



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201336496 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：102103329

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K31/422 (2006.01)

C07D413/14 (2006.01)

A61P9/12 (2006.01)

(30)優先權：2012/01/31 美國

61/592,923

(71)申請人：衛材 R & D 企管股份有限公司 (日本) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)  
日本

(72)發明人：田中圭悟 TANAKA, KEIGO (JP)；西岡大貴 NISHIOKA, TOMOKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：3 共 38 頁

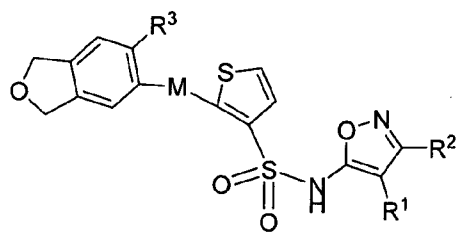
(54)名稱

西他生坦 (Sitaxentan) 衍生物

SITAXENTAN DERIVATIVE

(57)摘要

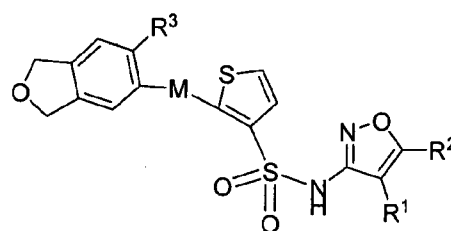
本發明目的係為了提供一種保留了西他生坦之主要治療作用並且具有改善的 CYP 抑制作用之化合物。本發明提供一種由化學式(1-1)或化學式(1-2)代表之化合物，或其藥理學上可接受的鹽：



(1-1)

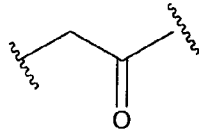
或

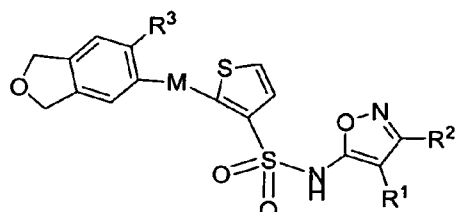
or



(1-2)

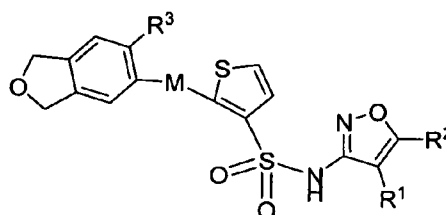
其中 R<sup>1</sup> 係一鹵素原子等等，R<sup>2</sup> 係一個甲基等等，R<sup>3</sup> 係一個 C<sub>1-6</sub> 烷基等等，並且 M 係一由以

下代表之基團： 等等。



(1-1)

or



(1-2)

(21)申請案號：102103329

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 29 日

(51)Int. Cl. : **A61K31/422 (2006.01)**

**C07D413/14 (2006.01)**

*A61P9/12 (2006.01)*

(30)優先權：2012/01/31 美國

61/592.923

(71)申請人：衛材R & D企管股份有限公司(日本)EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)  
日本

(72)發明人：田中圭悟 TANAKA, KEIGO (JP) ；西岡大貴 NISHIOKA, TOMOKI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：3 共 38 頁

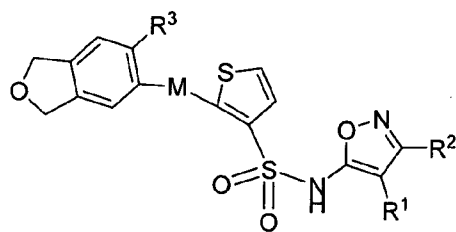
(54)名稱

西他生坦 (S i t a x e n t a n) 衍生物

SITAXENTAN DERIVATIVE

(57)摘要

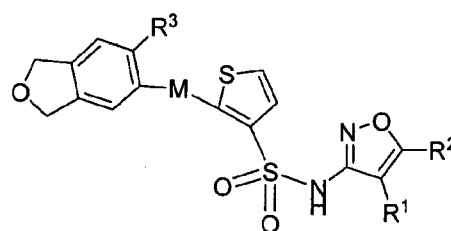
本發明目的係為了提供一種保留了西他生坦之主要治療作用並且具有改善的 CYP 抑制作用之化合物。本發明提供一種由化學式(1-1)或化學式(1-2)代表之化合物，或其藥理學上可接受的鹽：



或

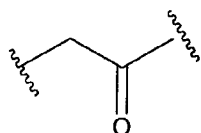
or

(1-1)



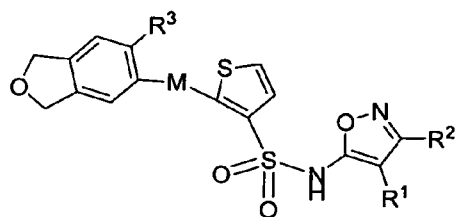
(1-2)

其中 R<sup>1</sup> 係一鹵素原子等等，R<sup>2</sup> 係一個甲基等等，R<sup>3</sup> 係一個 C<sub>1-6</sub> 烷基等等，並且 M 係一由以



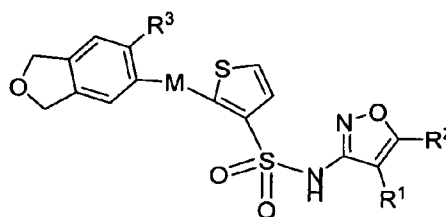
下代表之基團：

等等。



or

(1-1)



(1-2)

## 發明摘要

※ 申請案號：102103329

※ 申請日：102.1.29

A61K 31/422 (2006.01)

※IPC 分類：C07D 413/14 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

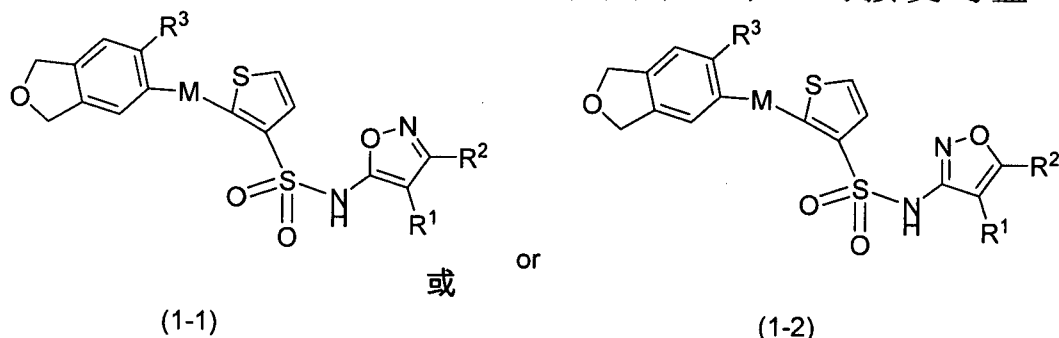
## 【發明名稱】

西他生坦(Sitaxentan)衍生物

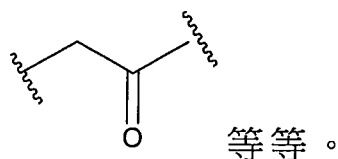
SITAXENTAN DERIVATIVE

## 【中文】

本發明目的係爲了提供一種保留了西他生坦之主要治療作用並且具有改善的CYP抑制作用之化合物。本發明提供一種由化學式 (1-1) 或化學式 (1-2)代表之化合物，或其藥理學上可接受的鹽：



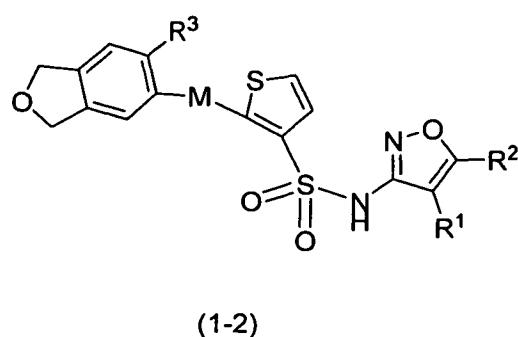
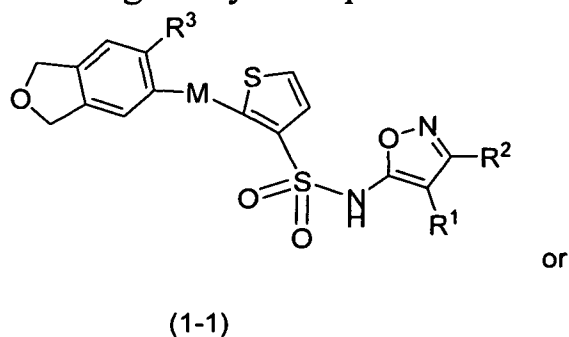
其中 $R^1$ 係一鹵素原子等等， $R^2$ 係一個甲基等等， $R^3$ 係一個 $C_{1-6}$ 烷基等等，並且M係一由以下代表之基團：



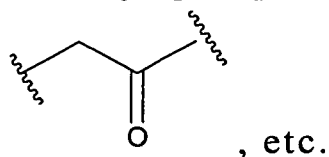
## 【英文】

To provide a compound retaining the principal therapeutic effect of sitaxentan and having an improved CYP inhibitory effect.

A compound represented by formula (1-1) or (1-2), or a pharmacologically acceptable salt thereof:



wherein R<sup>1</sup> is a halogen atom, etc., R<sup>2</sup> is a methyl group, etc., R<sup>3</sup> is a C<sub>1-6</sub> alkyl group, etc., and M is a group represented by:

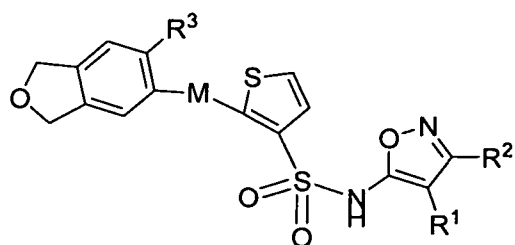


## 【代表圖】

【本案指定代表圖】：（無）

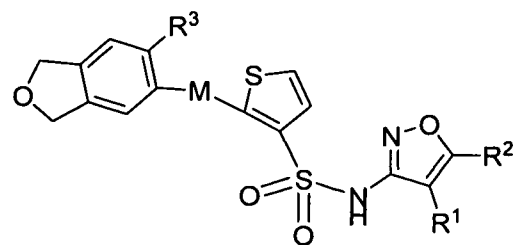
【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(1-1)

or



(1-2)

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

西他生坦(Sitaxentan)衍生物

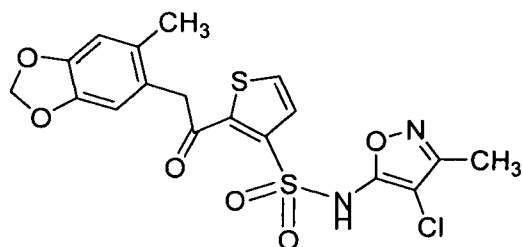
SITAXENTAN DERIVATIVE

## 【技術領域】

本發明涉及一種具有二氫異苯並呋喃環之化合物。更確切地講，本發明涉及N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-[2-(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)乙醯基]噻吩-3-磺醯胺及其類似物。

## 【先前技術】

已知噻吩基磺醯胺化合物被作為內皮素受體拮抗劑。例如，西他生坦，又被稱為N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-[2-(6-甲基-2H-1,3-苯並二氧雜戊環-5-基)乙醯基]噻吩-3-磺醯胺，係由於對肺動脈高壓和其他病狀的有效性而被推上市場之化合物（專利文獻1）。



西他生坦

然而，西他生坦的結構包括一個苯並二氧雜戊環，並且總體上，當藉由細胞色素P450（CYP）代謝時，具有這類苯並二氧雜戊環的化合物被轉化成在化學上高度反應性之代謝物，並且已知該等化合物藉由基於與CYP共價結合的鈍化作用而不可逆地抑制CYP的活性（非專利文獻1-3）。已知西他生坦本身具有CYP抑制活性，並且已經有與臨床上使用的藥劑的藥物-藥物相互作用之若干報導。為了解決這一問題，已經開發出用氬原子取代西他生坦的苯並二氧雜戊環基的亞甲基碳上的氫原子之化合物，但這種化合物尚未在商業上使用。

並且效果係不能令人滿意的（專利文獻2）。還已知含有氬的化合物通常要求較高的生產成本。因此，為了解決這一問題，存在對一種不使用氬之方法的需要。

## 引用清單

### 專利文獻

[專利文獻1] WO 96/31492

[專利文獻2] WO 2008/124803

### 非專利文獻

[非專利文獻1]藥理學評論（Pharmacological reviews） 42, 85, 1990（化學試劑抑制哺乳動物細胞色素P-450的選擇性（Selectivity in the inhibition of Mammalian Cytochrome P-450 by Chemical Agents））

[非專利文獻2]當代藥物代謝（Current Drug Metabolism），6, 413, 2005

[非專利文獻3]藥物代謝與處置（Drug Metabolism and Disposition），31, 289, 2003

## 【發明內容】

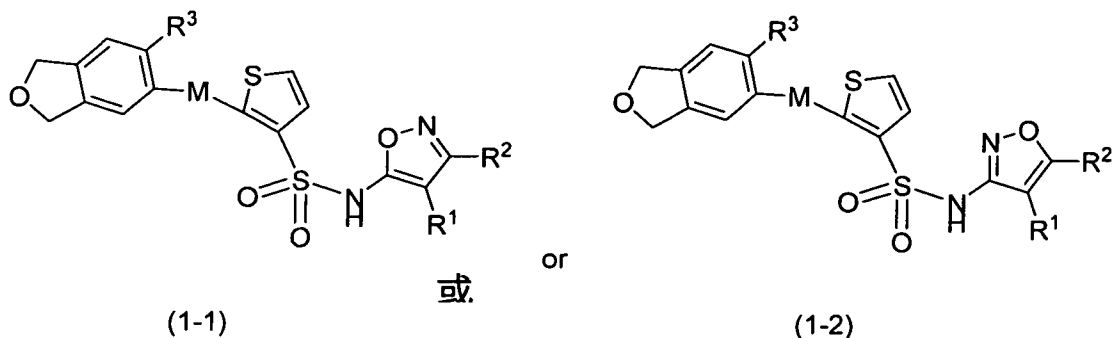
### 技術問題

本發明的一目的係提供一保留西他生坦的主要治療作用並具有改善之CYP抑制作用，而且具有不含氬的結構之化合物。

### 問題的解決方案

作為深入研究的結果，諸位發明人發現了本發明。確切地講，本發明涉及以下[1]至[19]。

[1] 一種由化學式(1-1)或化學式(1-2)代表之化合物，或其藥理學上可接受的鹽：

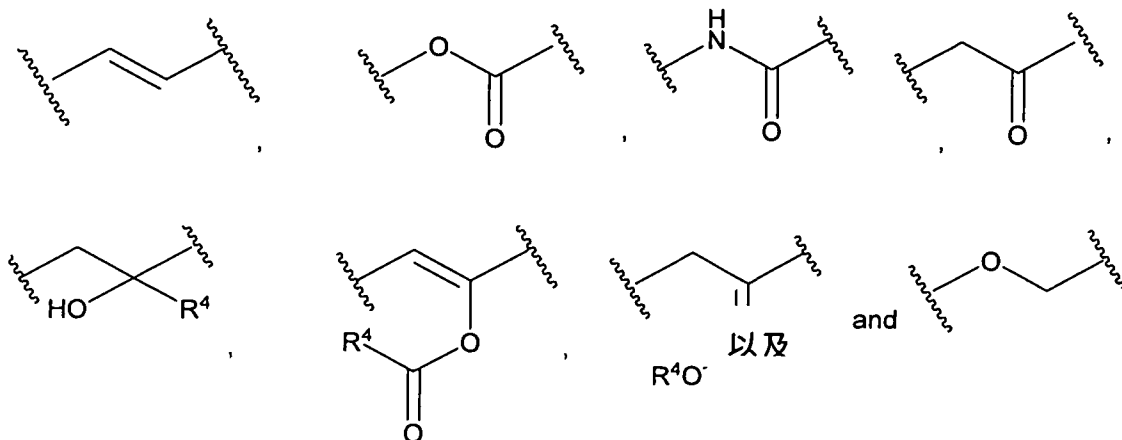


其中 $R^1$ 係一鹵素原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基；

$R^2$ 係一氫原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基；

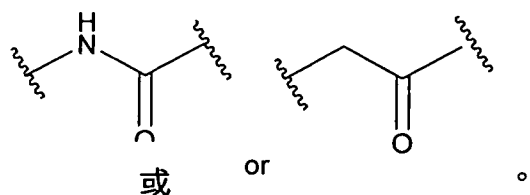
$R^3$ 係一個 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；並且

M係一選自下組的基團，該組由以下各項組成：

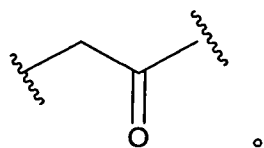


其中 $R^4$ 係一氫原子、甲基或乙基。

[2] 根據[1]所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中M係一由以下化學式代表的基團：



[3]根據[1]所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中M係一由以下化學式代表的基團：



[4]根據[1]至[3]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^1$ 係一鹵素原子。

[5]根據[4]所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^1$ 係一氯原子。

[6]根據[1]至[5]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^2$ 係一個甲基。

[7]根據[1]至[6]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^3$ 係一個 $C_{1-6}$ 烷基。

[8]根據[7]所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^3$ 係一個甲基。

[9]根據[1]至[8]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，它係由化學式 (1-1) 代表的一化合物。

[10] N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-[2-(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)乙醯基]噻吩-3-磺醯胺或其藥理學上可接受的鹽。

[11]一種藥用組合物，包含根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽。

[12]根據[11]所述之藥用組合物，它係一內皮素受體拮抗劑。

[13]根據[11]所述之藥用組合物，它係用於肺動脈高壓的一治療或預防劑。

[14]一種拮抗內皮素受體之方法，該方法包括將根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽給予患者。

[15]一種治療或預防肺動脈高壓之方法，該方法包括將根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽給予患者。

[16]根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，係用於拮抗一內皮素受體。

[17]根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽，係用於治療或預防肺動脈高壓。

[18]根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽的用途，係用於製造一內皮素受體拮抗劑。

[19]根據[1]至[10]中任一項所述之化合物或其藥理學上可接受的鹽的用途，係用於製造用於肺動脈高壓之治療或預防劑。

### 發明的有利效果

由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物（下文稱作化合物(1-1)或化合物(1-2)或統稱為化合物(1)）保留了西他生坦的主要治療作用並且與西他生坦相比，具有改善的CYP抑制作用。

### 【圖式簡單說明】

圖1係示出在EDNRA/293細胞中藉由配位基（內皮素）的劑量依賴性活化（ $\text{Ca}^{2+}$ 升高）之圖，其中活化（ $\text{Ca}^{2+}$ 升高）被顯示在垂直軸上，並且內皮素濃度（nM）被顯示在水平軸上；

圖2係示出在EDNRA/293細胞中西他生坦對 $\text{Ca}^{2+}$ 升高的劑量依賴性抑制作用之圖，給定為100%以作為無西他生坦的值的相對 $\text{Ca}^{2+}$ 升高被顯示在垂直軸上，而西他生坦濃度（nM）被顯示在水平軸上，並且內皮素濃度（nM）被顯示在圖的右側；並且

圖3係示出在EDNRA/293細胞中實例1的化合物對 $\text{Ca}^{2+}$ 升高的劑量依賴性抑制作之的圖，給定為100%以作為無實例1化合物的值的相對 $\text{Ca}^{2+}$ 升高被顯示在垂直軸上，而實例1化合物的濃度（nM）被顯示在水平軸上，並且內皮素濃度（nM）被顯示在圖的右側。

### 【實施方式】

以下將詳細描述本發明。

在本說明書中，本發明不限於一具體的晶形，而是可包括任一晶形或其混合物，但可能存在晶體多形體。本發明還包括非晶形式，並且根據本發明的化合物包括酸酐和水合物。此外，本發明還包括所謂的代謝物，該代謝物係由於本發明的化合物(1-1)或(1-2)的體內代謝（氧化、還原、水解、聯接等）而產生。更進一步，由於體內代謝（氧化、還原、水解、結合（conjugation）等）而產生本發明的化合物(1-1)或(1-2)的一化合物（所謂的前藥）也包括在本發明之中。

以下解釋在本說明書中所使用的術語、符號等等的含義，並且詳細地解釋了本發明。

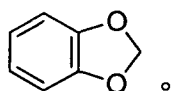
在本說明書中，「CYP」係藥物代謝酶細胞色素P450。

在本說明書中，「改善了CYP抑制作用」或「改善的CYP抑制作用」的意思係相比於西他生坦，對五種CYP分子（CYP1A2、2C9、2C19、2D6以及3A4），即主要CYP分子中的一或兩種的抑制程度總體上被改善。

在本說明書中，「保留主要治療作用」的意思係在臨床前研究中顯示出體外或體內藥理學活性，預期如西他生坦一樣顯示出臨床治療作用。體外藥理學活性的意思係，例如，相對於內皮素受體A的抑制活性。

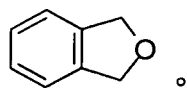
在本說明書中，「IC<sub>50</sub>」的意思係50%抑制濃度或半數抑制濃度。

在本說明書中，「苯並二氧雜戊環」係一具有以下結構的環或官能團：



在本說明書中，「二氫異苯並呋喃環」係一具有以下結構的環

或官能團：



在本說明書中，「鹵素原子」的意思係氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。

在本說明書中，「C<sub>1-6</sub>烷基」的意思係具有1到6個碳原子的直鏈或支鏈烷基，並且實例包括甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、2-甲基-1-丙基、2-甲基-2-丙基、1-丁基、2-丁基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、1-己基、2-己基以及3-己基。

在本說明書中所使用的術語「C<sub>1-6</sub>烷氧基」的意思係一氧原子被附接到以上定義的「C<sub>1-6</sub>烷基」的末端的基團，並且實例包括甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、2-甲基-1-丙氧基、2-甲基-2-丙氧基、1-丁氧基、2-丁氧基、1-戊氧基、2-戊氧基、3-戊氧基、1-己氧基、2-己氧基以及3-己氧基。

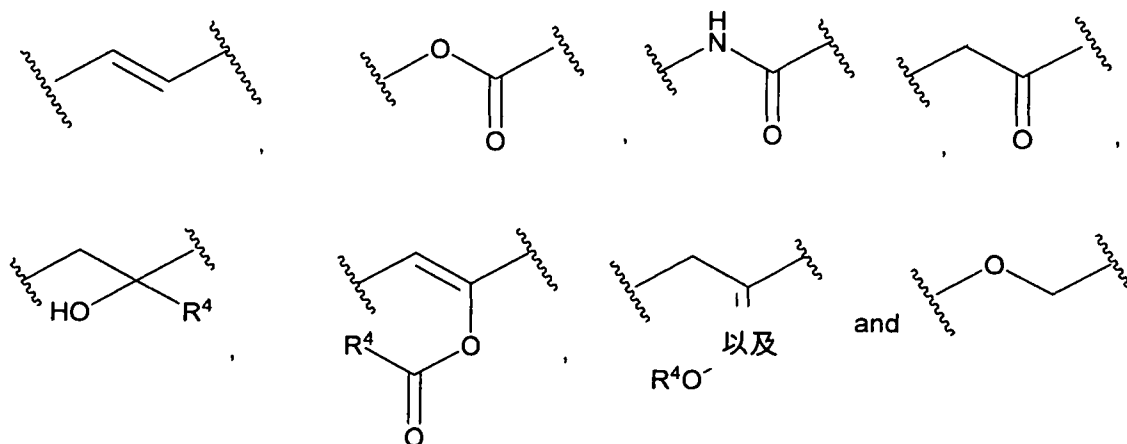
本發明的化合物係由化學式(1-1)或化學式(1-2)代表的一化合物，並且較佳的是由化學式(1-1)代表的一化合物。

在由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物中，R<sup>1</sup>係一鹵素原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基，並且R<sup>1</sup>較佳的是一鹵素原子，並且更佳的是氯原子。

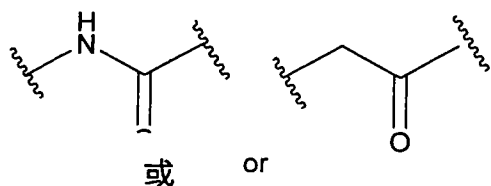
在由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物中，R<sup>2</sup>係一氫原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基，並且R<sup>2</sup>較佳的是甲基。

在由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物中，R<sup>3</sup>係一個C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基，並且R<sup>3</sup>較佳的是一個C<sub>1-6</sub>烷基，並且更佳的是甲基。

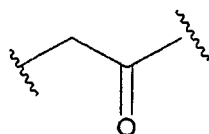
在由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物中，M係一選自下組的基團，該組由以下各項組成：



其中 $R^4$ 係一氫原子、甲基或乙基。在以上示出的基團中的該等鍵的取向係左旋式基團結合至該二氫異苯並呋喃環，並且右旋式基團結合至該噻吩環。M較佳的是一由以下代表的基團：



其中羰基碳結合至該噻吩環，並且更佳的一由以下代表的基團：



其中羰基碳結合至該噻吩環。

在本說明書中，「藥理學上可接受的鹽」不受特別限制，只要它與由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物形成鹽並且是藥理學上可接受的即可，並且實例包括無機酸鹽、有機酸鹽、無機鹼鹽、有機鹼鹽以及酸性或鹼性胺基酸鹽。

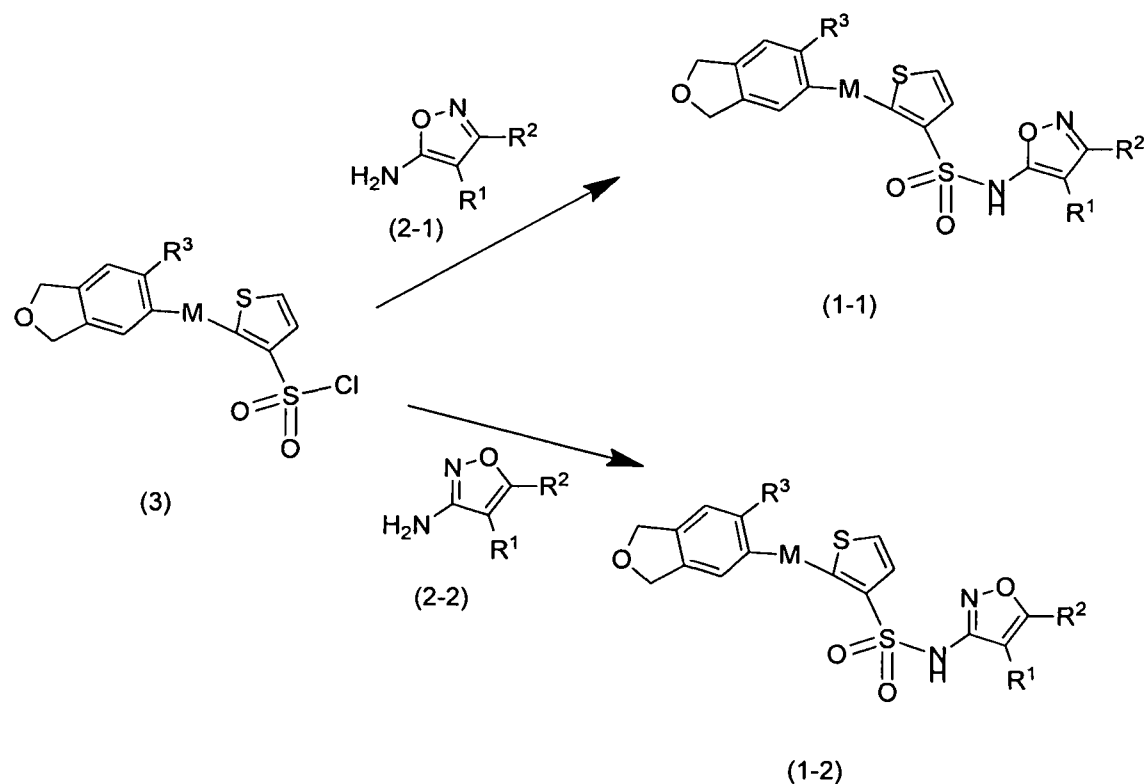
無機酸鹽的較佳的實例包括鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽以及磷酸鹽，並且有機酸鹽的較佳的實例包括乙酸鹽、丁二酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、硬脂酸鹽、苯甲酸鹽、扁桃酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽以及苯磺酸鹽。

無機鹼鹽的較佳的實例包括鹼金屬鹽（如鈉鹽和鉀鹽）、鹼土金屬鹽（如鈣鹽和鎂鹽）、鋁鹽以及銨鹽，並且有機鹼鹽的較佳的實例包括二乙胺鹽、二乙醇胺鹽、葡甲胺鹽以及N,N'-二苯甲基乙二胺鹽。

酸性胺基酸鹽的較佳的實例包括天冬胺酸鹽和穀胺酸鹽，並且鹼性胺基酸鹽的較佳的實例包括精胺酸鹽、賴胺酸鹽以及鳥胺酸鹽。

由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物可以藉由以下所述的方法，或藉由具有基於熟習該項技術者的普通知識所做出的改進的以下所述方法來產生。然而，用於產生由化學式(1-1)或(1-2)代表的化合物的方法並不限於該等。

#### 工藝A



其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>以及M係如以上所定義的。

這一工藝係藉由一種磺醯氯化合物(3)與一種胺基異噁唑化合物(2-1)或(2-2)在溶劑的存在或缺失下、在鹼存在下並且在催化劑的存在或缺失下的縮合反應來獲得化合物(1-1)或(1-2)的工藝。

使用的溶劑不受特別限制，只要它在一定程度上溶解起始材料而不抑制反應即可，並且包括，例如，四氫呋喃和吡啶。

使用的鹼包括，例如，氫化鈉或吡啶。

4-二甲基氨基吡啶或類似物可以用作該催化劑。

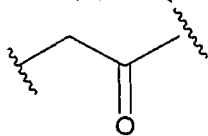
反應溫度根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為0℃至120℃，並且較佳的是為15℃至100℃。

反應時間根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為10分鐘至5天，並且較佳的是為1小時至3天。

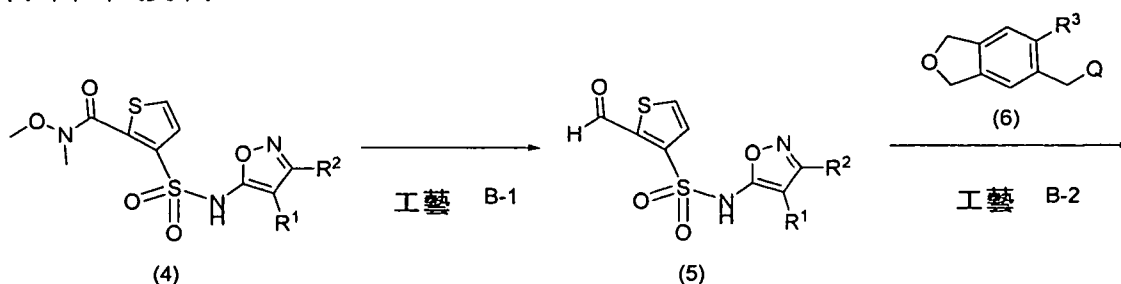
該磺醯氫化合物(3)和胺基異噁唑(2-1)或(2-2)可以是商業產品，或可以使用以下實例中描述的那些化合物，或可以藉由熟習該項技術者已知的方法（例如美國專利號4659369、4861366、4753672）合成該等化合物。

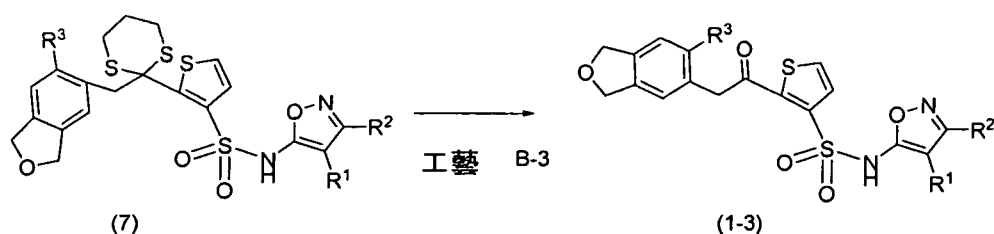
### 工藝B

當化合物(1-1)或(1-2)中的M係由以下代表的這種基團時：



化合物(1-1)或(1-2)可以藉由以下工藝B來獲得。以下方案被解釋為用於產生化合物(1-1)的方法，但化合物(1-2)可以按相同方式使用不同起始材料來獲得。





其中 $R^1$ 、 $R^2$ 以及 $R^3$ 係如以上所定義的；並且Q係一離去基團，包括一鹵素原子，如溴原子、氯原子以及碘原子；一個 $C_{1-4}$ 烷磺醯氧基，如甲磺醯氧基；以及一個磺醯氧基，如苯磺醯氧基和對甲苯磺醯氧基。

化合物(4)和化合物(6)可以是已知的化合物，或可以是能夠由熟習該項技術者藉由普通方法從已知化合物產生的化合物。

#### 工藝B-1

這一工藝係在溶劑存在下使用還原劑將化合物(4)轉化為化合物(5)的工藝。

使用的溶劑不受特別限制，只要它在一定程度上溶解起始材料而不抑制反應即可，並且包括，例如，四氫呋喃。

使用的還原劑包括，例如，二異丁基氫化鋁。

反應溫度根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為 $-78^{\circ}\text{C}$ 至 $100^{\circ}\text{C}$ ，並且較佳的是為 $-78^{\circ}\text{C}$ 至室溫。

反應時間根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為10分鐘至5天，並且較佳的是為30分鐘至1天。

#### 工藝B-2

這一工藝係首先用1,3-丙二硫醇將化合物(5)的甲醯基轉化為二噻烷，然後使用一種鹼來在該二噻烷中產生陰離子，並且然後使此與化合物(6)反應以便獲得化合物(7)的工藝。還可以加入一路易士酸以便在轉化成二噻烷的過程中獲得更好的結果。

在向二噻烷的轉化反應中使用的溶劑不受特別限制，只要它在

一定程度上溶解起始材料而不抑制反應即可，但包括，例如，二氯甲烷。

在向二噻烷的轉化反應中使用的路易士酸包括，例如，三氟化硼二乙基醚合物。

用於向二噻烷的轉化反應的反應溫度根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為0℃至100℃，並且較佳的是為室溫。

用於向二噻烷的轉化反應的反應時間根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為10分鐘至5天，並且較佳的是為30分鐘至1天。

用於陰離子產生以及同化合物(6)的反應的溶劑不受特別限制，只要它在一定程度上溶解起始材料而不抑制反應即可，但包括，例如，四氫呋喃。

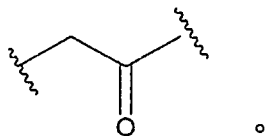
用於陰離子產生以及同化合物(6)的反應的鹼包括，例如，正丁基鋰。

反應溫度根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為-78℃至100℃，並且較佳的是為-78℃至室溫。

反應時間根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為10分鐘至5天，並且較佳的是為30分鐘至1天。

### 工藝B-3

該工藝係將化合物(7)的二噻烷環轉化為羰基以便獲得化合物(1-3)，或者換句話說其中M係由以下代表的這種基團的化合物(1-1)的工藝：



這一工藝可以借助于一普通的二噻烷環脫保護反應，例如與氧化劑如硝酸銀的反應，來完成。

在該二噻烷環脫保護反應中使用的溶劑不受特別限制，只要它

在一定程度上溶解起始材料而不抑制反應即可，但包括，例如，甲醇、水以及四氫呋喃。

在該二噻烷環脫保護反應中使用的氧化劑包括，例如，硝酸銀。

用於該二噻烷環脫保護反應的反應溫度根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為0℃至150℃，並且較佳的是為室溫至100℃。

用於該二噻烷環脫保護反應的反應時間根據起始材料、溶劑等而不同，但通常為30分鐘至5天，並且較佳的是為1天至4天。

在上述各方法的各工藝中的反應完成後，可以根據常規方法從反應混合物中收集各工藝的目標化合物。

例如，當整個反應混合物為液體時，如所希望將反應混合物冷卻到室溫或用冰冷卻，並且在適當時用酸、鹼、氧化劑或還原劑進行中和，加入不與水混溶並且不與目標化合物反應的有機溶劑（如乙酸乙酯），並且分離包含目標化合物的層。然後，加入不與所得層混溶並且不與目標化合物反應的溶劑，對包含目標化合物的層進行洗滌，並且分離該層。此外，當該層為有機層時，可以藉由用乾燥劑（如無水硫酸鎂或無水硫酸鈉）進行乾燥並且蒸餾出溶劑來收集目標化合物。當該層為水層時，可以藉由對該層在電學上脫礦質並且然後進行凍乾來收集目標化合物。

另外，當整個反應混合物為液體並且如果可能的話，僅藉由在常壓或減壓下蒸餾出除目標化合物以外的物質（如溶劑或試劑）即可收集目標化合物。

此外，當僅目標化合物沉澱為固體時，或當上述整個反應混合物為液體並且僅目標化合物在收集過程中沉澱時，可以藉由利用以下方式收集目標化合物來進一步收集目標化合物：首先過濾，用適當有

機或無機溶劑洗滌借助於過濾所收集的目標化合物，並且乾燥，以便用與上述整個反應混合物為液體的情況類似的方式處理母液。

更進一步，當僅試劑或催化劑呈固體形式存在，或上述整個反應混合物為液體並且僅試劑或催化劑在收集過程中以固體形式沉澱，並且目標化合物溶解于溶液中時，可以藉由以下方式收集目標化合物：首先濾出試劑或催化劑，用適當的有機或無機溶劑洗滌所濾出的試劑或催化劑，合併所得洗滌物與母液，並且用與上述整個反應混合物為液體的情況類似的方式處理所得混合物。

具體來說，當反應混合物中所包含的除目標化合物以外的物質不抑制下一步驟中的反應時，反應混合物也可以在不特別分離目標化合物的情況下用於下一步驟。

可以在適當時進行再結晶、不同的色譜法以及蒸餾，以便提高藉由上述方法收集的目標化合物的純度。

典型地，當所收集的目標化合物係固體時，可以藉由再結晶來提高目標化合物的純度。在再結晶中，可以使用不與目標化合物反應的單一溶劑或多種溶劑的混合物。具體地說，首先將目標化合物溶解於在室溫下或在加熱下不與該目標化合物反應的一或多種溶劑中。用冰水等冷卻所得混合物，或者在室溫下攪拌或靜置，以使得目標化合物可以從該混合物中結晶。

可以藉由不同色譜方法來提高所收集的目標化合物的純度。總體上，有可能使用由默克集團（Merck KGaA）製造的弱酸性矽膠如 Silica gel 60（70-230目或340-400目）和由富士矽化學公司（Fuji Silysia Chemical Ltd）製造的BW-300（300目）。當目標化合物係鹼性的並且被過強地吸附到以上矽膠上時，還有可能使用NH矽膠如由富士矽化學公司製造的丙胺塗布的矽膠（200-350目）和由株式會社

山善（Yamazen Corporation）製造的一次性中壓製備型填充柱（Hi-Flash Amino）。當目標化合物係雙極性的或必須用更具極性的溶劑如甲醇洗脫時，例如，還有可能的是使用由NAM實驗室（NAM Laboratory）製造的NAM-200H或NAM-300H，或由YMC有限公司（YMC Co. Ltd.）製造的YMC GEL ODS-A。還有可能使用如以上所述的一次性中壓製備型填充柱，該等填充柱預先填充了填料並且是由株式會社山善、和光純藥工業株式會社（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）、Biotage AB或W. R. Grace & Co.（Hi-Flash）製造的。純度得到提高的目標化合物可以藉由以下方式來獲得：使用該等矽膠，用不與目標化合物反應的一或多種溶劑洗脫目標化合物，並且蒸餾出這一或多種溶劑。

當所收集的目標化合物係液體時，還可以藉由蒸餾來提高目標化合物的純度。在蒸餾中，可以藉由在室溫下或在加熱下使目標化合物經歷減壓而蒸餾出目標化合物。

以上已經描述了用於產生化合物(1-1)或(1-2)的方法的代表性實例。在化合物(1-1)或(1-2)的產生中，原料化合物和不同的試劑可以形成鹽或溶劑化物，如水合物，都取決於起始材料、所用溶劑等而變化，並且不受特別限制，只要它們不抑制反應即可。並且，明顯地是，所用溶劑取決於起始材料、試劑等而變化，並且不受特別限制，只要它不抑制反應並且在一定程度上溶解起始材料即可。當化合物(1-1)或(1-2)係呈游離形式獲得時，它能夠借助於常規方法被轉化成可以由化合物(1-1)或(1-2)形成的鹽或該化合物或鹽的溶劑化物。

當化合物(1-1)或(1-2)係呈鹽或溶劑化物獲得時，它能夠藉由常規方法被轉化為化合物(1-1)或(1-2)的游離形式。

關於化合物(1-1)或(1-2)所獲得的不同的異構體（如幾何異構

體、光學異構體、旋轉異構體、立體異構體以及互變異構體）可以使用常用分離手段進行純化和分離，例如，再結晶、非對映異構體鹽形成、酶拆分以及不同的色譜法（如薄層色譜法、柱色譜法以及氣相色譜法）。

化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽可以藉由常規方法來配製，並且劑型的實例包括口服配製品（如片劑、顆粒劑、粉劑、膠囊劑以及糖漿）、注射液（用於靜脈內給藥、肌肉內給藥、皮下給藥以及腹膜內給藥）以及外用配製品（如經皮吸收配製品（如軟膏和貼片）、眼用製劑、鼻用製劑以及栓劑）。

該等固體配製品（如片劑、膠囊劑、顆粒劑以及粉劑）通常可以包含0.001 wt%到99.5 wt%、較佳的是0.01 wt%到90 wt%等的化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽。

當製造口服固體配製品時，可以藉由根據需要向化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽中加入稀釋劑、粘合劑、崩解劑、潤滑劑、著色劑等並且藉由常規方法進行處理來製備片劑、顆粒劑、粉劑以及膠囊劑。還可以根據需要將片劑、顆粒劑、粉劑、膠囊劑等塗膜。

稀釋劑的實例包括乳糖、玉米澱粉以及微晶纖維素，粘合劑的實例包括羥丙基纖維素和羥丙基甲基纖維素，而崩解劑的實例包括羧甲基纖維素鈣和交聯羧甲纖維素鈉。

潤滑劑的實例包括硬脂酸鎂和硬脂酸鈣，並且著色劑的實例包括二氧化鈦。

塗膜劑的實例包括羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素以及甲基纖維素。

明顯地，上述任何賦形劑都不限於該等實例。

當製造注射液（用於靜脈內給藥、肌肉內給藥、皮下給藥以及腹膜內給藥）時，它們可以藉由根據需要向化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽中加入pH值調節劑、緩衝劑、懸浮劑、增溶劑、抗氧化劑、防腐劑（消毒劑）、張力（tonicity）調節劑等並且藉由常規方法進行處理來製造。還可以藉由凍乾法製備有待在使用前溶解的凍乾配製品。例如，該等注射液可以藉由靜脈內、皮下以及肌肉內給予。

pH值調節劑和緩衝劑的實例包括有機酸或無機酸和/或其鹽，懸浮劑的實例包括甲基纖維素、聚山梨醇酯80以及羧甲基纖維素鈉，增溶劑的實例包括聚山梨醇酯80和聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單月桂酸酯，抗氧化劑的實例包括 $\alpha$ -生育酚，防腐劑的實例包括對羥基苯甲酸甲酯和對羥基苯甲酸乙酯，而張力調節劑的實例包括葡萄糖、氯化鈉以及甘露醇；然而，明顯的是，賦形劑不限於該等實例。

該等注射液通常可以包含0.000001 wt%到99.5 wt%、較佳的是0.00001 wt%到90 wt%等的化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽。

當製造外用配製品時，可以藉由向化合物(1-1)或(1-2)或其藥理學上可接受的鹽中加入基礎材料以及根據需要的上述乳化劑、防腐劑、pH值調節劑、著色劑等並且藉由常規方法進行處理來製造經皮吸收配製品（如軟膏和貼片）、眼用製劑、鼻用製劑、栓劑等。

常規用於藥物、准藥物、化妝品等的不同的原材料可以用作基礎材料，並且實例包括以下原材料：如動物和植物油、礦物油、酯油、蠟、高級醇以及淨化水。

該等外用配製品通常可以包含0.000001 wt%到99.5 wt%、較佳的是0.00001 wt%到90 wt%等的化合物（1-1）或（1-2）或其藥理學上可

接受的鹽。

根據本發明的藥物的劑量典型地取決於症狀、年齡、性別、體重等而變化，但如果劑量足以產生所希望的作用，就是可接受的。例如，對於成年人來說，以一天或多天期間一個劑量的方式或以一天2到6個分次劑量的方式使用每天約0.1到5000 mg（較佳的是0.5到1000 mg，更佳的是1到600 mg）的劑量。

化合物(1-1)或(1-2)可用作化學探針以便將靶標蛋白截留於生物活性的低分子量化合物中。具體地說，可利用日本質譜學報（J. Mass Spectrum. Soc. Jpn.），第51卷，第5期，2003，第492-498頁或WO 2007/139149等中所述的技術，藉由將標記基團、連接物等引入與表達該化合物的活性所必需的結構部分不同的部分中，而將化合物(1-1)或(1-2)轉化成親和色譜法探針、光親和探針等。

用於化學探針的標記基團、連接物等的實例包括由以下(1)到(5)組成的組中所顯示的基團：

(1)蛋白質標記基團，如光親和標記基團（如苯甲醯基、二苯甲酮基、疊氮基、羰基疊氮基、二氮丙啶基、烯酮基、重氮基以及硝基）以及化學親和基團（如酮基，其中一 $\alpha$ -碳原子被替換為一鹵素原子，胺基甲醯基，酯基，烷硫基，邁克爾受體如 $\alpha,\beta$ -不飽和酮和酯，以及環氧乙烷基）；

(2)可裂解連接物，如-S-S-、-O-Si-O-、單糖（如葡萄糖基和半乳糖基）或二糖（如乳糖）以及可藉由酶促反應裂解的寡肽連接物；

(3)採捕（fishing）標誌基團，如生物素和3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮雜-4-硼雜-s-二環戊二烯並苯（indacen）-3-基)丙醯基；

(4)可檢測標記，如放射性同位素標記基團，如 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 以及

$^{14}\text{C}$ ；螢光標記基團，如螢光素、若丹明、丹磺醯基、傘形酮、7-硝基呋喃基以及3-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4H-3a,4a-二氮雜-4-硼雜-s-二環戊二烯並苯-3-基)丙醯基；化學發光基團，如螢光素和魯米諾；以及重金屬離子，如鐳系金屬離子和鐳離子；或

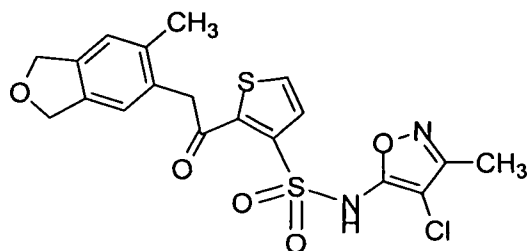
(5)與固相載體結合的基團，該等固相載體如玻璃珠、玻璃床、微量滴定板、瓊脂糖珠、瓊脂糖床、聚苯乙烯珠、聚苯乙烯床、尼龍珠以及尼龍床。

根據以上文獻中所述的方法等，藉由將選自以上(1)至(5)組成的組的標記基團等引入化合物(1-1)或(1-2)中而製備的探針可以用作化學探針來識別經過標記的蛋白質，例如，該等經過標記的蛋白質可用于尋找新穎藥物目標。

## 實例

化合物(1-1)或(1-2)可以藉由例如以下實例中描述的方法來產生，並且化合物(1-1)或(1-2)的作用可以藉由以下測試實例中描述的方法來證實。然而，該等實例僅為說明性的，並且本發明決不受該等具體實例的限制。

[實例1] N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-[2-(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)乙醯基]噻吩-3-磺醯胺

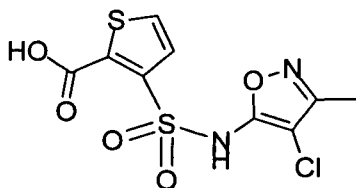


將產生實例1-7中所述的N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-{2-[(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)甲基]-1,3-二噁烷-2-基}噻吩-3-磺醯胺 (300 mg, 0.55 mmol)、甲醇 (20 mL)、水 (2 mL) 以及硝酸銀 (940 mg, 5.5 mmol) 的混合物在55°C下攪拌3天。允許反應混合物

冷卻至室溫，在這一溫度下加入四氫呋喃（40 mL）和鹽水（1 mL），並且用c鹽（Celite）過濾該混合物。藉由加入乙酸乙酯（200 mL）、水（100 mL）以及飽和的檸檬酸水溶液（1 mL）來萃取濾液。用鹽水洗滌有機層並且經無水硫酸鎂乾燥，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（甲醇:乙酸乙酯=1 : 9）純化殘餘物，並且然後藉由矽膠薄層色譜法（甲醇:乙酸乙酯=1 : 32）進一步純化，以得到標題化合物（45 mg，產率18%）。

$^1\text{H-NMR}$  譜 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.99 (3H, s), 2.13 (3H, s), 4.89 (2H, s), 4.92 (2H, s), 4.95 (2H, s), 7.07 (1H, s), 7.09 (1H, s), 7.42 (1H, d,  $J=5.1$  Hz), 7.77 (1H, d,  $J=5.1$  Hz)。

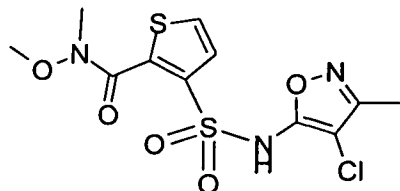
[產生實例 1-1] 3-[(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)胺磺醯基]噻吩-2-甲酸



在 $0^\circ\text{C}$ 下，向氫化鈉（60%，2.1 g，52 mmol）與四氫呋喃（20 mL）的混合物中加入4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-胺（3.0 g，23 mmol）與四氫呋喃（20 mL）的混合物，之後在這一溫度下攪拌30分鐘。在 $0^\circ\text{C}$ 下，向反應混合物中加入3-(氯磺醯基)噻吩-2-甲酸甲酯（5.3 g，22 mmol），然後將其在 $0^\circ\text{C}$ 下攪拌1小時，並且然後在室溫下攪拌4小時。在室溫下將己烷（100 mL）加入反應混合物中，並藉由過濾收集所沉澱的固體。向該固體加入甲醇（20 mL），之後加入2 N氫氧化鈉水溶液（20 mL），並將反應混合物在室溫下攪拌5小時。在減壓下蒸餾出溶劑，並向殘餘物加入冰水（20 mL），之後加入2 N鹽酸水溶液（20 mL）。藉由過濾收集所沉澱的固體，以得到標題化合物（2.5 g，產率35%）。

$^1\text{H-NMR}$  譜 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.16 (3H, d,  $J=1.8$  Hz), 7.45 (1H, dd,  $J=1.3, 5.3$  Hz), 7.95 (1H, dd,  $J=0.9, 5.3$  Hz)。

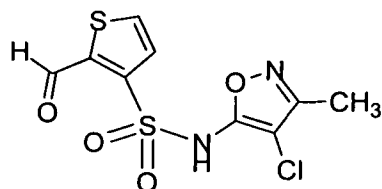
[產生實例1-2] 3-[(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)胺磺醯基]-N-甲氧基-N-甲基噻吩-2-甲醯胺



在室溫下，向產生實例1-1中所述的3-[(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)胺磺醯基]噻吩-2-甲酸 (2.5 g, 7.8 mmol) 與四氫呋喃 (25 mL) 的混合物中加入1,1'-羰基二咪唑 (2.0 g, 12 mmol)，之後在這一溫度下攪拌30分鐘。在室溫下向反應混合物中依次加入咪唑 (1.1 g, 16 mmol) 和N,O-二甲基羥胺鹽酸鹽 (1.2 g, 12 mmol)，之後在這一溫度下攪拌5小時。向該反應混合物中加入1 N鹽酸水溶液 (50 mL)，然後用乙酸乙酯對其進行萃取。用鹽水洗滌有機層並且經無水硫酸鈉乾燥，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法 (氯仿:甲醇=9 : 1) 純化殘餘物，以得到標題化合物 (1.5 g, 產率53%)。

$^1\text{H-NMR}$  譜 ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.23 (3H, s), 3.45 (3H, s), 3.74 (3H, s), 7.47 (1H, d,  $J=5.3$  Hz), 7.53 (1H, d,  $J=5.3$  Hz)。

[產生實例1-3] N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-甲醯基噻吩-3-磺醯胺

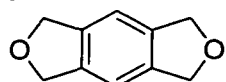


在-78℃下，向產生實例1-2中所述的3-[(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)胺磺醯基]-N-甲氧基-N-甲基噻吩-2-甲醯胺 (8.0 g, 22 mmol) 與

四氫呋喃（160 mL）的混合物中逐滴加入二異丁基氫化鋁（46 mL，48 mmol，1.0 M的正己烷溶液），之後在0℃下攪拌30分鐘。在0℃下，向反應混合物中逐滴加入氯化銨的飽和水溶液，然後允許其逐漸升溫至室溫並在這一溫度下攪拌1小時。用鹽過濾反應混合物，並且向濾液中加入水，然後用乙酸乙酯對其進行萃取。用鹽水洗滌有機層，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯:甲醇=30:1）純化殘餘物，以得到標題化合物（5.1 g，產率75%）。

<sup>1</sup>H-NMR譜（DMSO-d<sub>6</sub>）δ（ppm）: 1.97 (3H, s), 7.35 (1H, d, J=5.1 Hz), 7.97 (1H, d, J=5.1 Hz), 10.52 (1H, d, J=1.1 Hz)。

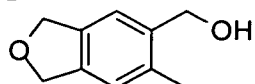
[產生實例1-4] 5,11-二氧雜三環[7.3.0.0<sup>3,7</sup>]十二碳-1,3(7),8-三烯



在室溫下，向1,2,4,5-四-(溴甲基)-苯（150 g，0.33 mmol）與1,4-二噁烷（2 L）的混合物中加入四丁基氫氧化銨（640 mL）的55%水溶液，之後在90℃下攪拌6小時。允許反應混合物冷卻至室溫，並且在加入2 N鹽酸水溶液（2 L）之後，用乙酸乙酯萃取。用鹽水洗滌有機層並且經無水硫酸鈉乾燥，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯:己烷=1:9）純化殘餘物，以得到標題化合物（35 g，產率63%）。

<sup>1</sup>H-NMR譜（CDCl<sub>3</sub>）δ（ppm）: 5.10 (8H, s), 7.08 (2H, s)。

[產生實例1-5] (6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)甲醇

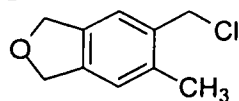


在-78℃下，向鋰粉（15 g，2.1 mol）、4,4'-二-三級丁基聯苯（5.0 g，0.021 mol）以及四氫呋喃（200 mL）的混合物中加入產生實例1-4中所述的5,11-二氧雜三環[7.3.0.0<sup>3,7</sup>]十二碳-1,3(7),8-三烯（35 g，0.21 mol）與四氫呋喃（100 mL）的混合物，之後在這一溫

度下攪拌4小時。在這一溫度下向反應混合物中加入水（10 mol），並且徹底攪拌。允許反應混合物升溫至室溫，並且在加入2 N鹽酸水溶液（500 mL）之後，用乙酸乙酯進行萃取。用鹽水洗滌有機層並且經無水硫酸鈉乾燥，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯:己烷=3：7）純化殘餘物，以得到標題化合物（10 g，產率30%）。

$^1\text{H-NMR}$ 譜 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.24 (3H, s), 4.48 (2H, d,  $J=5.3$  Hz), 4.96 (4H, s), 5.10 (1H, t,  $J=5.3$  Hz), 7.07 (1H, s), 7.29 (1H, s)。

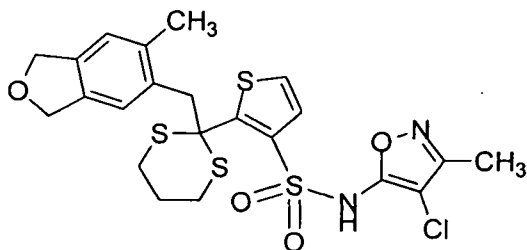
[產生實例1-6] 5-(氯甲基)-6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃



在冰冷卻下，向產生實例1-5中所述的(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)甲醇（1.0 g，6.1 mmol）與二氯甲烷（10 mL）的混合物中加入三乙胺（1.7 mL，12 mmol），之後在這一溫度下加入甲磺醯氯（470  $\mu\text{L}$ ，6.1 mmol）。在室溫下將反應混合物攪拌3小時。向該反應混合物中加入水，然後用乙酸乙酯對其進行萃取。用鹽水洗滌有機層並且經無水硫酸鎂乾燥，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯:庚烷=1：10）純化殘餘物，以得到標題化合物（680 mg，產率61%）。

$^1\text{H-NMR}$ 譜 ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.44 (3H, s), 4.63 (2H, s), 5.08 (4H, s), 7.09 (1H, s), 7.20 (1H, s)。

[產生實例1-7] N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-{2-(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)甲基}-1,3-二噻烷-2-基}噻吩-3-磺醯胺



在冰冷卻下，向產生實例1-3中所述的N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-甲醯基噻吩-3-磺醯胺（4.9 g，16 mmol）與二氯甲烷（100 mL）的混合物中依次加入三氟化硼合乙醚（8.1 mL，64 mmol）和1,3-丙二硫醇（1.9 mL，19 mmol），之後在室溫下攪拌90分鐘。在冰冷卻下向該反應混合物中加入水，然後用二氯甲烷對其進行萃取。用鹽水洗滌有機層，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯）純化殘餘物，以得到呈粗產物的N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-(1,3-二噻烷-2-基)噻吩-3-磺醯胺。在-78℃下，向粗制的N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-(1,3-二噻烷-2-基)噻吩-3-磺醯胺與四氫呋喃（50 mL）的混合物中逐滴加入正丁基鋰（9.7 mL，16 mmol，1.6 M的正己烷溶液），之後在-35℃的內部溫度下攪拌20分鐘。將反應混合物冷卻至-78℃，並且在這一溫度下加入在產生實例1-6中所述的5-(氯甲基)-6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃（960 mg，5.3 mmol），並且在0℃下攪拌1小時。將反應混合物冷卻至-78℃，並且在這一溫度下加入乙酸（0.90 mL，16 mmol）與四氫呋喃（7 mL）的混合物。使反應混合物逐漸返回至室溫，在這一溫度下加入水和檸檬酸水溶液，並且用乙酸乙酯萃取該混合物。用鹽水洗滌有機層，並且在減壓下蒸餾出溶劑。藉由矽膠柱色譜法（乙酸乙酯:庚烷=4：1）純化殘餘物，以得到標題化合物（1.6 g，產率54%）。

<sup>1</sup>H-NMR譜（DMSO-d<sub>6</sub>）δ（ppm）: 1.68-1.76（1H, m）, 2.01-2.05（1H, m）, 2.15（3H, s）, 2.20（3H, s）, 2.80-2.85（4H, m）, 3.73（2H, s）, 4.79（2H, s）, 4.90（2H, s）, 6.64（1H, s）, 7.02（1H, s）, 7.44（1H, d, J=5.5 Hz）, 7.54（1H, d, J=5.5 Hz）。

#### 測試實例1

西他生坦和實例1化合物對內皮素受體A（EDNRA）的抑制作用

用一鼠白血病逆轉錄病毒載體將人源性EDNRA（基因號NM\_001957.2）的蛋白質編碼區轉導至HEK-293（人胚腎，ATCC號：CRL-1573）細胞中，以便製備一穩定表達EDNRA的細胞系（EDNRA/293細胞）。使用補充有10%胎牛血清和青黴素以及鏈黴素的DMEM（達爾伯克氏改良的伊格爾培養基（Dulbecco's Modified Eagle Medium））作為培養基。

在測量前的一天，在一個384孔板上以5000個細胞/孔接種該等EDNRA/293細胞。在測量的當天，向各孔中加入溶解在漢克斯平衡的緩衝溶液中的用於鈣測量的一螢光試劑（Calcium4，Molecular Device），並且允許靜置大約1小時。然後，向一些孔中加入被製備成預先確定的最終濃度的西他生坦和實例1化合物（下文稱作試樣），並且允許靜置大約1小時，以便允許該等試樣作用於EDNRA/293細胞。

將內皮素，即一EDNRA配位基（活化劑），施加至未用該等試樣處理的多個孔，並且藉由測量儀器（FDSS7000，Hamamatsu Photonics）來檢測所得的活化（鈣升高）反應，以便獲得如圖1所示出的劑量依賴性活化反應。在1 nM或以上的劑量下，該活化反應變得幾乎是飽和的。為此，將在以下抑制反應中用於檢測的內皮素的劑量設定在0.03、0.1或0.3 nM。

當藉由測量儀器（FDSS7000，Hamamatsu Photonics）來檢測在將0.03、0.1或0.3 nM的內皮素施加至用試樣處理過的多個單獨孔時所發生的活化（鈣升高）反應時，西他生坦與實例1化合物均抑制了該活化反應，如圖2和圖3所示出。

## 測試實例2

### CYP抑制作用

藉由以下兩種方法測試西他生坦和實例1化合物之CYP抑制作用。

由於西他生坦對CYP的時間依賴性抑制作用可以藉由在用一含有輔酶和含CYP的人肝微粒體部分的溶液進行預孵育之後，測試抑制作用的增加來進行評估，按照方法1執行實例1化合物的時間依賴性抑制作用測試。還按照方法2測試了CYP的競爭性抑制作用。

#### 方法1

關於五種CYP酶（CYP1A2、2C9、2C19、2D6以及3A4），評估了西他生坦和實例1化合物的時間依賴性抑制能力。

向酶溶液（含有人肝微粒體（0.2 mg/mL）、100 mM Kpi以及0.1 mM EDTA）中加入測試物質，並且在37°C在該輔酶存在或缺失下預孵育30分鐘。將測試物質的最終濃度設定在0.1、0.2、0.4、0.5、1、2、10或50  $\mu$ M。將一NADPH產生系統（60 mM  $\text{MgCl}_2$ 溶液，含有3.6 mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、90 mM葡萄糖-6-磷酸以及1 Unit/mL葡萄糖-6-磷酸脫氫酶，孵育5分鐘以便產生NADPH）用作該輔酶。預孵育之後，收集反應溶液的一部分，藉由與一模型底物溶液和該NADPH產生系統相混合進行10倍稀釋，並且然後在37°C下孵育10分鐘。加入等量的乙腈與甲醇的混合溶液（1：1，含有0.05  $\mu$ M右啡烷或0.05  $\mu$ M普萘洛爾作為內標），以便終止反應，並且藉由LC-MS/MS測量反應溶液中的模型底物的代謝物。表1中示出各CYP酶的模型底物和模型底物代謝物。還在無測試物質加入的情況下執行了一類似的測試作為對照測試。給出相對於該對照測試中模型底物代謝物的量的比率作為剩餘活度。評估了在NADPH存在下的剩餘活度相對於在NADPH缺失下的剩餘活度的比率，並且80%或以下的比率被定義為「+」，而80%以上的比率被定義為「-」。結果示於表2中。

從西他生坦和實例1化合物的結果的比較可以看出：藉由將苯並二氧雜戊環轉化為二氫異苯並呋喃環，時間依賴性抑制作用被降低了。

[表1]

各CYP酶的模型底物和模型底物代謝物

| CYP亞型   | 模型底物   | 底物濃度 (μM) | 模型底物代謝物   |
|---------|--------|-----------|-----------|
| CYP1A2  | 非那西汀   | 50        | 醋胺酚       |
| CYP2C9  | 甲苯磺丁脲  | 500       | 4-羥基甲苯磺丁脲 |
| CYP2C19 | S-美芬妥英 | 200       | 4'-羥基美芬妥英 |
| CYP2D6  | 丁呋洛爾   | 50        | 1'-羥基丁呋洛爾 |
| CYP3A4  | 咪達唑侖   | 30        | 1'-羥基咪達唑侖 |

[表2]

用人肝微粒體和測試物質之預孵育對CYP活性之作用（平均值，n=2）

| 測試物質 | 濃度 (μM) | CYP1A2 | CYP2C9 | CYP2C19 | CYP2D6 | CYP3A4 |
|------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| 西他生坦 | 10      | -      | +      | +       | -      | +      |
|      | 50      | +      | +      | +       | +      | +      |
| 實例1  | 10      | -      | -      | -       | -      | -      |
|      | 50      | -      | -      | -       | -      | +      |

## 方法2

使用西他生坦和實例1化合物研究了基於五種CYP酶（CYP1A2、2C9、2C19、2D6以及3A4）的競爭性抑制作用的抑制能力。

向一含有模型底物溶液的酶溶液（含有人肝微粒體（0.2 mg/mL）、100 mM Kpi以及0.1 mM EDTA）中加入最終濃度為1或10 μM的測試物質，並且在37°C在一NADPH產生系統的存在下孵育10分鐘。加入等量的乙腈與甲醇的混合溶液（1：1，含有0.05 μM右啡烷或0.05 μM普萘洛爾作為內標），以便終止反應，並且藉由LC-MS/MS測量反應溶液中的模型底物的代謝物。表3中示出各CYP酶的模型底物和模型底物代謝物。還在無測試物質加入的情況下執行了一

類似的測試作為對照測試。從在各測試物質濃度下，有和無測試物質加入情況下的模型底物代謝物的量來確定抑制率，並且由該抑制率計算IC<sub>50</sub>值（計算方法係根據外來物（Xenobiotica），1999，29(1)，53-75）。如果IC<sub>50</sub>係1 μM或以下，給出「++」的得分，如果它係1至10 μM，給出「+」的得分，而如果它係大於10 μM，給出「-」的得分。結果示於表4中。

從西他生坦和實例1化合物的結果的比較可以看出：藉由將苯並二氧雜戊環轉化為二氫異苯並呋喃環，抑制能力被削弱了。

[表3]

CYP酶的模型底物和模型底物代謝物

| CYP亞型   | 模型底物   | 底物濃度 (μM) | 模型底物代謝物   |
|---------|--------|-----------|-----------|
| CYP1A2  | 非那西汀   | 10        | 醋胺酚       |
| CYP2C9  | 甲苯磺丁脲  | 100       | 4-羥基甲苯磺丁脲 |
| CYP2C19 | S-美芬妥英 | 40        | 4'-羥基美芬妥英 |
| CYP2D6  | 丁呋洛爾   | 10        | 1'-羥基丁呋洛爾 |
| CYP3A4  | 咪達唑侖   | 3         | 1'-羥基咪達唑侖 |

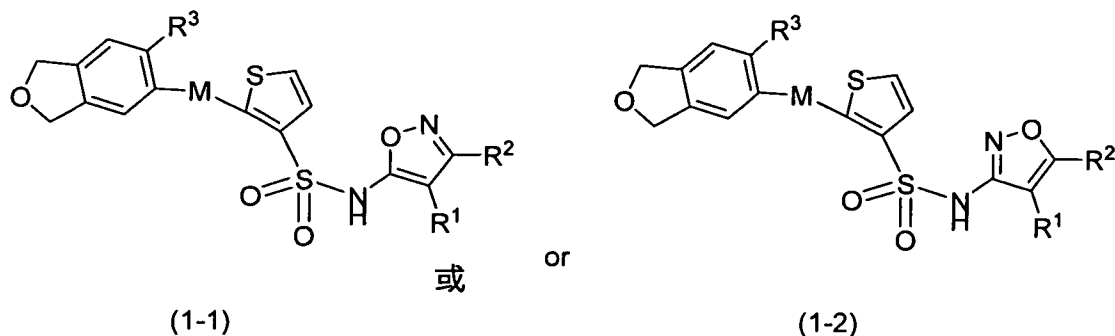
[表4]

測試物質對CYP酶的作用 (n=2)

| 測試物質 | CYP1A2 | CYP2C9 | CYP2C19 | CYP2D6 | CYP3A4 |
|------|--------|--------|---------|--------|--------|
| 西他生坦 | -      | ++     | +       | -      | +      |
| 實例1  | -      | ++     | -       | -      | -      |

# 申請專利範圍

1. 一種由化學式(1-1)或化學式(1-2)代表之化合物，或其藥理學上可接受的鹽：

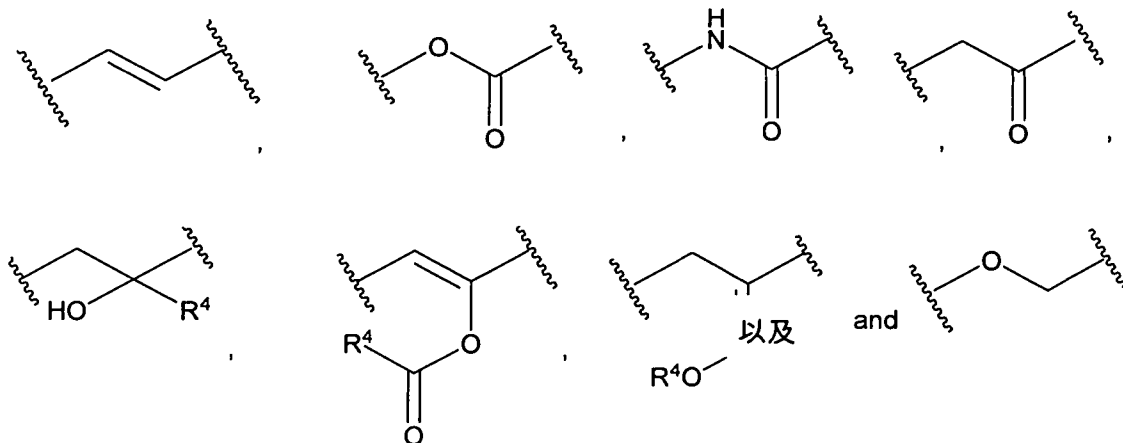


其中 $R^1$ 係一鹵素原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基；

$R^2$ 係一氫原子、甲基、乙基、三氟甲基、五氟乙基、正丙基或環丙基；

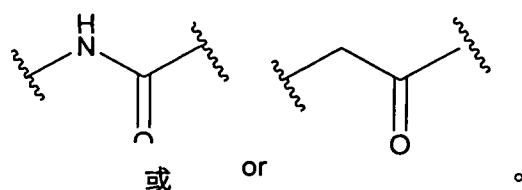
$R^3$ 係一個 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；並且

M係一選自下組的基團，該組由以下各項組成：

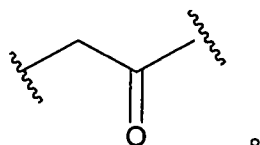


其中 $R^4$ 係一氫原子、甲基或乙基。

2. 如請求項1之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中M係一由以下化學式代表的基團：



3. 如請求項1之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中M係一由以下化學式代表的基團：



4. 如請求項1至3中任一項之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^1$ 係一鹵素原子。
5. 如請求項4之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^1$ 係一氯原子。
6. 如請求項1至5中任一項之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^2$ 係一個甲基。
7. 如請求項1至6中任一項之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^3$ 係一個 $C_{1-6}$ 烷基。
8. 如請求項7之化合物或其藥理學上可接受的鹽，其中 $R^3$ 係一個甲基。
9. 如請求項1至8中任一項之化合物或其藥理學上可接受的鹽，它係一由化學式 (1-1) 代表之化合物。
10. N-(4-氯-3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-2-[2-(6-甲基-1,3-二氫-2-苯並呋喃-5-基)乙醯基]噻吩-3-磺醯胺或其藥理學上可接受的鹽。
11. 一種藥用組合物，包含如請求項1至10中任一項之化合物或其藥理學上可接受的鹽。
12. 如請求項11之藥用組合物，它係一內皮素受體拮抗劑。
13. 如請求項11之藥用組合物，它係用於肺動脈高壓之治療或預防劑。

圖式

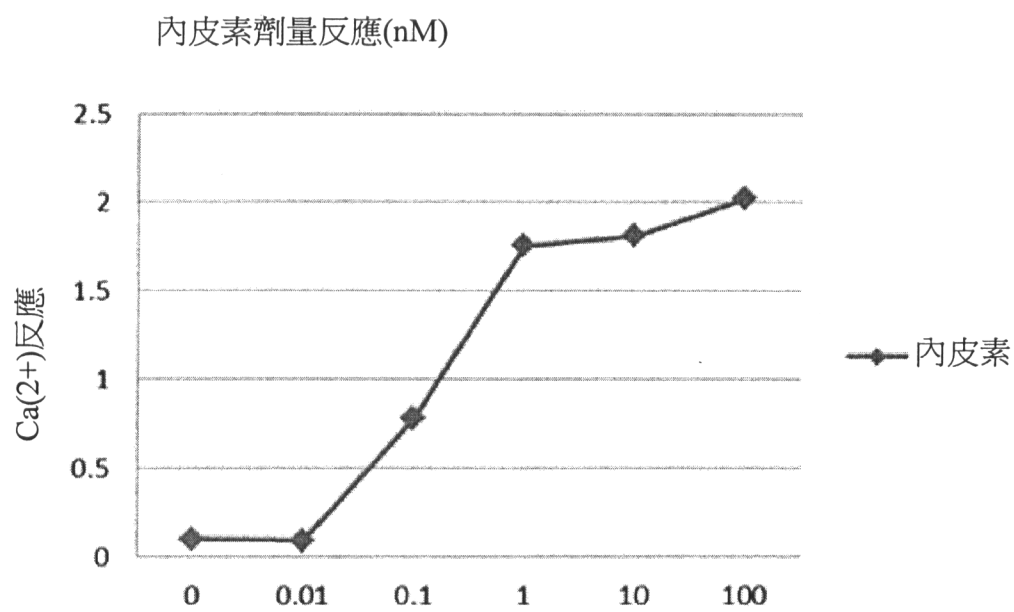


圖 1

西他生坦/內皮素受體 A

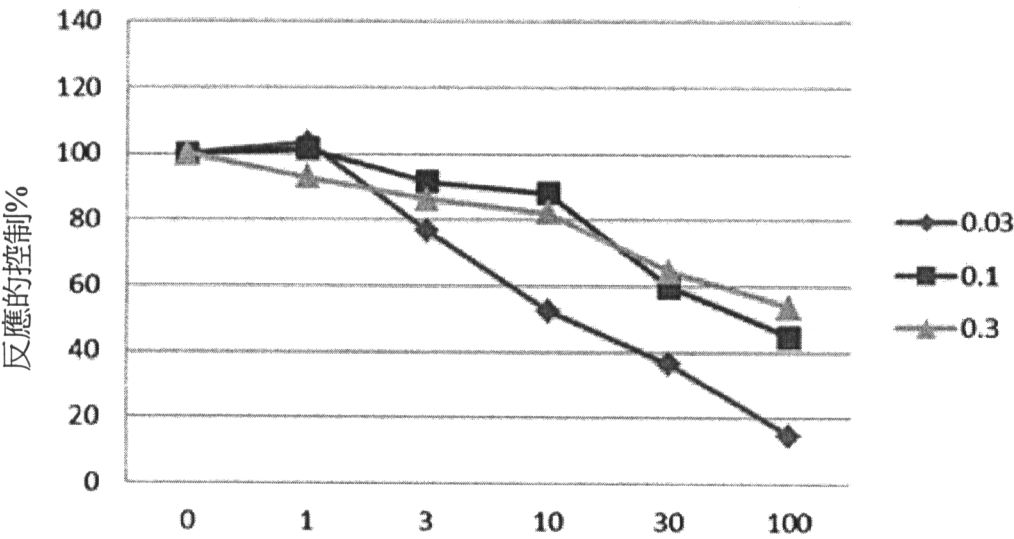


圖 2

實例 1/內皮素受體 A

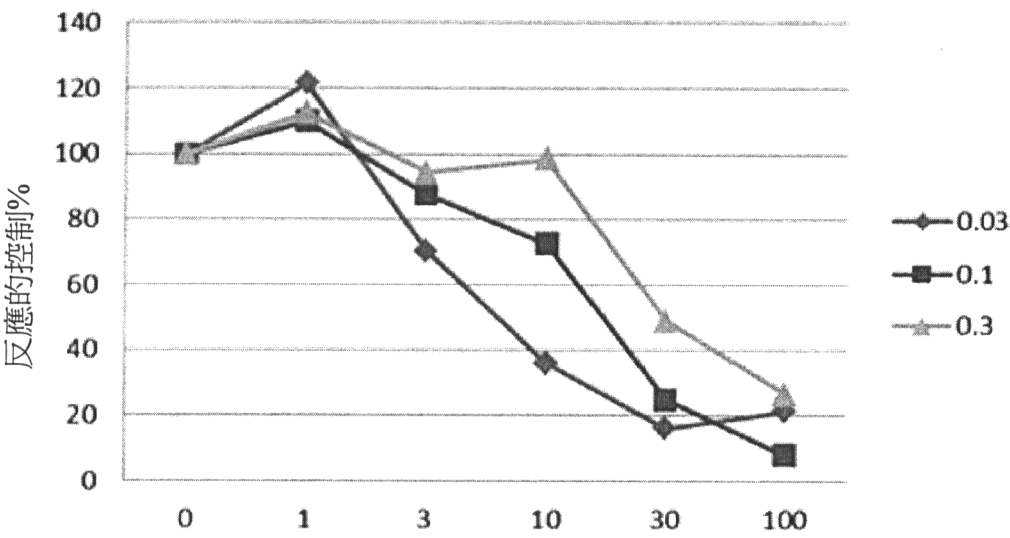


圖 3