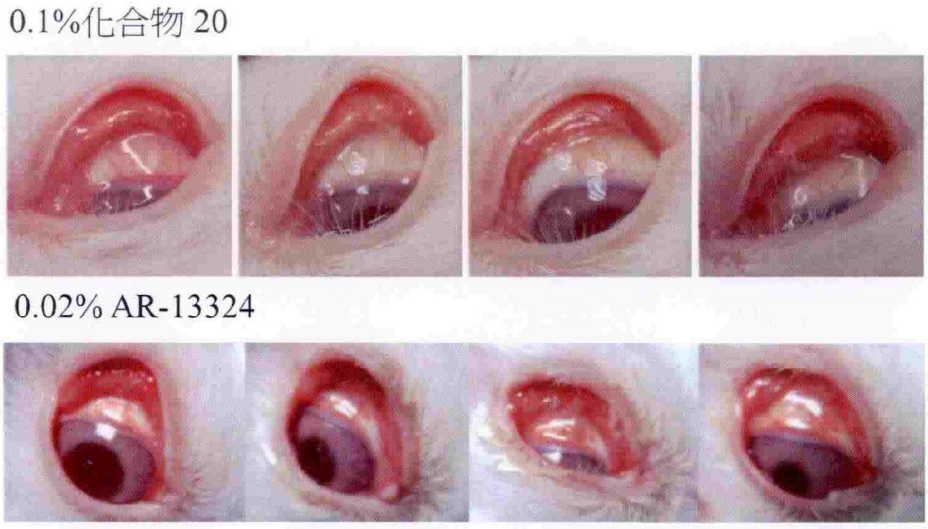
第 1B 圖


眼壓差(mmHg)
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
-4.0
-5.0
-6.0
0
1
2
4
6
8
時間(小時)
0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.02% AR-13324
-0.2
-0.3
-0.3
-0.3
-0.6
-0.6
-0.6
-1.8
-2.2
-2.1
-2.4
-3.2
-3.9
-3.0
-4.4
-3.2
-3.8
-4.9

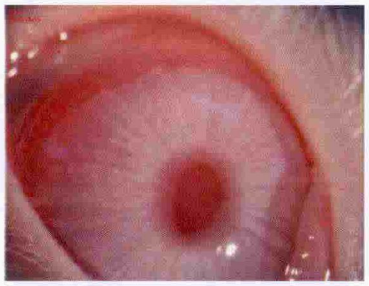
第 2 圖


眼刺激
眼刺激分數
6
5
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
時間(小時)
0.02% AR-13324
0.1%化合物20

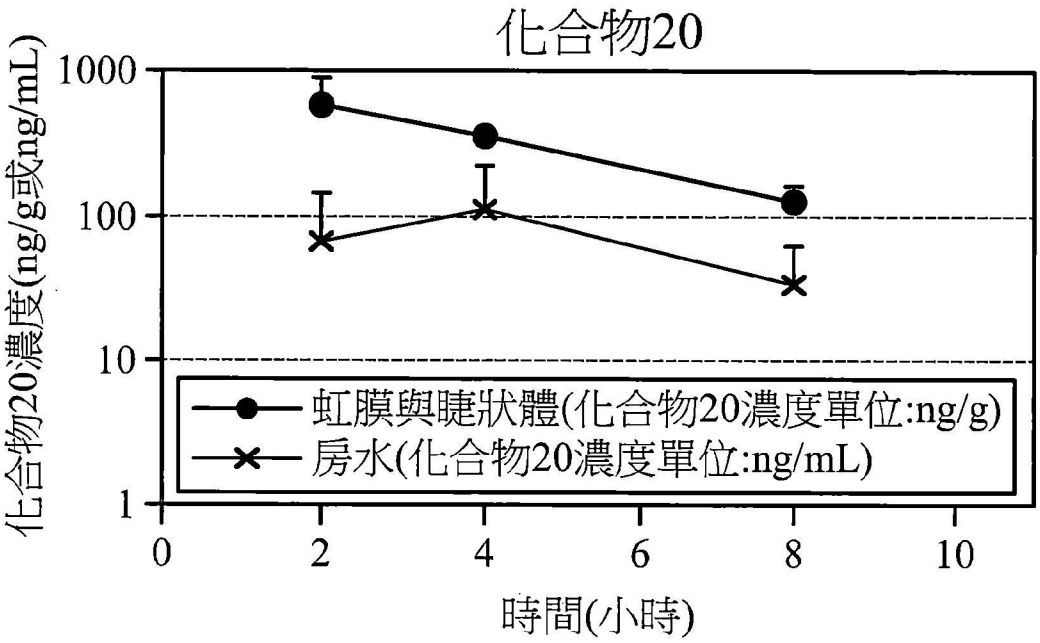
第 3A 圖



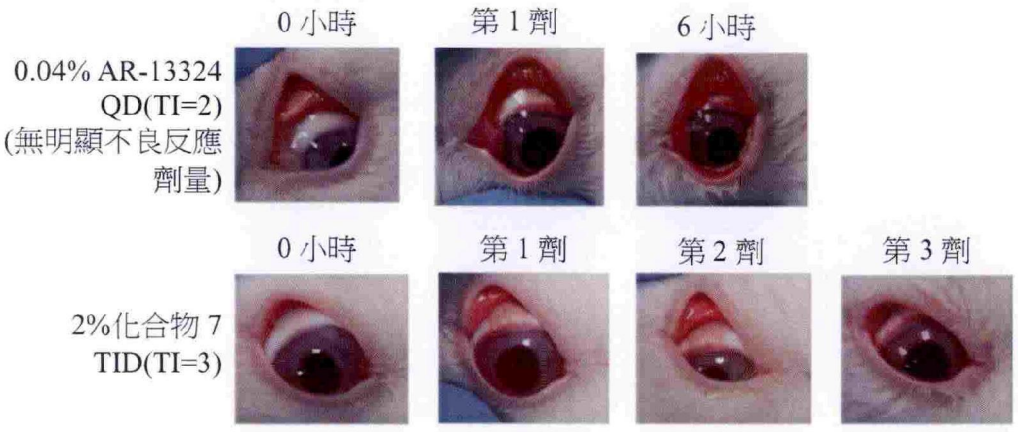
第 3B 圖



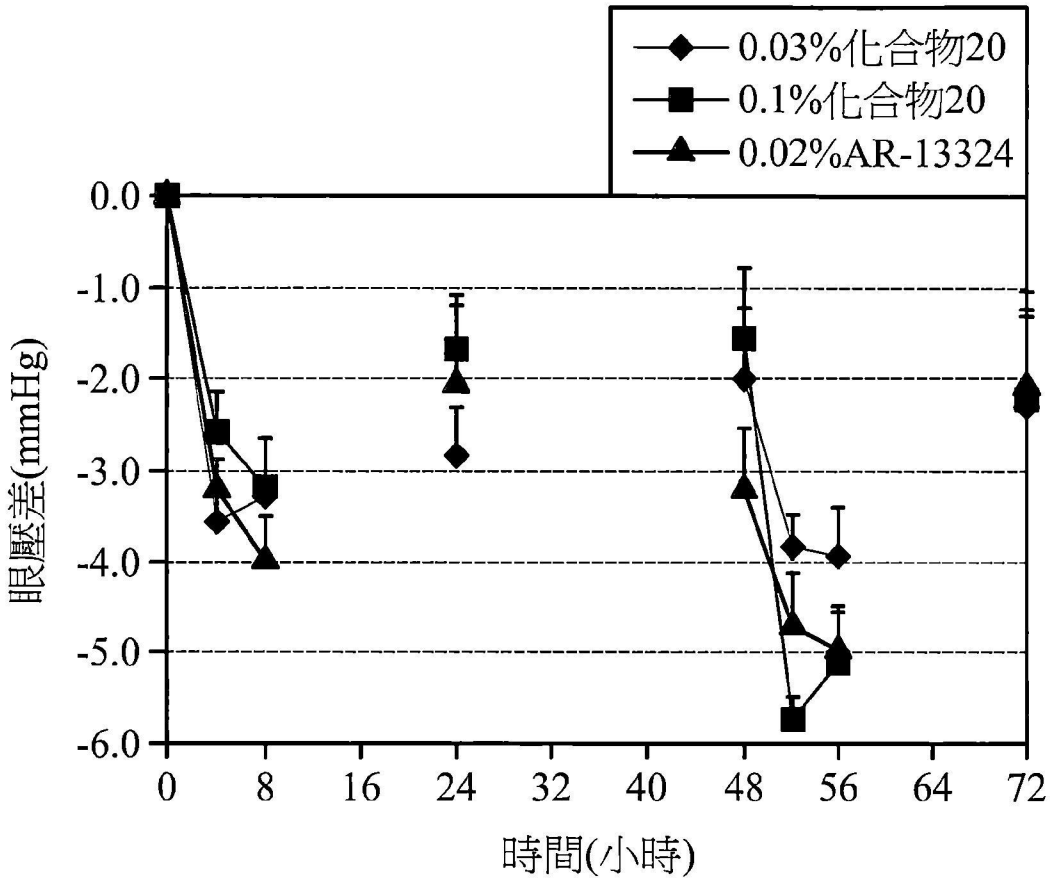
第 3C 圖


化合物20
化合物20濃度(ng/g或ng/mL)
1000
100
10
1
0
2
4
6
8
10
時間(小時)
虹膜與睫狀體(化合物20濃度單位:ng/g)
房水(化合物20濃度單位:ng/mL)

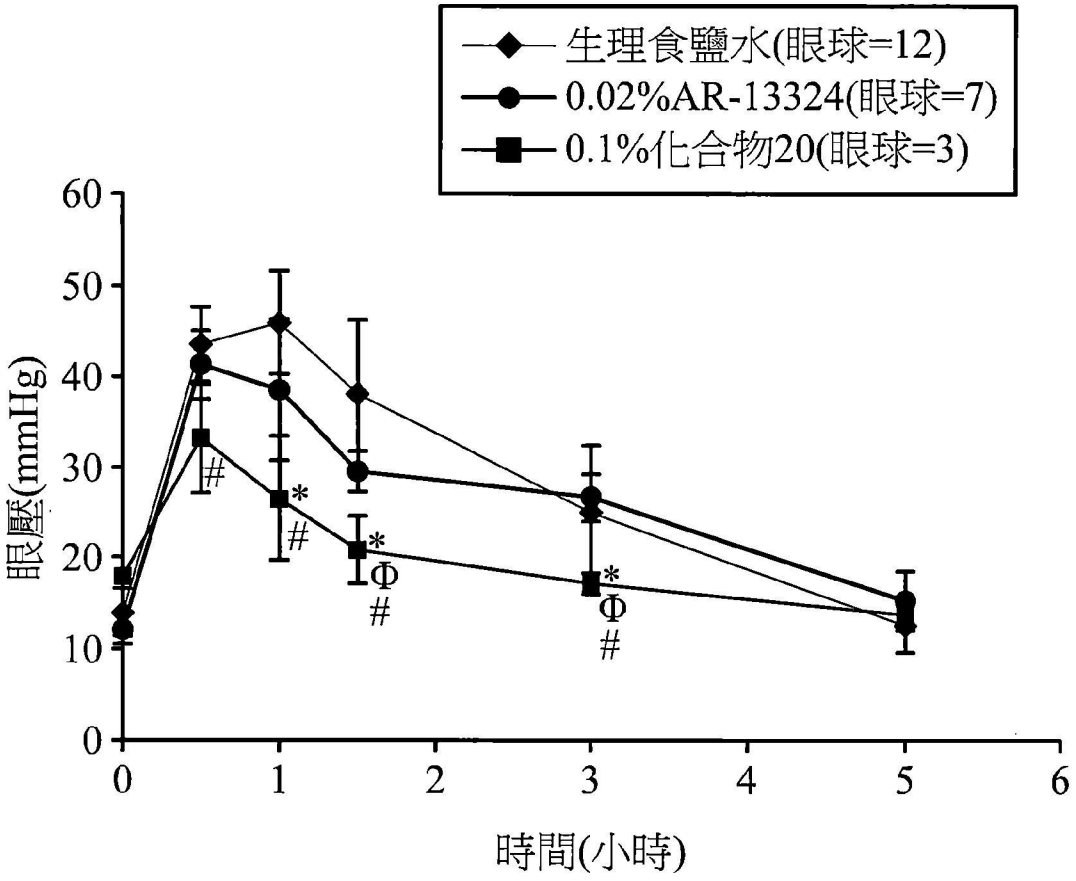
第 4 圖


0 小時
第 1 劑
6 小時
0.04% AR-13324
QD(TI=2)
(無明顯不良反應
劑量)
0 小時
第 1 劑
第 2 劑
第 3 劑
2%化合物 7
TID(TI=3)

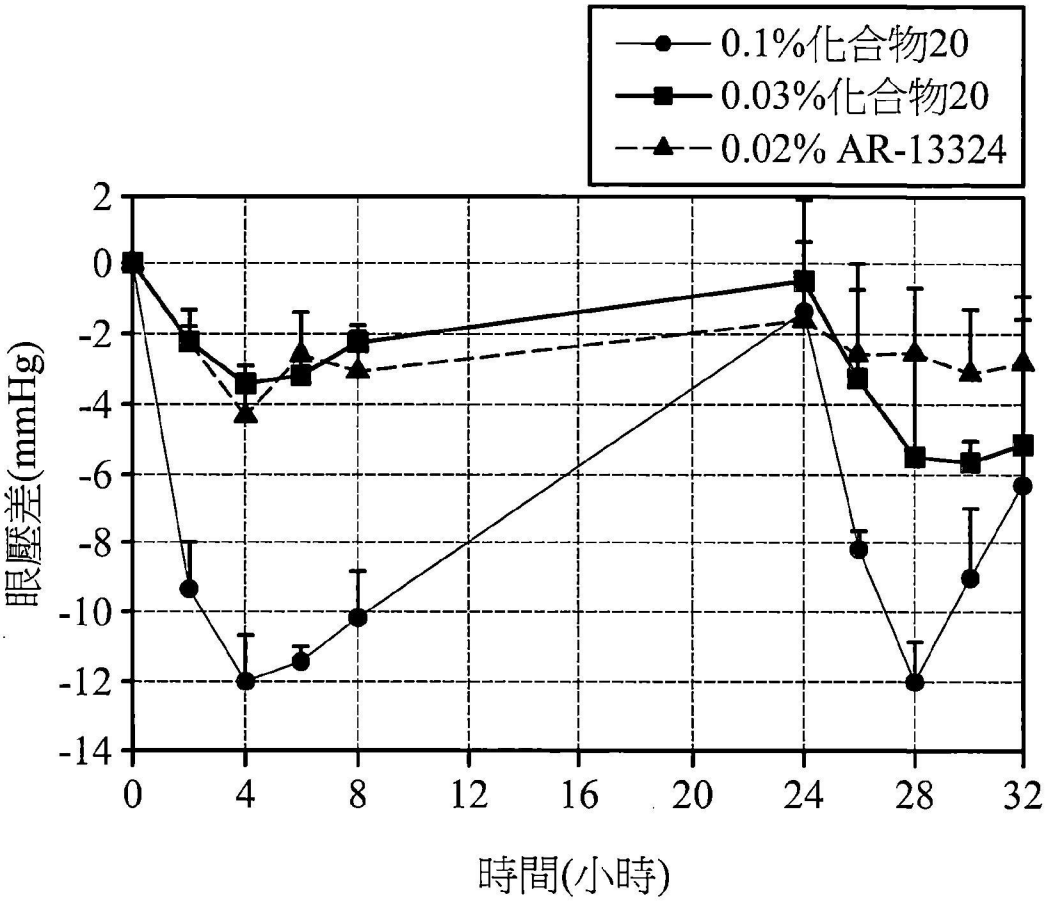
第 5 圖


0.03%化合物20
0.1%化合物20
0.02%AR-13324
0.0
-1.0
-2.0
-3.0
-4.0
-5.0
-6.0
眼壓差(mmHg)
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72
時間(小時)

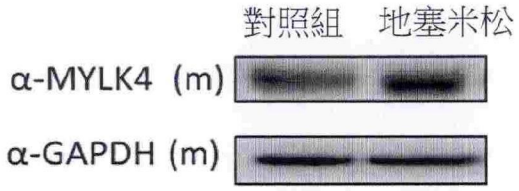
第 6 圖


生理食鹽水(眼球=12)
0.02%AR-13324(眼球=7)
0.1%化合物20(眼球=3)
眼壓(mmHg)
時間(小時)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
#
*
#
*
Φ
#
*
Φ
#

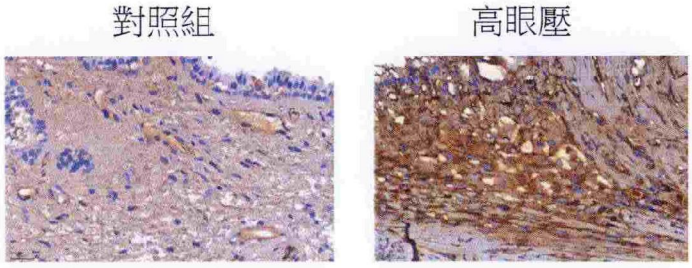
第 7 圖


0.1%化合物20
0.03%化合物20
0.02% AR-13324
眼壓差(mmHg)
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
0
4
8
12
16
20
24
28
32
時間(小時)

第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖