



Title	経口投与可能な新規Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain阻害薬の創製とその合成法に関する研究
Author(s)	五井, 敬志
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77589
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

経口投与可能な新規 Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase
Domain 阻害薬の創製とその合成法に関する研究

五井 敬志

大阪大学大学院理学研究科

目次

略語表	1
序論	3
第一節 芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール構造を有する化合物	5
第二節 Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain (HIF-PHD) 阻害薬	7
第三節 5-アミノピラゾロ[4,3- <i>d</i>]ピリミド-7-オンを有する化合物の合成	10
本論	
第一章 多様性指向型効率的合成法開発: 芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール構造を有する化合物の効率的合成法の開発	
第一節 背景	14
第二節 効率的芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの合成: Pd 触媒を用いた C-N カップリング反応の条件最適化	19
第三節 多様な芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールの合成	21
第四節 小括	25
第二章 経口投与可能な新規 HIF-PHD 阻害薬の創製	
第一節 HIF-PHD 阻害活性を有する芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール化合物の取得	26
第二節 構造活性相関研究によるリード化合物取得	27
第三節 経口吸収性向上のための溶解度改善	32
第四節 小括	41
第三章 標的指向型合成法開発: 5-アミノピラゾロ[4,3- <i>d</i>]ピリミド-7-オンの効率的合成法開発と HIF-PHD 阻害薬への応用	
第一節 背景	42
第二節 分子内フリーデルクラフツ型環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3- <i>d</i>]ピリミド-7-オン合成反応の条件最適化	44
第三節 分子内フリーデルクラフツ型反応による 5-アミノピラゾロ[4,3- <i>d</i>]	

ピリミド-7-オン合成と HIF-PHD 阻害薬への応用	46
第四節 小括	49
総括	50
実験項	52
参考文献	83

略語表

本文中に使用した略語・略号を以下に記した。

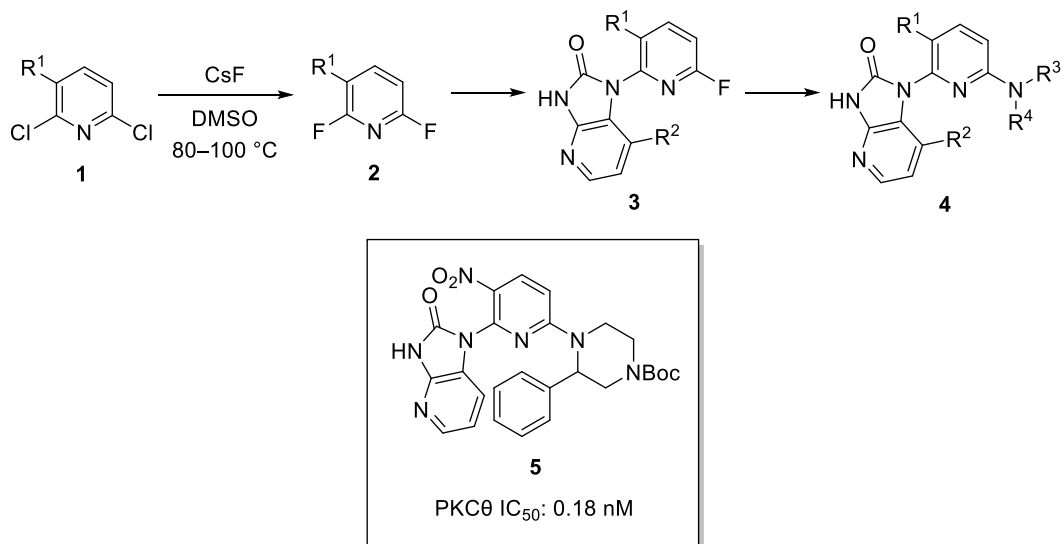
略語・略号	正式名称
Ac	acetyl
AIBN	azobis(isobutyronitrile)
amphos	di- <i>tert</i> -butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine
Arg	arginine
Asp	asparagine
BINAP	2, 2'-bis(diphenylphosphino)-1, 1'-binaphthyl
Bn	benzyl
CDI	<i>N, N'</i> -carbonyldiimidazole
CKD	Chronic Kidney Diseases
DMT1	divalent metal transporter 1
dba	dibenzylideneacetone
dppf	1,1'-ferrocenediyl-bis(diphenylphosphine)
DavePhos	2-dicyclohexylphosphino-2'-(<i>N, N</i> -dimethylamino)biphenyl
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
EPO	erythropoietin
ESA	erythropoiesis stimulating agents
Et	ethyl
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
His	histidine
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HIF-PHD	Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectra
JosiPhos	(2 <i>R</i>)-1-[(1 <i>R</i>)-1-(dicyclohexylphosphino)ethyl]-2-(diphenylphosphino)ferrocene
Me	methyl
Me ₄ 'BuXPhos	(2-di- <i>tert</i> -butylphosphino-3,4,5,6-tetramethyl-2', 4', 6'-triisopropyl-1, 1-biphenyl)

MeOH	methanol
MS	mass spectrometry
Ms	methanesulfonyl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NK1	neurokinin 1
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
PDB	protein data bank
Ph	phenyl
Pd-PEPPSI-IPent	[1, 3-bis(2, 6-di-3-pentylphenyl)imidazol-2-ylidene](3-chloropyridyl) dichloropalladium(II)
<i>i</i> Pr	isopropyl
q	quartet
QOL	quality of life
s	singlet
t	triplet
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TMSCl	trimethylsilyl chloride
TMSI	trimethylsilyl iodide
Tyr	tyrosine
VHL	von Hippel-Lindau protein
WSCl	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
XPhos	2-dicyclohexylphosphino-2', 4', 6'-triisopropylbiphenyl
^t Bu	<i>tert</i> -butyl
^t BuOH	<i>tert</i> -butyl alcohol
^t BuXPhos	2-di- <i>tert</i> -butylphosphino-2', 4', 6'-triisopropylbiphenyl
^t BuBrettPhos	2-di- <i>tert</i> -butylphosphino-3, 6-dimethoxy-2', 4', 6'- triisopropyl-1, 1'-biphenyl

序論

有機合成化学は多様性指向型合成法ならびに標的指向型合成法の開発によって創薬研究の発展に大きな役割を果たしている。

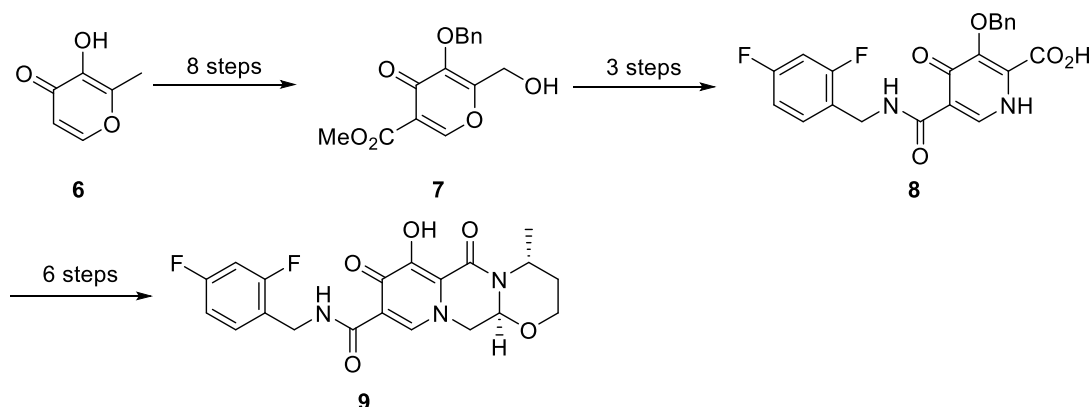
多様性指向型合成法研究は、医薬候補品の探索研究における様々な類縁体の効率的な合成を可能とし、迅速な薬理活性を有する化合物の創製に貢献する。その事例として 2, 3, 6-三置換ピリジン誘導体の簡便合成法開発と PKC θ 阻害薬の合成への応用を挙げる。2, 3, 6-三置換ピリジンは様々な医薬候補化合物に見られる骨格であり、その前駆体である 3 位に置換基を有する 2, 6-ジフルオロピリジン **2** の効率的合成法は重要であることから、入手容易な 2, 6-ジクロロピリジン **1** より **2** を効率的に合成する方法が開発された (Scheme 1)¹。その後、PKC θ 阻害薬として設計した様々な 2, 3, 6-三置換ピリジン誘導体 **4** の迅速合成に **2** の効率的合成法を活用し、強力な PKC θ 阻害薬の取得に成功している (Scheme 1)²。



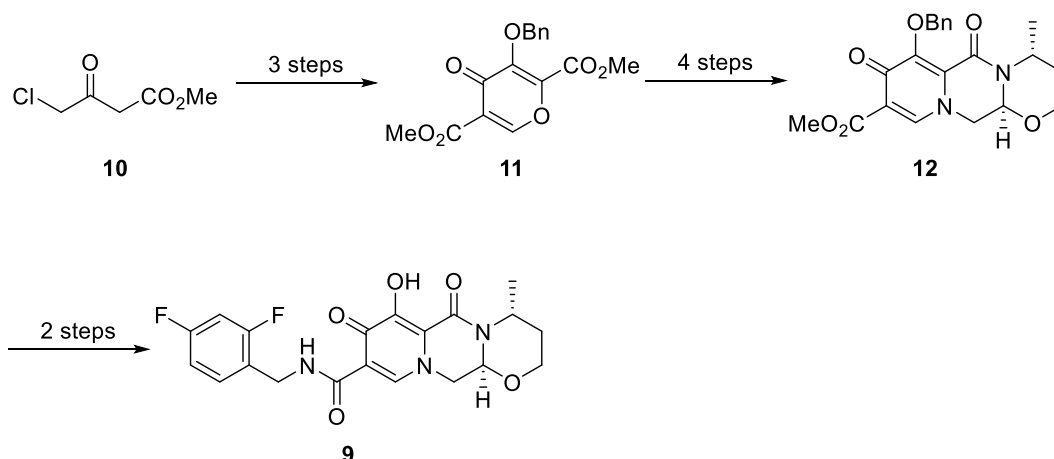
Scheme 1. 3 位に置換基を有する 2, 6-ジフルオロピリジンの合成法とそれを用いた PKC θ 阻害薬の創製

標的指向型合成法開発は、探索研究によって見出した医薬品候補化合物を医薬品とするために必須な工業的合成法の確立に重要である。探索研究の多様性を指向した合成法とは異なり、工業的合成は 1 つの化合物を高収率、短工程で効率的に合成することに主眼を置き設計される。HIV-1 インテグラーゼ阻害薬ドルテグラビル **9** を事例として挙げる。探索研究における **9** の合成は、**8** を共通中間体とした様々な三環性部分を持った誘導体の合成に適した多様性指向型合成法により、**6** を出発原料として 17 工程、総収率 2% で合成されている (Scheme 2)³。標的指向型合成法として標的とする **9** の三環部分 **12** を入手容易なケ

トエステル **10** より効率的に合成することを主眼に置いた方法が開発され (Scheme 3)⁴、9 工程、総収率 22%で **9** の合成を達成している。



Scheme 2. ドルテグラビル **9** の多様性指向型合成法



Scheme 3. ドルテグラビル **9** の標的指向型合成法

以上のように、多様性指向型合成法が医薬候補品の探索研究に、標的指向型合成法開発が医薬候補品の工業的合成法確立に大きく寄与している。本研究において私は創薬研究に用いられている芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **15** を効率的に合成する方法が無いことに着目し、医薬候補品の探索研究に貢献する多様性指向型合成法として Pd 触媒を用いた C-N カップリングによる芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの効率的合成法を確立した (Figure 1-1)。続いて医療現場から求められている経口投与可能な HIF-PHD 阻害薬として設計した芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの合成に本方法を活用し、医薬品候補化合物 **16** を見出すことに成功した。次に **16** の工業的合成法確立への貢献のために、標的指向型合成法開発として、分子内フリーデルクラフツ型環化反応による 5-アミノピラズロ[4,3-*d*]ピリ

ミド-7-オンの効率的合成法を見出した(Figure 1-2)。

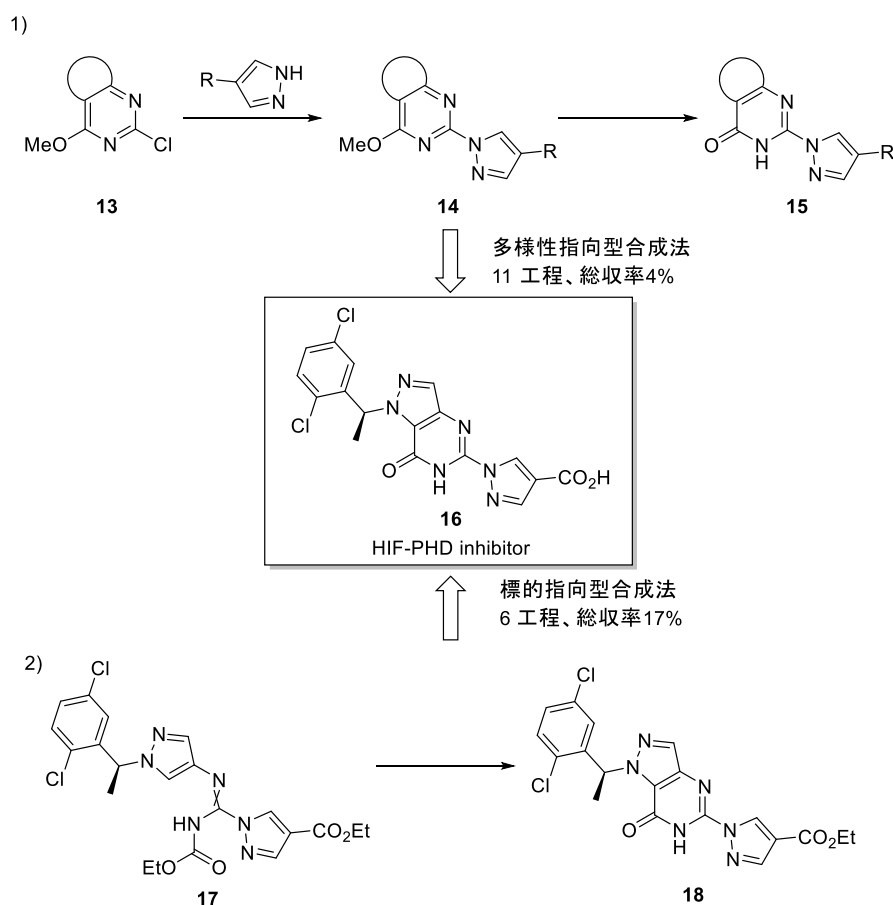


Figure 1. 本研究の概要

第一節 芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール構造を有する化合物

ピラゾールは天然に存在しない複素環式芳香族 5 員環化合物であり、窒素原子を 2 つ有するため分子全体の脂溶性を下げる事が可能なことに加え、窒素原子を有するにも関わらず塩基性を持たないことが特徴である。また、2-ピリミドン-ピラゾールは酸性プロトンを持つ芳香族様 6 員環構造である。以上のような物性面での特徴を利用するために、芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **15** は多くの創薬研究、農薬研究に用いられており、抗癌活性^{5,6}、疼痛活性⁷、抗菌活性^{8,9}などの生物活性が報告されている (Figure 2)。また、 Zn^{2+} , Cu^{2+} のような金属イオンが配位可能であるため¹⁰、薬理活性化合物として、鉄イオントランスポーター (DMT1) 阻害活性を有する化合物に応用されており (Figure 3)¹¹、**15** の同様の応用が期待される。

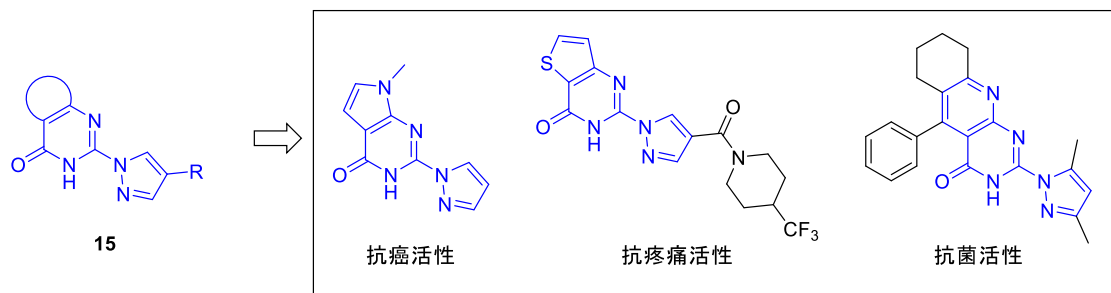


Figure 2. 生物活性を有する芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール化合物

創薬、農薬研究における重要性が高まりつつあるピリミドン-ピラゾールの合成法は大別して3つ報告されている (Scheme 4)。クロロピリミドン **19** に対し、ピラゾール **20** の求核置換反応により C-N 結合を形成させる方法 (Scheme 4-1)^{5,7}、**19** より誘導可能なヒドラジン **22** に対しジアルデヒド **23** を作用させピラゾール環を構築する方法 (Scheme 4-2)¹²、グアニジン **24** に対しケトエステル **25** を作用させ、ピリミドン形成する方法 (Scheme 4-3)¹³ が代表例として挙げられる。しかし、Scheme 4-1 はピリミドンの低反応性により収率が低いこと、Scheme 4-2 では **22** の合成の際に使用するヒドラジンを許容する構造にのみ適用可能であること、**23** はピラゾール **20** よりも汎用性が劣ること、Scheme 4-3 に示すケトエステル **25** を用いた方法では縮環ピリミドンの合成が不可能であることから汎用性に乏しい。以上の背景より、様々な芳香族縮環ピリミドンとピラゾールの組み合わせを効率的に合成可能となれば創薬における探索研究を円滑に進める点で有用であり、医薬品創製に貢献すると考えられる。第一章では芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの効率的合成法の開発について述べる。また、第二章では設計した Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain (HIF-PHD) 阻害薬の合成に応用することにより、その有用性を実証した。

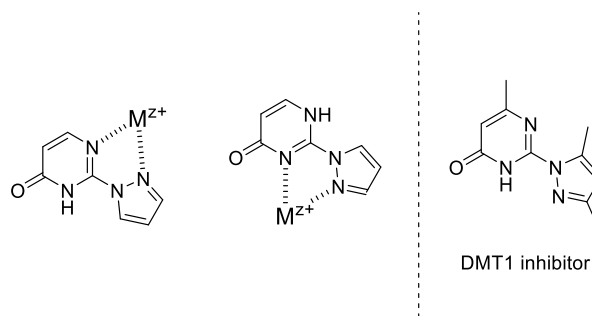
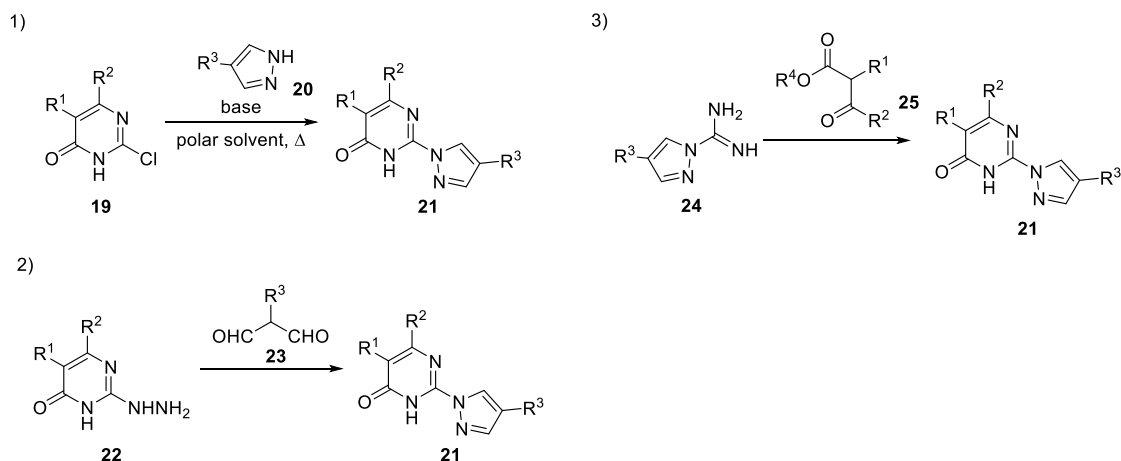


Figure 3. 金属イオン(M^{Z+})の配位様式と配位を利用したピリミドン-ピラゾール構造の薬理活性化合物への応用



Scheme 4. ピリミドン-ピラゾールの代表的な合成方法

第二節 Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain (HIF-PHD) 阻害薬

腎性貧血は慢性腎臓病 (Chronic Kidney Diseases: CKD) のような腎機能低下が起こる疾患に伴う様々な合併症の1つであり、患者の Quality of Life (QOL) を大きく低下させている。発症の原因は腎機能低下により赤血球造成に重要な役割を果たすエリスロポエチン (Erythropoietin: EPO) 産生が低下することである¹⁴。通常の貧血では、血液中酸素濃度が低下すると腎臓において低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor: HIF) を介した EPO 遺伝子転写活性化によって産生誘導された EPO が骨髄に存在する赤血球産生細胞に作用し造血が起こるが、腎性貧血では機能低下により腎臓における EPO 産生システムが障害された状態となっているため低酸素状態でも EPO 産生が亢進しない。さらには、腎性貧血による低酸素状態が CKD の進行を促進し、お互いがそれぞれの症状を進行させるという負のサイクルが存在する。以上より、CKD における腎性貧血の治療は特に重要とされている。

古くから腎性貧血の治療として鉄剤の投与が行われてきたが効果が低い。現在は

erythropoiesis stimulating agents (ESA)¹⁵と総称される遺伝子組み換え EPO 製剤による EPO 補充療法が有効であるが、静脈もしくは皮下注射による利便性、EPO 低反応性による効果減弱が問題点として挙げられる。また、生物製剤高薬価であるため医療経済上大きな問題となっている。以上の理由より EPO 低反応性を生じること無く、経口投与可能な低分子治療薬が求められている。

HIF-PHD は 2019 年ノーベル生理学・医学賞が贈られたことから広く知られるようになった低酸素応答の仕組みに関わる酵素であり、低酸素依存的に EPO 産生を誘導するタンパク質 HIF α の機能を制御している (Figure 4)。通常酸素濃度下では、HIF-PHD は HIF α を基質とし、二価鉄イオン、酸素、2-オキシグルタル酸を利用して HIF α の 2 つのプロリン残基を水酸化する (Figure 5)。さらに水酸化された HIF α は von Hippel-Lindau protein (VHL) によるユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解される。一方、低酸素濃度下では HIF-PHD の活性が低下することにより HIF α は分解を受けず、核内へと移動した後に EPO 遺伝子転写活性化が起こる^{16,17}。従って、HIF-PHD を阻害することにより、EPO 産生増強による貧血改善が期待できる。そこで私は腎性貧血治療の問題解決のために低分子 HIF-PHD 阻害薬の創製に取り組んだ。また、HIF-PHD は低酸素応答に関わる疾患の発症に関与していると言われており、阻害薬創製によりそのメカニズム解明や治療薬開発にも貢献できると考えられる。

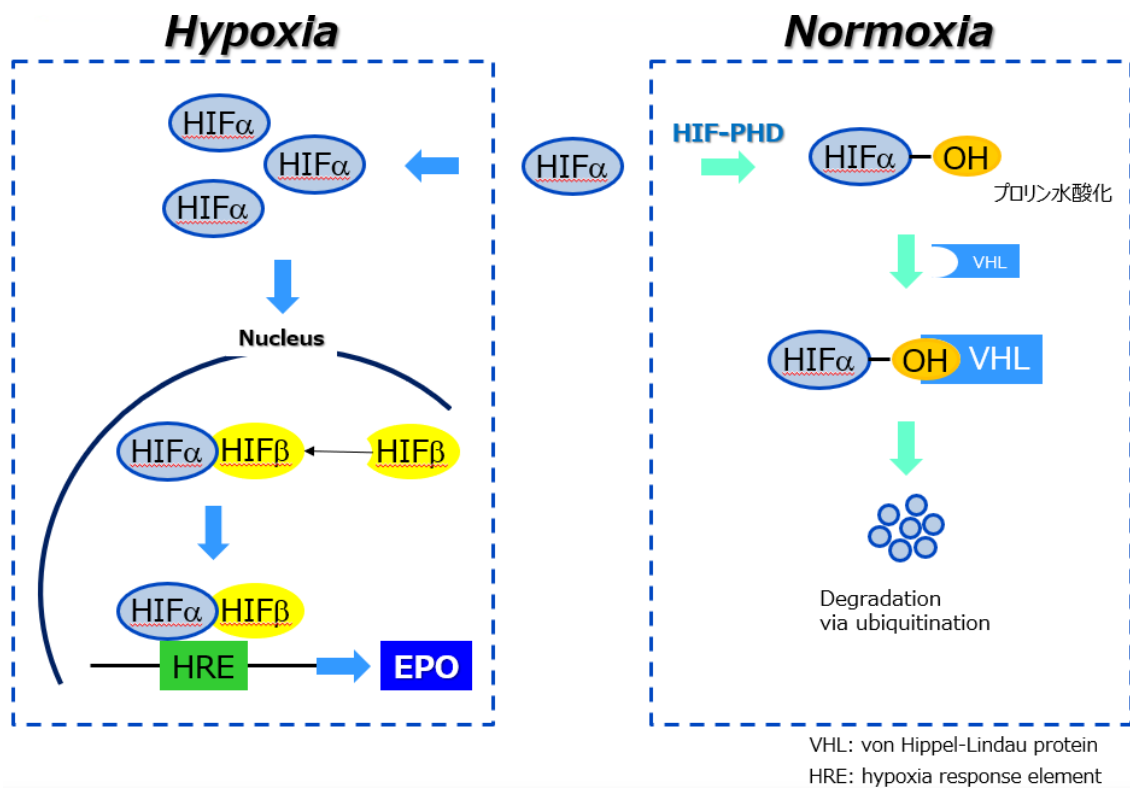


Figure 4. HIF-PHD による EPO 産生制御の仕組み

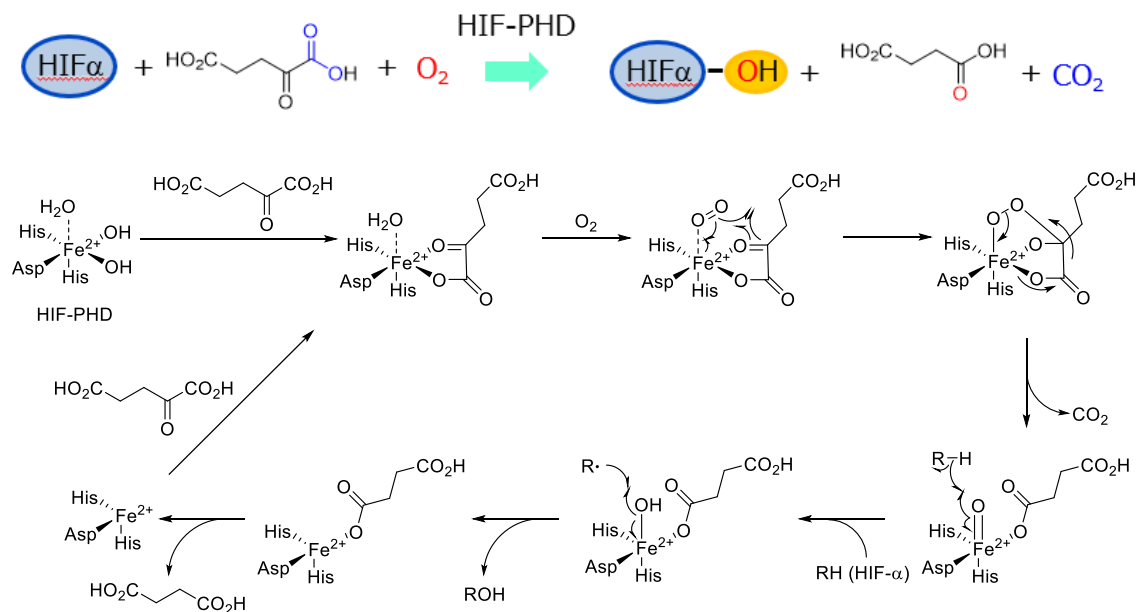


Figure 5. HIF-PHD による HIF- α のプロリン水酸化反応機構

現在では様々な低分子 HIF-PHD 阻害薬の臨床試験が進められていることからその注目度の高さが伺われ、本研究を実施中にアステラス製薬株式会社は Roxadustat を本邦で世界初の HIF-PHD 阻害薬として上市した (Figure 6)¹⁸⁻²³。

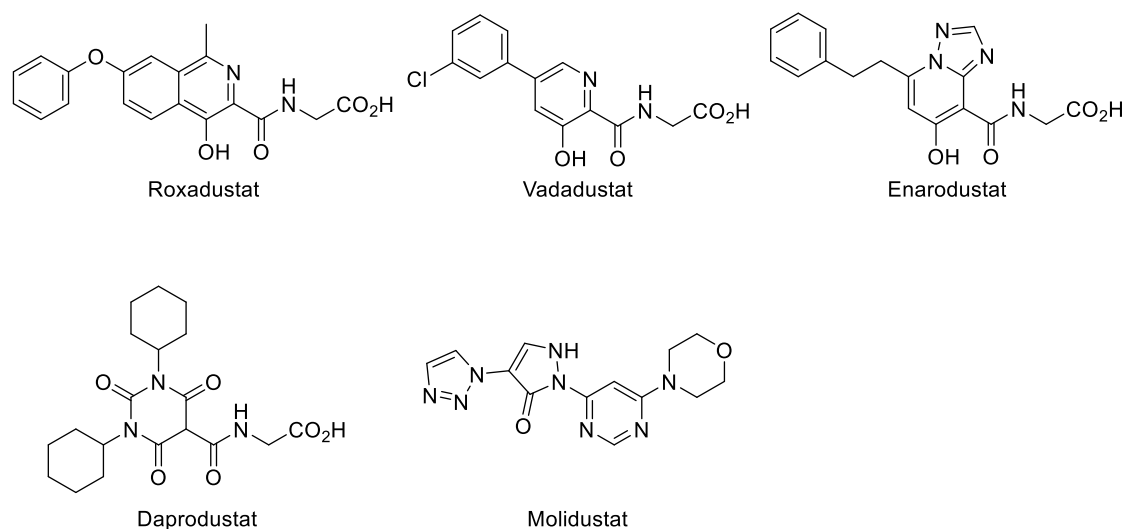


Figure 6. 代表的な HIF-PHD 阻害薬

報告されている HIF-PHD2 と阻害薬の X 線結晶構造と Structure-Based Drug Design により芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールが HIF-PHD 阻害薬となり得ると私は考えた。そこで私は多様性指向型芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール合成法を活用し、Roxadustat よりも優れた HIF-PHD 阻害薬を見出すことを目的として創薬研究に着手することとした。その詳細を第二章で述べる。

第三節 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを有する化合物の合成

第二章では、芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール構造を有する HIF-PHD 阻害薬 **16** を創製した。そこでは、C-N カップリング反応を鍵段階とする多様性指向型合成により、様々な HIF-PHD 阻害剤を合成し、構造活性相関研究を行って **16** に導いた。次に **16** が医薬品として医療に貢献するためには工業的合成法が必要である。一般に、活性化化合物の探索においては、多様な化合物を系統的に合成できる多様性指向型合成の利用が有利であるが、多様性指向型合成は、特定の標的化合物の合成には必ずしも最適ではなく、工業的合成には全収率を向上させるための標的指向型合成経路を設定する必要がある。実際に私が用いた合成法は二環性ピリミドン、ベンジル側鎖の多様性を考えた合成法であること、ピラゾールの *N*-ベンジル化に選択性がないことが理由で工程数が多く、総収率が低い(11 工程、全

収率 4%)ことから、工業的合成は困難であると考えられる。そこで標的指向型合成による HIF-PHD 阻害薬 **16** の合成について検討した。

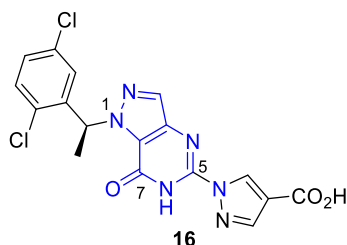
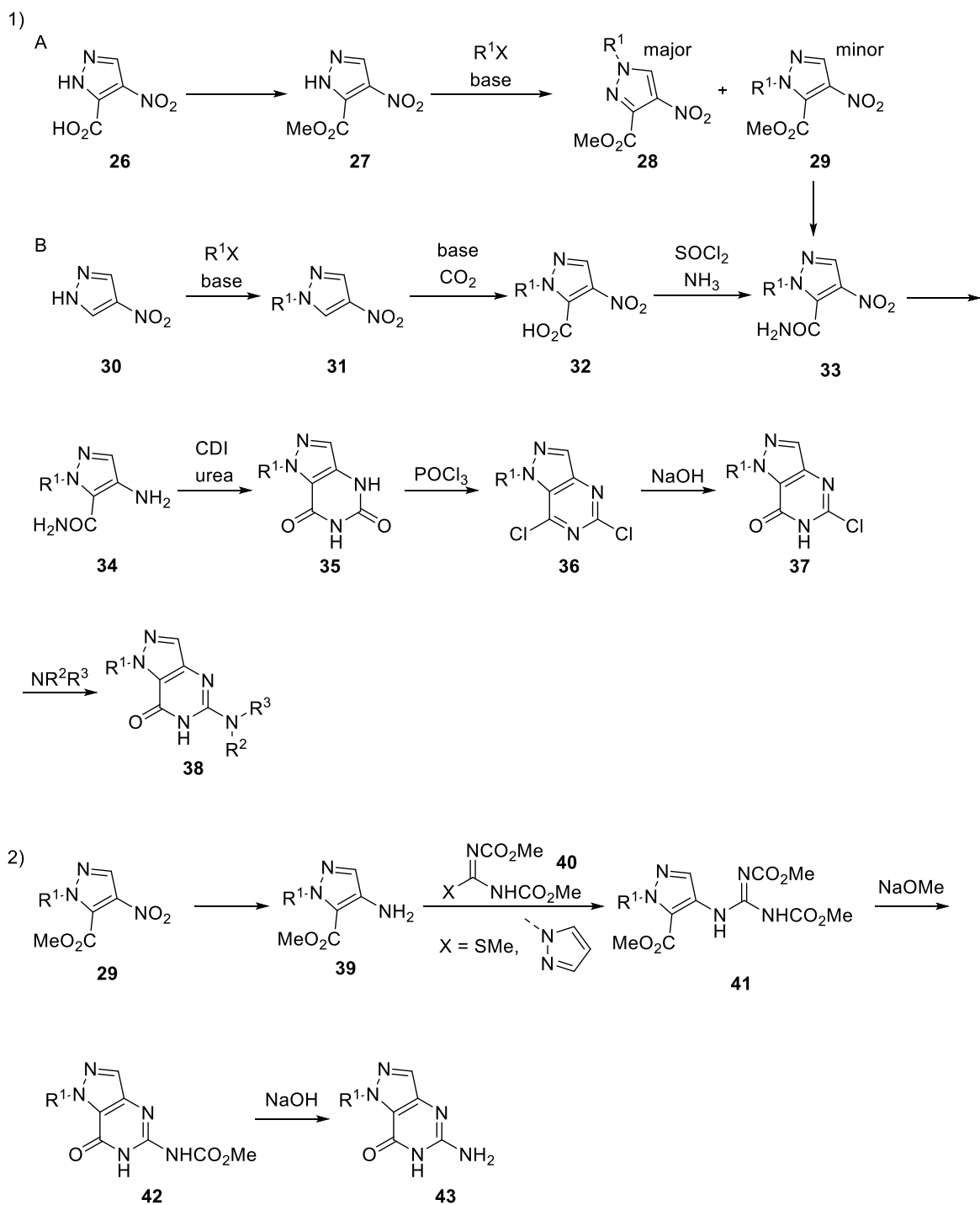
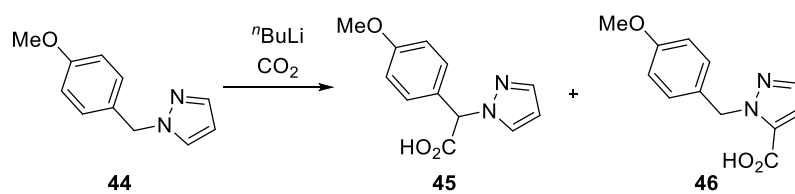


Figure 7. 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを有する HIF-PHD 阻害薬

HIF-PHD 阻害薬 **16** が有する 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン構造は、炭素、窒素、酸素に置換基を導入した様々な置換様式を取ることが可能であることから創薬研究に用いられる構造であり²⁴⁻²⁸、1 位に置換基を有する 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成法がいくつか報告されている (Scheme 5)。最もよく用いられる方法は、ピラゾール **34** に対しウレアもしくは CDI を反応させ、ジヒドロピリミジンジオン環を構築し、続いてクロロ化、7 位加水分解、5 位へのアミノ基導入により合成する方法である^{26,27}。しかし **34** を市販のピラゾール **26** から誘導する汎用法は、**27** に対する *N*-アルキル化はエステル基との立体障害により、2-*N* に優先的に進行し、目的物 **29** はマイナー生成物であることが多いこと点に課題がある (Scheme 5-1A)^{29,30}。ピラゾールの 1-*N* 選択的にアルキル基を導入したピラゾールを得るために、4-ニトロピラゾール **30** を出発物質として *N*-アルキル化の後にカルボキシル基を導入する方法が知られている (Scheme 5-1B)²⁷。しかし、^{*t*}BuLi や LDA のような塩基を用いた *N*-ベンジルピラゾール誘導体 **44** のカルボキシル基導入において、ベンゼン環の共鳴効果により速度論的にベンジル位に、熱力学的にピラゾール 5 位にアニオンが生じ、**45** と **46** が生成することが報告されていることから (Scheme 6)³¹、**16** のような R¹ の不斉ベンジル炭素はエピ化する可能性がある。もう 1 つの方法はピラゾール **39** と **40** より調製したグアニジン **41** の分子内環化反応により、ピリミドン環を形成する方法である (Scheme 5-2)²⁸。本方法も Scheme 5-1A と同様の理由でピラゾール **29** を高収率で得ることができない点に課題がある。以上より、1 位に置換基を有する 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの効率的合成法開発は創薬化学やプロセス化学に貢献する点で重要であると考えられ、**16** の標的指向型反応開発に取り組むこととした。詳細は第三章で述べる。



Scheme 5. 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの既知合成法

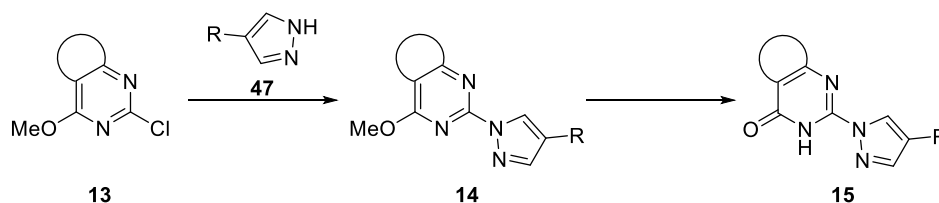


Scheme 6. *N*-ベンジルピラゾールへのカルボキシル基導入

第一章 多様性指向型効率的合成法開発: 芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール構造を有する化合物の効率的合成法の開発

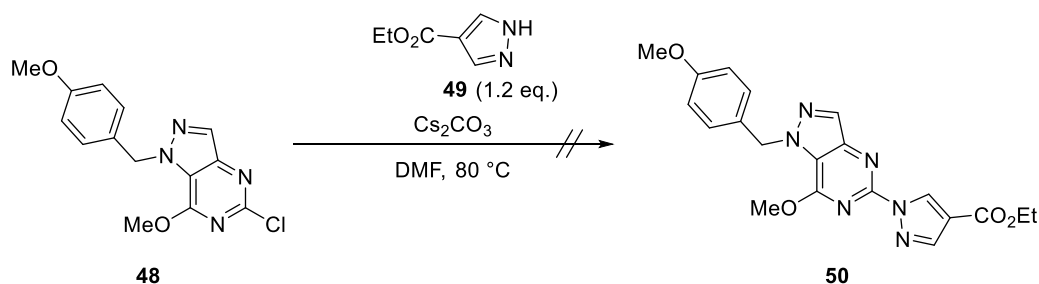
第一節 背景

序論第一節にピリミドン-ピラゾールの代表的な合成法を示した。汎用されている方法は2-クロロ-4-ピリミドンとピラゾールの求核置換反応であるが、2-クロロ-4-メトキシピリミジンは2-クロロ-4-ピリミドンよりも求核置換反応に対する反応性が高く、収率よく目的物を得られること³²、様々な芳香族縮環ピリミジン **13** の合成法が報告されており、容易に調製可能であることから2-クロロ-4-メトキシピリミジンを2-クロロ-4-ピリミドンユニットとして用いることにした。また、種々のピラゾール **47** が市販されていることより、ピリミドン-ピラゾールの代表的合成法の1つであるC-N結合形成反応が様々な芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **15** の効率的合成に適した方法であると考えた (Scheme 7)。



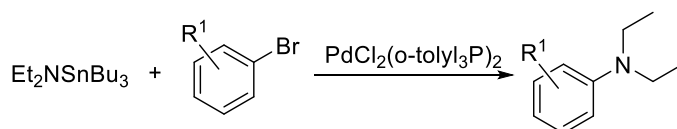
Scheme 7. C-N 結合形成反応による芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **1** の合成

実際に一般的なC-N結合形成法である求核置換反応によりピラゾロピリミジン **48**³³ にピラゾールを導入した **50** の合成を試みたが目的物は得られなかった。その理由は反応条件下で **48** のメトキシ基が加水分解されピリミドンとなり、そのピリミドンは反応性が低いため反応が進行しなかったためである (Scheme 8)。この結果は **48** の求核置換反応に対する反応性が5位よりも7位の方が高いことを示しており、求核置換反応による5位へのピラゾール導入は困難であると考えられた。そこで求核置換反応以外の代表的なC-N結合形成方法であるPd触媒ならびにジアルキルビアリールホスフィンを用いたカップリング反応により高い収率で様々な芳香族縮環ピリミジン-ピラゾール **14** を得ることとした。



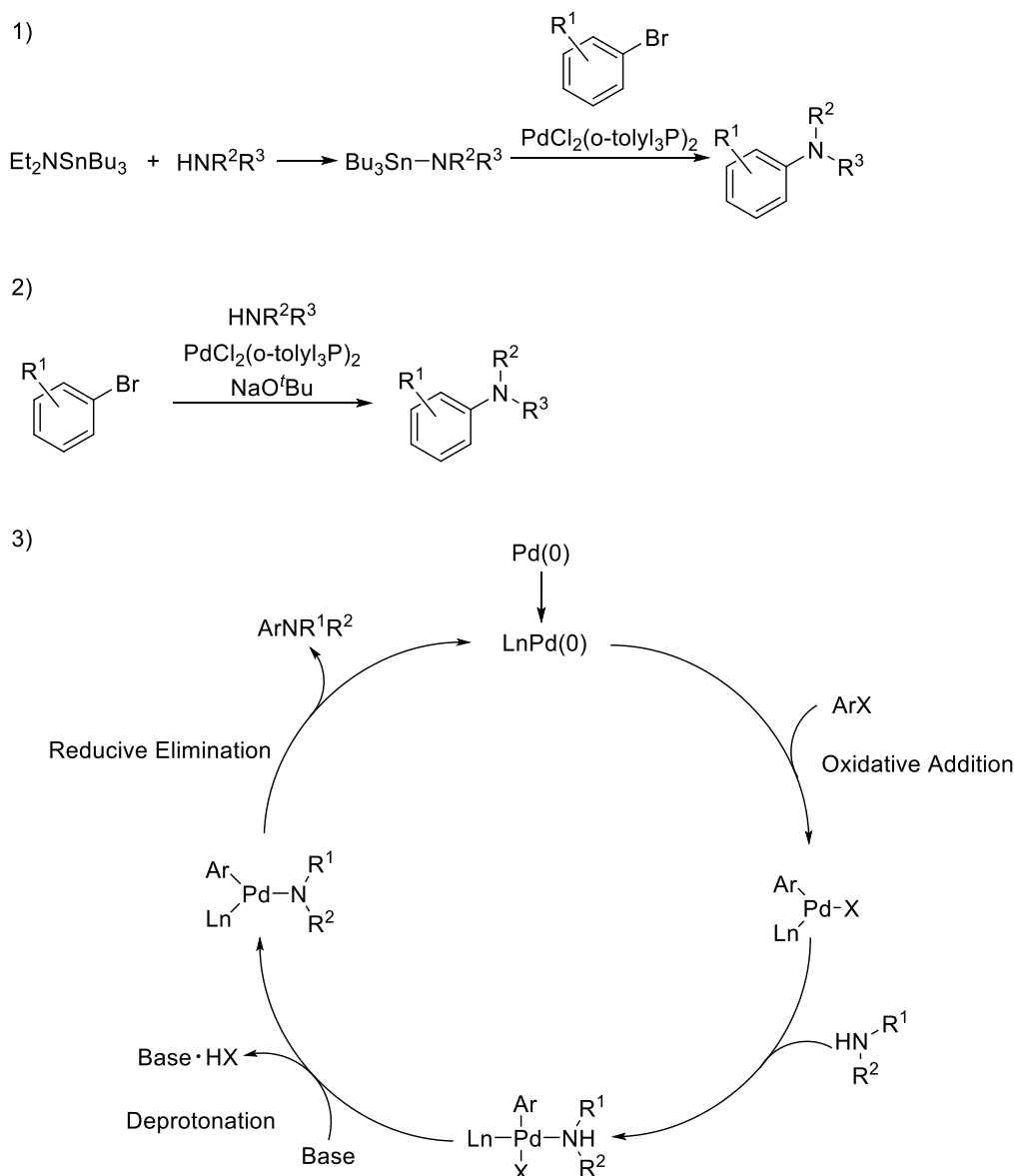
Scheme 8. 芳香族求核置換反応によるピラゾロピリミジンへのピラゾール導入

Pd触媒を用いたC-Nカップリング反応は1983年に右田、小杉らにより第一報が報告された³⁴。PdCl₂(o-tolyl₃P)₂を触媒に用いた*N*, *N*-ジエチルアミノトリブチルスズとアリールブロミドより*N*, *N*-ジエチルアニリン誘導体を合成する反応である (Scheme 9)。しかし、種々のアミノスズ化合物が不安定であり、アリールアミンの一般的な合成法としては実用性に欠けていた。



Scheme 9. 右田らによるPd触媒を用いたC-Nカップリング反応

そこで、Buchwaldら、Hartwigらによりアミノトリブチルスズをin situで生成させるPd触媒によるC-Nカップリング反応が報告され、様々なアリールブロミドとアミンやアニリンよりアリールアミンが合成可能となった (Scheme 10-1)^{35,36}。また、さらに研究が進められ、スズ試薬を用いない反応条件が見出され、反応機構が提唱されている (Scheme 10-2, 10-3)^{37,38}。LnPd(活性種はL₁Pd(0)と考えられている)にアリールハライドが酸化的付加して生成したPd種にアミンが付加し、塩基による脱プロトン化を経て還元的脱離により、アリールアミンが生成するとともにLnPd(0)が再生すると考えられている。

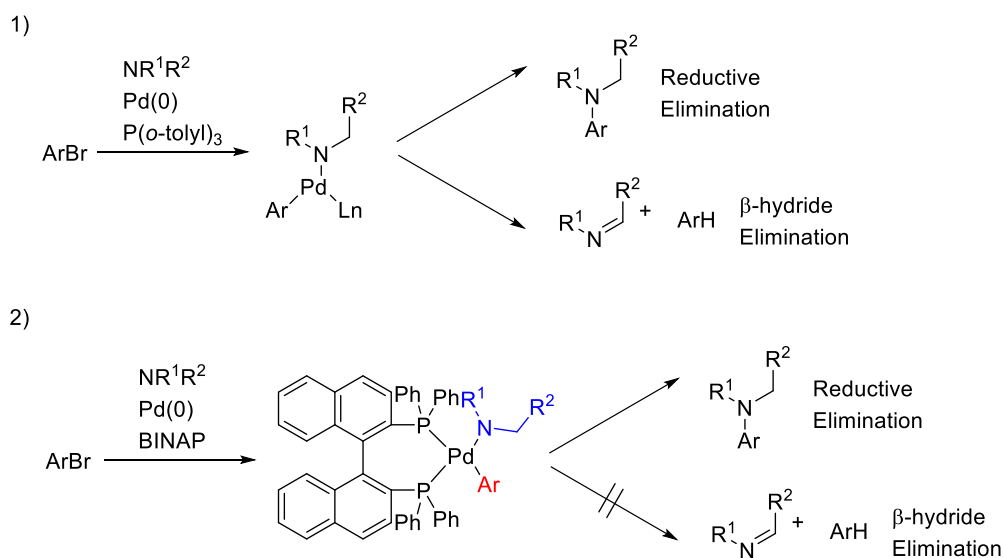


Scheme 10. Pd触媒によるC-Nカップリング反応

Scheme 9, 10で示したようにカップリング反応の配位子としてP(*o*-tolyl)₃が用いられてきたが、還元的脱離の際にβ-ヒドリド脱離と競合し、用いたアリールブロミドの脱ハロゲン体が副生することが問題であった (Scheme 11-1)。これを解決するために、Arとアミンがcisに配向した配座に固定され還元的脱離が促進されるように設計された二座配位子BINAP³⁹やdppf⁴⁰が見出され (Scheme 11-2)、様々なアリールブロミドとアミンより高収率でアリールアミンが合成可能な反応となった。次にアリールクロライドとアミンのC-Nカップリングが研究された。BINAP、dppfを用いたC-Nカップリング反応では、律速段階であった酸化的付加が起りやすいアリールブロミドに適用されてきた。そこで酸化的付加を促進す

るためにBINAPやdppfと比較してPd触媒に配位するリン原子の電子密度を高めた二座ホスフィン配位子が設計され、Hartwigらによるフェロセン配位子JosiPhos⁴¹、Buchwaldらによるジアルキルビアリールホスフィン配位子DavePhos⁴²が開発された。これらを用いることでアリールクロリドとアミンのカップリング反応において高収率で種々のアリールアミンを得ることが可能となった。なお、Davephosはリン原子を1つしか持たないが、Pd中心が2'位の窒素原子に配位しBINAPと同様に還元的脱離が促進する配座を取る (Figure 8-2)。

XPhosは2', 6'位に嵩高い^tPr基を配置し、2つのベンゼン環の二面角を大きくすることでシクロメタル化を防ぐとともに活性種であるL₁Pd(0)を安定化させ (Figure 8-3)、さらに反応性の低いアリールトリシラートを使用できることが報告されている⁴³。その後も、Buchwaldらによって置換基の電子的効果、立体的効果によりチューニングされた配位子が開発されている。例えば、XPhosのシクロヘキシル基を^{tert}-ブチル基に変換しリン原子の電子密度を高め酸化的付加能を向上させた^tBuXPhos⁴⁴、3位に導入したメトキシ基の立体障害を利用して還元的脱離を促進する配座を取るBrettPhos⁴⁵が挙げられ (Figure 8-4)、現在では適切な配位子の選択により様々なアリールハライドとアミンやアニリン、アミドのカップリング反応が可能となっている。



Scheme 11. 還元的脱離とβ-ヒドリド脱離の競合

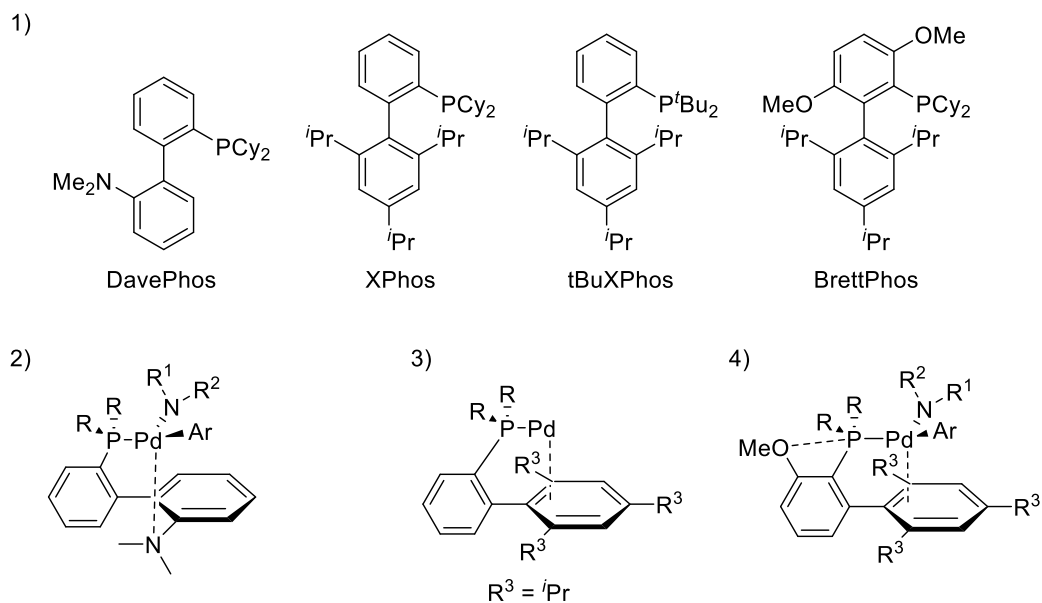
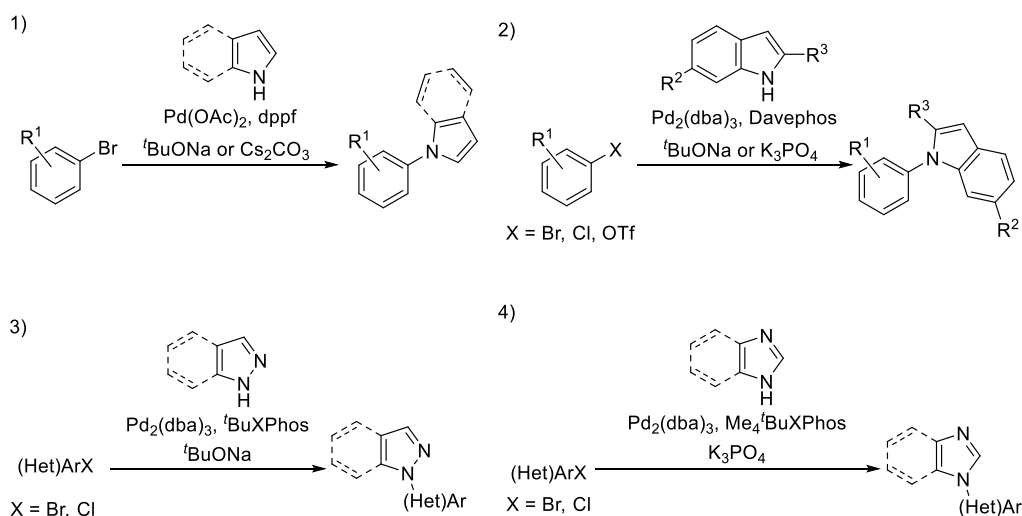


Figure 8. ジアルキルピアリールホスフィン配位子

Pd触媒とホスフィン配位子によるアリールハライドとアゾール類のC-N(sp²)カップリング反応は、Hartwigらによるdppfを配位子に用いたピロールやインドールのC-Nカップリングが第一報であった (Scheme 12-1)⁴⁶。続いて、DavePhosを用いた2位もしくは7位に置換基を有するインドールのアリール化がBuchwaldらにより報告された (Scheme 12-2)⁴⁷。次にさらに酸性度の高いピラゾール、インダゾールを用いたカップリング反応がBuchwaldらによって報告されている (Scheme 12-3, Scheme 12-4)⁴⁴。以上のように適した配位子を選択することにより、アリールハライドとアゾールのC-N(sp²)カップリング反応が可能である。



Scheme 12. アゾールのC-Nカップリング反応

一般的に強塩基がC-Nカップリング反応を促進させるため⁴⁸ ^tBuONaが塩基として汎用されてきた。エステルやケトンのような塩基性に不安定な官能基が存在する基質の場合、炭酸セシウムやリン酸カリウムが用いられる⁴⁸。

ピラゾールのC-Nカップリング反応についてはBuchwaldらにより初めて達成されている (Scheme 12-3)。しかし、**48**のような非常に塩基性に不安定な芳香族縮環ピリミジンに対してピラゾールのカップリング反応が行われた報告は無い。そこで、多様な芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールの合成が可能なPd触媒によるC-Nカップリング反応の開発に着手することとした。

第二節 効率的芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの合成: Pd触媒を用いたC-Nカップリング反応の条件最適化

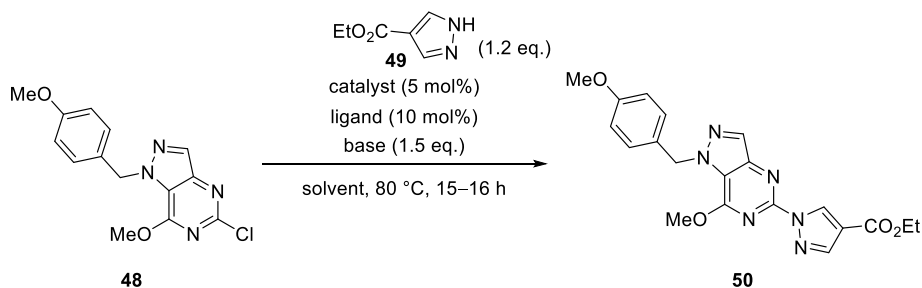
ピラゾロピリミジン**48**とピラゾール**49**によるPdカップリング反応を用い反応条件の最適化を行った (Table 1)。まず、Pd触媒としてトリス(ジベンジリデン)ジパラジウム(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$)、Buchwaldらにより報告されているジアルキルビアリアルホスフィン配位子XPhosを用いた。塩基としては**48**の加水分解を抑制する目的でリン酸カリウムを用い、溶媒について種々検討した (entry 1–3)。カップリング反応に汎用される溶媒としてトルエン、dioxane、^tBuOHを検討した結果、トルエンではリン酸カリウムが溶解しないため反応がほとんど進行しなかった。一方でdioxane、^tBuOHを用いた際に10%程度と低収率であるが目的のカップリング体**50**が得られた。この際にメトキシ基の加水分解を受けた生成物は見られなかった。しかし大部分の**48**が残存していることから、低収率の原因は酸化的付

加が進行していないと考え配位子を検討することとした。

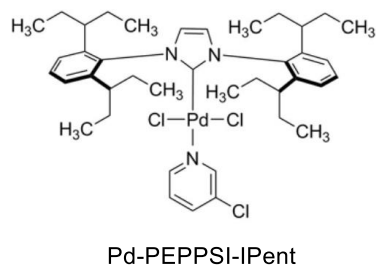
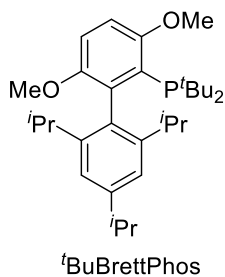
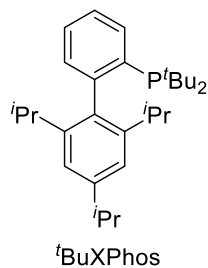
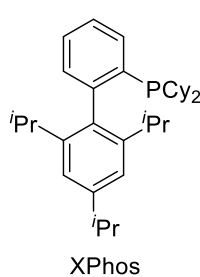
リン原子上の電子密度を上げ、酸化的付加を促進するために、リン原子の置換基に *t*-Bu 基を持つ *t*-BuXPhos を配位子として用い、先の検討で同等の結果が得られたジオキサン、*t*-BuOH を溶媒としたところ、収率が劇的に改善し高収率 (75%, 80%) で **50** を得ることに成功した (entry 4, 5)。*t*-Bu 基をリン原子の置換基として持つ他のジアルキルビアリールホスフィン配位子を用いた検討を行った。*Me*₄*t*-BuXPhos⁴⁹ では収率 25% と予想外に低収率に留まったが (entry 6)、*t*-BuBrettPhos⁵⁰ では収率 69% となり、*t*-BuXPhos と同等の結果が得られた (entry 7)。古くから配位子として知られている *rac*-BINAP、dppf では **48** が多く残存し低収率 (13%) となった。次にカップリング反応において塩基として汎用される *t*-BuONa、Cs₂CO₃ を用いたところ、塩基性の強さに応じて **48** が加水分解され、低収率であった (entry 10, 11)。Pd 触媒として Organ らによって開発され、酸化的付加を促進すると報告されている Pd-PEPPSI-IPent⁵¹ を用いた検討を行ったが、塩基にリン酸カリウムを用いているため反応が進行しにくく、**48** が残存し低収率 (13%, 7%) であった (entry 12, 13)。以上より entry 4, 5 の反応条件が最適条件であることを見出した。

以上の反応条件最適化において、一般的に entry 2, 3 の XPhos を用いた条件はアリールクロリドで酸化的付加が進行する条件にも関わらず、クロロピラゾロピリミジン **48** は酸化的付加が進行しにくかったことより、**48** の方がアリールクロリドよりも酸化的付加が進行しにくいと考えられる。また、ピラゾールはアミンやアニリンと比較してプロトンの酸性度が高いため、80°C、弱塩基であるリン酸カリウムという条件で反応機構における脱プロトン化が進行したと考えている。

Table 1. カップリング反応条件最適化



entry	catalyst	ligand	base	solvent	yield (%)	
1	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	K ₃ PO ₄	toluene	trace	
2				dioxane	<10	
3				^t BuOH	13	
4		^t BuXPhos		^t BuOH	75	
5		Me ₄ ^t BuXPhos		dioxane	80	
6				^t BuOH	25	
7					69	
8					13	
9					13	
10		^t BuXPhos	^t BuONa		0	
11					Cs ₂ CO ₃	22
12	Pd-PEPSSI-			K ₃ PO ₄	DME	13
13	IPent			dioxane	7	

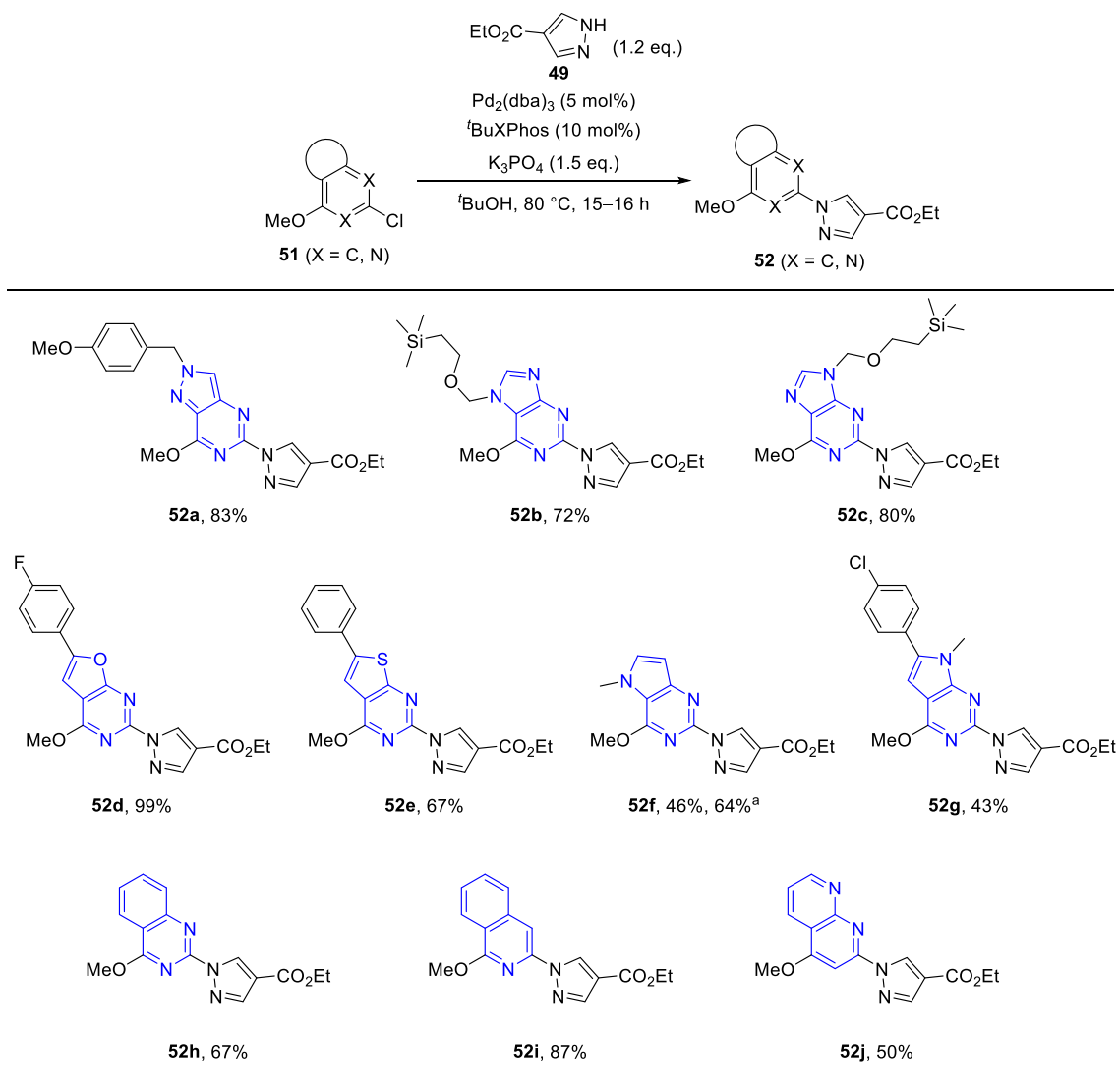


第三節 多様な芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールの合成

第二節で見出した反応条件で、より毒性の低い ^tBuOH を用いた条件 (Table 1, entry 4) を用い、種々の芳香族縮環ピリミジン **51**^{33, 52–53} を用いてカップリング反応を実施した

(Table 2)。ピラゾロピリミジン **48** と同様に反応が円滑に進行した結果、ピラゾロピリミジン **52a**、プリン **52b**, **52c**、フロピリミジン **52d** を高収率で得ることに成功した。また、チエノピリミジン **52e** も同様に良好な収率 (67%) で得られた。ピロロピリミジン **52f** の場合は反応が完結せず、収率 46%であった。原因は不明であるが Pd 触媒が失活したように考えられたため、10mol%の $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、20mol%の $t\text{BuXPhos}$ を用いた。その結果、反応が完結し収率 64%に向上させることが可能であった。ピロロピリミジン **52g** は2つのクロロ基における選択性を調べるために合成した。反応の結果ベンゼン環上のクロロ基で反応が進行したと思われる副生成物を LC/MS で確認し目的物の収率 43%に留まった。次に、汎用性拡大を意図してキナゾリンを用いた反応を検討した。その結果、収率 67%でカップリング生成物 **52h** が得られ、芳香族 6 員環が縮環したピリミジンにも本反応を適用可能であることがわかった。続いて塩基性に不安定なピリジンへの適用を検討した。その結果、反応は円滑に進行し、高収率で **52i** が、中程度の収率で **52j** が得られた。以上の検討結果より [6+6]ならびに[6+5]縮環ピリミドン-ピラゾールの合成に本反応を用いることが可能であることを証明した。

Table 2. Pd カップリング反応による芳香族縮環ピリミジンの適用性

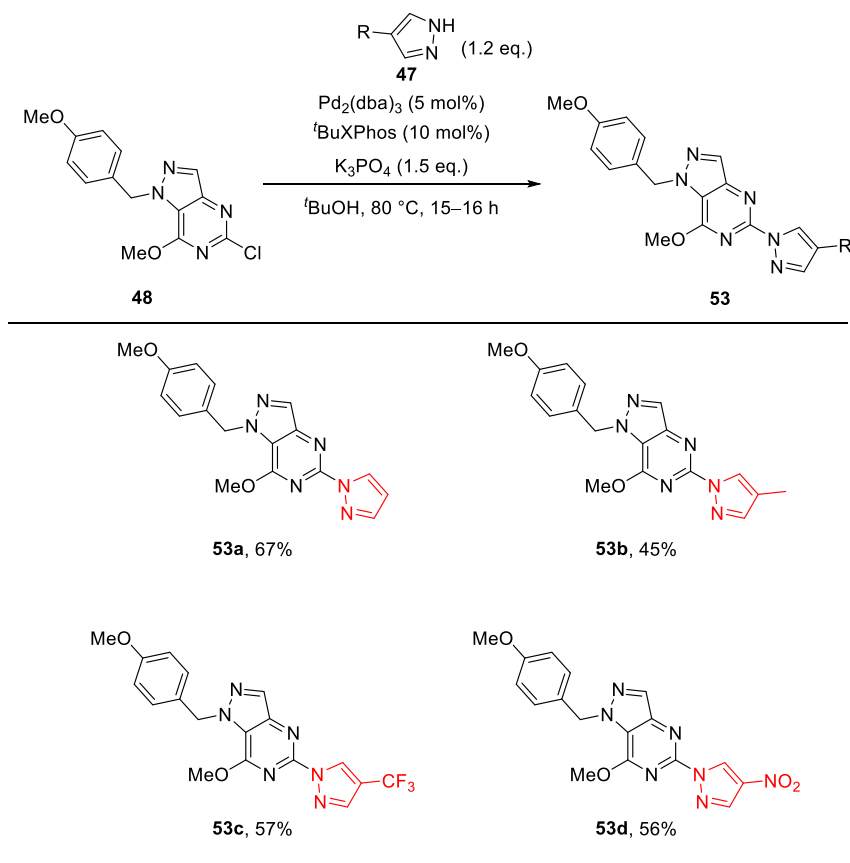


^a10 mol% of $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ and 20 mol% of $t\text{BuXPhos}$ were used.

次にピラゾール置換基の適用性について検討した (Table 3)。検討した置換基としては、置換基無し **53a**、電子供与性のメチル基 **53b**、電子吸引性のトリフルオロメチル基 **53c** ならびにニトロ基 **53d** の 4 種類である。すべてのピラゾールにおいて反応が完結し中程度の収率で目的物が得られ、ピリミドンへの求核置換反応より良好な収率であると考えている。また、置換基の違いによる電子状態の差が収率に表れなかったため、様々な置換基を有するピラゾールを用いることが可能であると考えられる。非対称ピラゾール、窒素原子の隣接位に置換基を有する反応点が嵩高いピラゾールの検討により、さら汎用性拡大が可能と

思われる。

Table 3. Pd カップリング反応による異なる置換基を有するピラゾールの適応性



第四節 小括

Pd 触媒を用いたカップリング反応による芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの効率的合成法開発に取り組んだ。加水分解抑制のため塩基にリン酸カリウムを用い、酸化的付加を促進させる目的でリン原子の電子密度を高めた配位子を適用することで反応が円滑に進行することを見出した。最適化した条件を用いた芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールの合成では様々な芳香環が縮環したピリミジンだけでなく、ピリジンにも適用範囲を拡大し、多様性を指向した合成法の開発に成功した。

第二章 経口投与可能な新規 HIF-PHD 阻害薬の創製

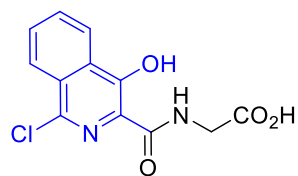
HIF-PHD には 3 つのサブタイプが存在し、それぞれが基質とする HIF- α を Table 4 に示す⁵⁴。HIF-PHD2 が EPO 発現誘導に重要な役割を果たしている HIF-2 α を基質としていること⁵⁵⁻⁵⁹、HIF-PHD2 欠損マウスでは赤血球の増加が認められる一方で HIF-PHD3 のそれには赤血球増加が認められないことから、HIF-PHD2 を阻害することが EPO 産生亢進に重要であると考えられる⁶⁰⁻⁶⁶。従って、HIF-PHD2 阻害活性を指標として研究を進めることとした。

Table 4. HIF-PHD のサブタイプとその基質

酵素	基質
HIF-PHD1	HIF-1 α
HIF-PHD2	HIF-1 α 、HIF-2 α
HIF-PHD3	HIF-2 α

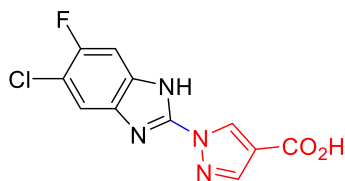
第一節 HIF-PHD 阻害活性を有する芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール化合物の取得

前章で見出した芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの新規効率的合成法を活用した創薬探索研究に取り組んだ。私はカルボキシル基を有するイソキノリンにグリシンがアミド結合を介して結合した **54**¹⁹、ベンズイミダゾールとピラゾールから成る **55**⁶⁷ が HIF-PHD 阻害薬として報告されていることに注目した (Figure 9)。Protein Data Bank (PDB) にある両化合物の HIF-PHD2 との X 線結晶構造 (PDB ID: 2HBU, 3OUH) を確認したところ、Fe 配位、Arg383 ならびに Tyr303 との水素結合、Tyr310 と π - π 相互作用が認められ (Figure 9)、芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールが同様の相互作用をし得るという考えのもと **56** を設計した。この際、創薬の分野でよく用いられる構造であるという観点で縮環部分にチオフェンを選択し、報告されている **55** の SAR より、ベンズイミダゾール 5, 6 位の少なくとも一か所に脂溶性基を導入すると活性が向上する傾向があったため、チエノピリミドン 5 位にメチル基を導入した。次に共同研究者にドッキングスタディを依頼し、Figure 10 に示す相互作用が可能であることを確認した。実際に **56** を合成したところ、中程度の *in vitro* HIF-PHD2 阻害活性 (IC₅₀: 290 nM)を示した。



54

hHIF-PHD2 IC₅₀: 640 nM



55

hHIF-PHD2 IC₅₀: 79 nM(文献値)

X線構造解析によるHIF-PHD2との相互作用

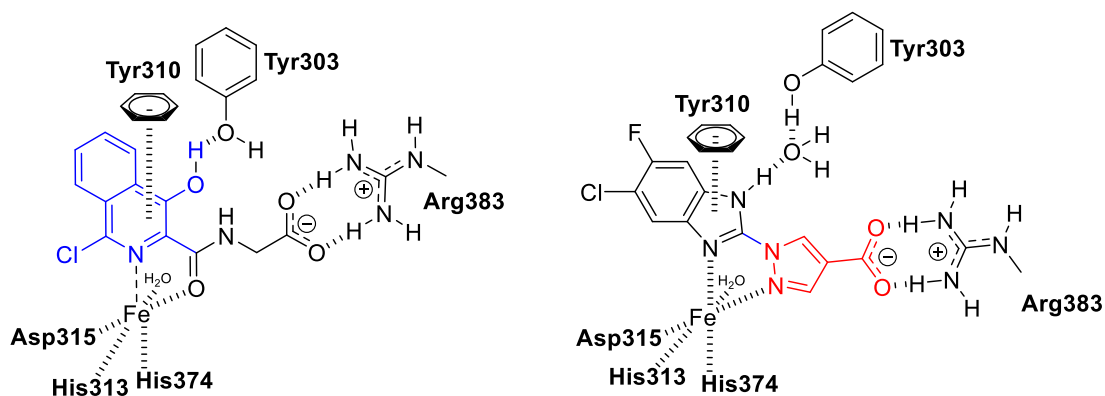
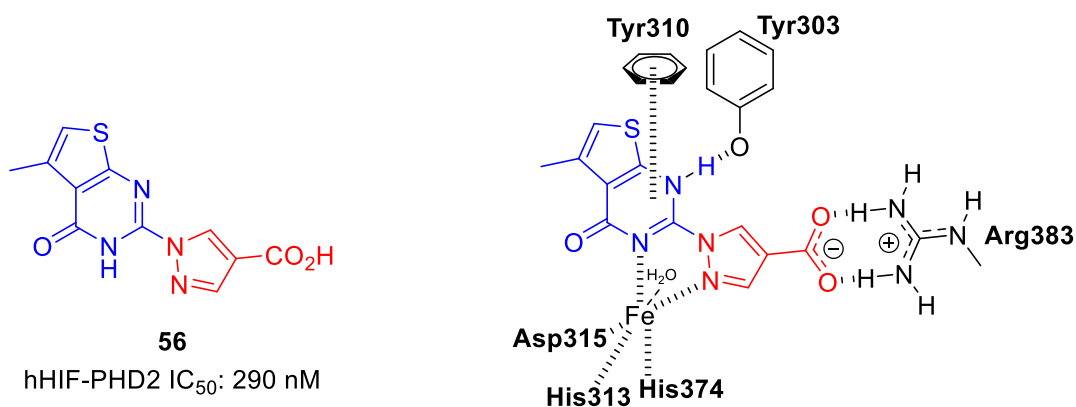


Figure 9. X 線結晶構造解析による HIF-PHD2 との相互作用



56

hHIF-PHD2 IC₅₀: 290 nM

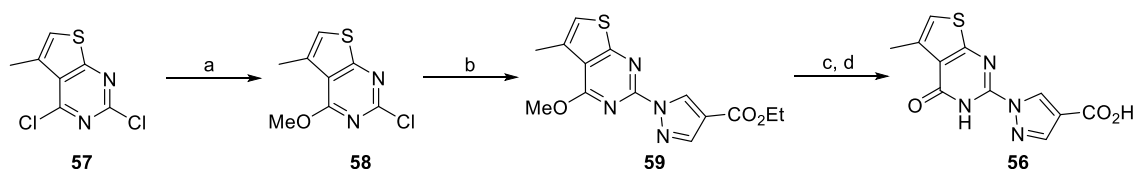
Figure 10. ドッキングスタディによる HIF-PHD2 とチエノピリミドン-ピラゾール **56** の相互作用

第二節 構造活性相関研究によるリード化合物取得

経口投与可能な HIF-PHD 阻害薬の開発を目指し、化合物 **56** を起点に構造活性相関研究を行い、HIF-PHD2 阻害活性を向上させる研究に着手した。ピリミドン-ピラゾールカルボン酸構造がファーマコフォアであることから、チオフェン部分ならびにメチル基の変換に

よる構造活性相関研究を実施した。ドッキングスタディにより、5 位メチル基の先が疎水性環境となっていることが示唆されたため、脂溶性基導入により活性向上が可能であると予想した。しかしながら、その疎水性環境は HIF-PHD2 の構造が非常にフレキシブルであるため、ドッキングスタディから活性向上の程度を見積もることは難しいと考えられ、Table 1 に示す様々な化合物を合成し、活性を評価することとした。

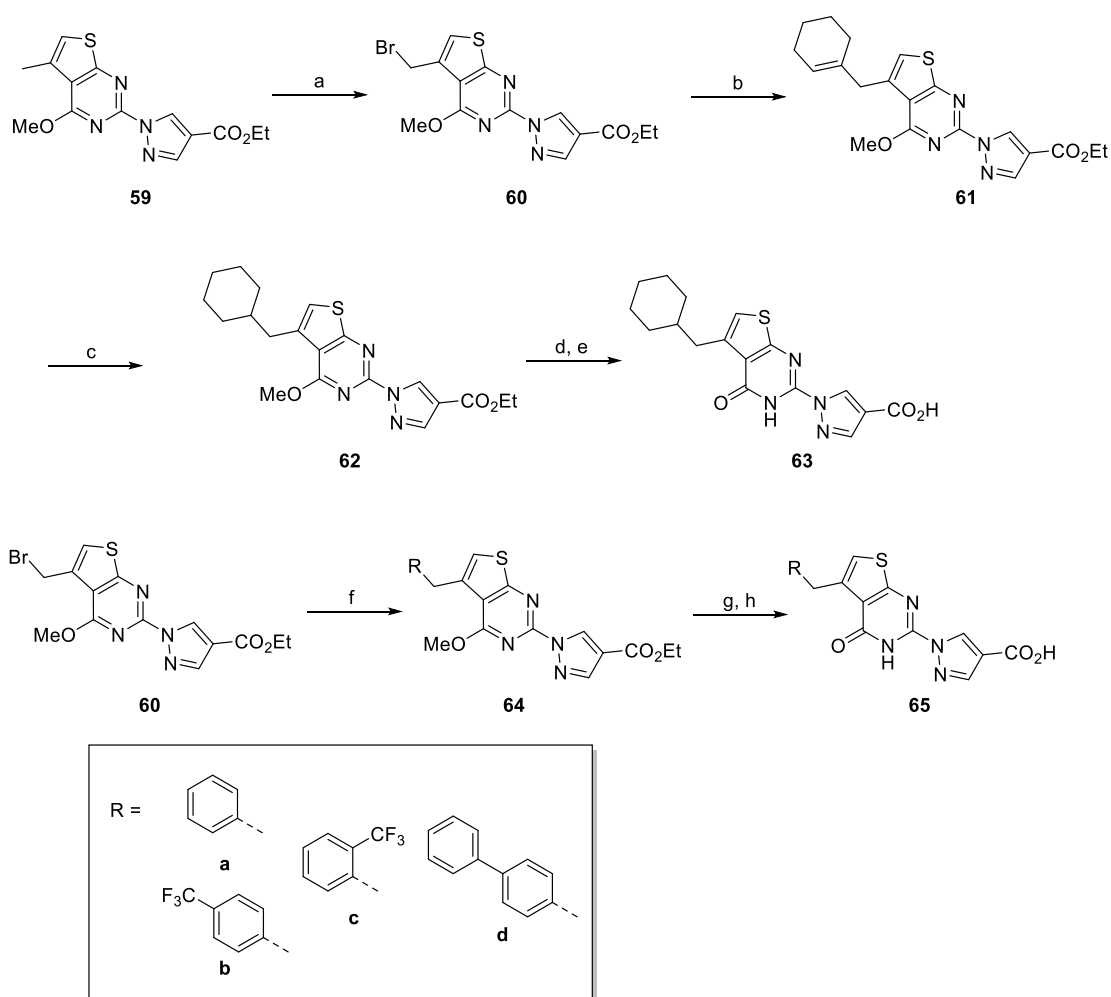
以下に構造活性相関取得を目的として設計した化合物の合成を示す (Scheme 13–16)。5-メチルチエノピリミドン **56** は Scheme 13 に示す方法で合成した。2,4-ジクロロチエノピリミジン **57**⁶⁸ に対し、等量の NaOMe を作用させ、メトキシ基を導入した **58** を収率 96% で得た。次にモノクロロチエノピリミジン **58** に第一章で見出した方法を用いてピラゾール導入することにより **59** を 80% の収率で得た。**59** の TMSI 処理により脱メチル化した後、エチルエステルを加水分解して目的物 **56** を得た。



Scheme 13. 5-メチルチエノピリミドン **56** の合成 ^a

(a) NaOMe, THF, MeOH, 0 °C–rt, 96%; (b) ethyl 4-pyrazolecarboxylate, Pd₂(dba)₃, Me₄tBuXPhos, K₃PO₄, tBuOH, 90 °C, 80%; (c) TMSI, CH₃CN, 50 °C; (d) aqueous NaOH, THF, EtOH, 40 °C, 12% (2 steps)

続いて、チオフェン環のメチル基をさらに脂溶性の高い置換基に変換したチエノピリミドン誘導体 **63**、**65a–65d** を合成した (Scheme 14)。**59** に AIBN 存在下、NBS を作用させ、収率 64% でブロモメチル体 **60** とした後、鈴木カップリングにより収率 33% でシクロヘキセンを導入した。水素添加反応を用いた還元によりシクロヘキシル基へと変換後、Scheme 13 と同様の方法の脱保護により **63** を得た。**60** とアリールボロン酸を用いた鈴木カップリングにより **64a–64d** へ誘導し、これまでと同様の脱保護により目的物 **65a–65d** を得た。

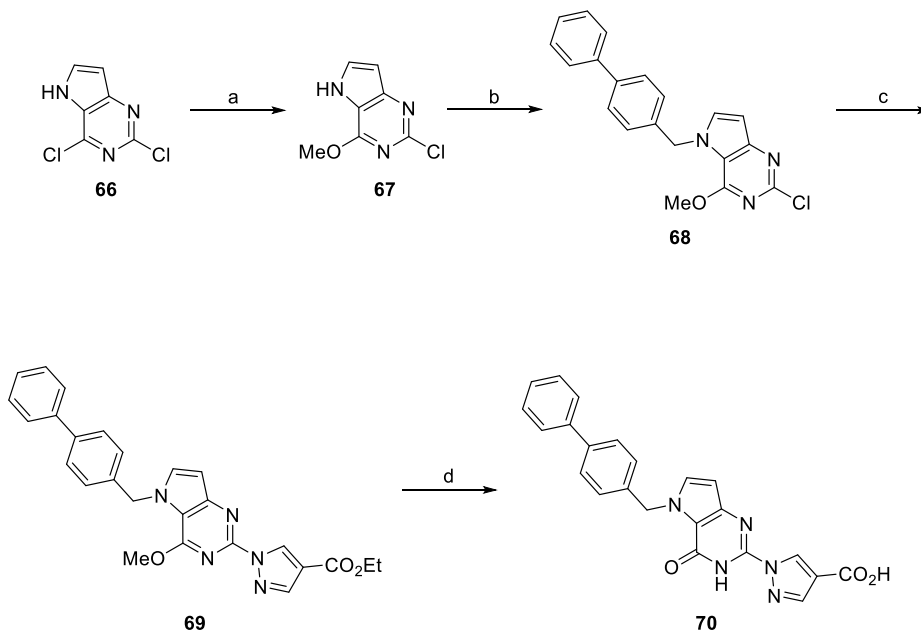


Scheme 14. チエノピリミドン誘導体の合成^a

^aReagents and conditions:; (a) NBS, AIBN, CCl₄, reflux, 64%; (b) cyclohexene-1-boronic acid pinacol ester, PdCl₂(amphos), K₃PO₄, dioxane, 100 °C, 33%; (c) 10% Pd/C, H₂, EtOH, rt, 67%; (d) TMSI, CH₃CN, 80 °C; (e) aqueous NaOH, THF, EtOH, 50 °C, 52% (2 steps); (f) RB(OH)₂, PdCl₂(amphos), K₃PO₄, dioxane, 100 °C, 49% (**64a**), 26% (**64b**), 31% (**64c**), 71% (**64d**); (g) NaI, TMSCl, CH₃CN, 80 °C; (h) aqueous NaOH, THF, EtOH, 40–60 °C, 61% (2 steps, **65a**), 78% (2 steps, **65b**), 72% (2 steps, **65c**), 91% (2 steps, **65d**)

次にチオフェン環をピロールに変換したピロロピリミドン **70** を合成した (Scheme 15)。5,7-ジクロロインドール **66** に等量のナトリウムメチラートを作用させ得られた **67** に対し、炭酸カリウム存在下 4-フェニルベンジルブロミドを反応させ、1 位に 4-フェニルベンジル側鎖を導入した **68** を得た。次に Pd 触媒を用いたカップリング反応により、ピ

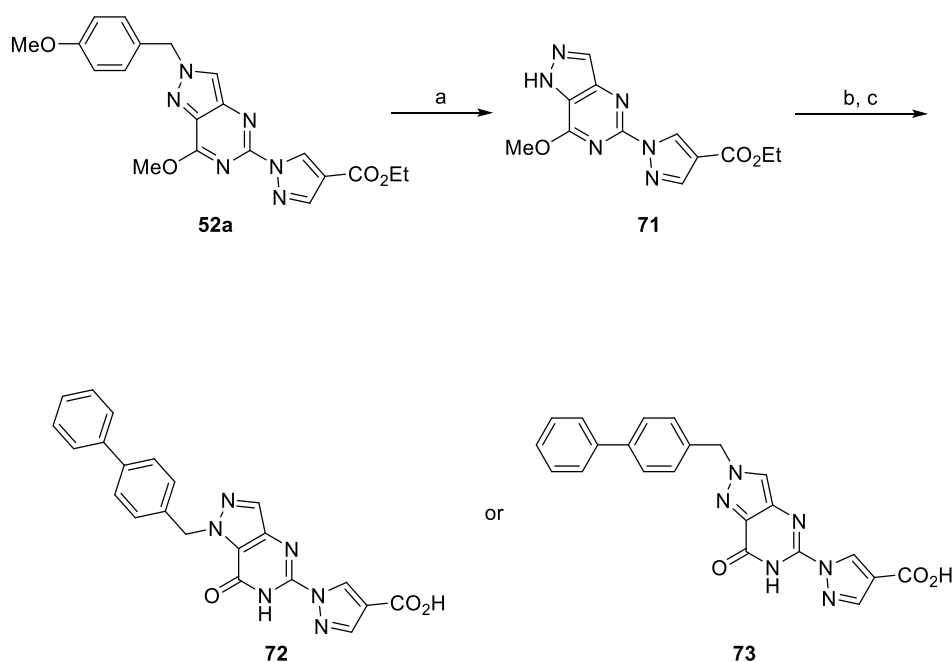
ラゾール部分を導入した **69** に誘導した。最後に水酸化ナトリウムを用いたエステルならびにメトキシ基の加水分解により **70** を合成した。



Scheme 15. ピロロピリミドン **35** の合成 ^a

^aReagents and conditions: (a) NaOMe, THF, MeOH, 0 °C–rt, 70%; (b) 4-phenylbenzylbromide, K₂CO₃, CH₃CN, rt, 84%; (c) ethyl 4-pyrazolecarboxylate, Pd₂(dba)₃, Me₄tBuXPhos, K₃PO₄, tBuOH, 130 °C, 69%; (d) aqueous NaOH, THF, EtOH, 50 °C, 40%

さらにチオフェンをピラゾールに変換したピラゾロピリミドン誘導体を合成した (Scheme 16)。第一章で見出した Pd カップリングにより合成した **52a** の *p*-メトキシベンジル基を TFA 条件で除去し、**71** を収率 80%で得た。これに対して 4-フェニルベンジルブロミド、炭酸カリウムを用いた条件においてベンジル化、続いて水酸化ナトリウム処理により **72** ならびに **73** を合成した。



Scheme 16. ピラゾロピリミドン誘導体の合成^a

^aReagents and conditions: (a) TFA, 60 °C, 80%; (b) 4-phenylbenzylbromide, K₂CO₃, CH₃CN, 80 °C; (c) aqueous NaOH, THF, EtOH, 60 °C, 43% (2 steps, **72**), 32% (2 steps, **73**)

以上のように合成したピリミドン-ピラゾールカルボン酸の *in vitro* における HIF-PHD2 阻害活性 (IC₅₀) を測定した (Table 5)。チエノピリミドン **56** の 5 位メチル基に脂溶性基を導入した化合物ならびにチオフェン部を変換した化合物の *in vitro* HIF-PHD2 阻害活性を示す。**56** にシクロヘキシル基を導入した化合物 **63** で 2 倍、フェニル基を導入した化合物 **65a** で 3 倍の阻害活性向上が見られた。**65a** にトリフルオロメチル基を導入した **65b**、**65c** では明確な活性の向上は見られなかったが、側鎖ベンゼン環の 4 位にフェニル基を導入した **65d** は **65a** と比較して阻害活性が 3 倍向上し、強い HIF-PHD2 阻害活性を示した。以上の結果は脂溶性基導入により活性向上が可能であるという予想を支持する結果であった。次にチオフェンをピロールあるいはピラゾールに変換したピロロピリミドン **70**、ピラゾロピリミドン **72** の活性を評価した。ピロロピリミドン **70** では活性が減弱したが、非常に強力な HIF-PHD2 阻害活性を有するピラゾロピリミドン **72** を得た。また、**72** の位置異性体である **73** も同様に強力な HIF-PHD2 阻害活性を有することがわかった。最も活性の強い **72** を用いた *in vivo* 評価により、投与量 10 mg/kg でマウスにおける EPO 産生亢進作用を確認したが、溶解度が低く経口吸収性に乏しいことがわかった (バイオアベイラビリティ: 16%)。

Table 5. チエノピリミドン、ピロロピリミドン、ピラゾロピリミドン誘導体のヒト HIF-PHD2 阻害活性

compound	R ₁ R ₂	hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM)	compound	R ₁ R ₂	hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM)
56		290	65d		23
63		140	70		51
65a		78	72		9
65b		68	73		12
65c		45			

第三節 経口吸収性向上のための溶解度改善

in vivo において有効性を有するピラゾロピリミドン **72** を得ることに成功したが、溶解度が低いため経口吸収性が低いことがわかった。低溶解度は創薬研究においてしばしば直面する課題であり、極性官能基導入により親水性を高める(脂溶性を下げる)ことが一般的な溶解度改善の構造変換である。しかし、**72** はすでに極性官能基であるカルボキシル基を有する化合物であるため、さらに脂溶性を低下させることで膜透過性低下に起因する経口吸

収性低下が懸念された。そこで脂溶性を下げることも無く溶解度を改善することを企画した。一般に、固体溶質の水への溶解度は、溶質の結晶性と水との相互作用能力の2つの因子に依存している。分子の平面性や対称性は結晶のパッキングに影響を与え、分子の平面性が崩れると結晶のパッキングが低下し、融点が低下する。最近、Lovering は、医薬品や臨床候補化合物のデータベースを解析し、 sp^3 混成炭素の割合の増加が融点の低下と関連することを報告した⁶⁹。溶解度と分子平面性の関係について、ポリ塩化ビフェニル (PCB) において、より大きな二面角を持つオルト置換ビフェニルの方が、溶解性が高いことが示された^{70,71}。例えば、2,2'-ジクロロビフェニル (900 $\mu\text{g/mL}$) は、4-クロロビフェニル (400 $\mu\text{g/mL}$) や 2,4'-ジクロロビフェニル (637 $\mu\text{g/mL}$) よりも高い水溶性を有している。一方、分子の対称性については、1995 年に Gavezzotti は、対称性の高い分子は、対称性の低い分子よりも、三次元の周期格子に嵌めこみやすく、その結果、より安定で高融点、低溶解性の結晶を形成すると指摘し、実際にオルトおよびメタ置換ベンゼンはパラ異性体よりも低温で融解することを報告している⁷²。このように固体の溶解性は、溶質の溶媒への親和性と、結晶の柔らかさの両方に影響を受ける。

Figure 11 に創薬研究において脂溶性を下げることも無く溶解度改善に成功した報告を示す⁷³。1つ目は、グアニジノ基をピペリジン4位から3位に変更することで分子の対称性を崩し溶解度改善に成功した事例である (Figure 11-1)⁷⁴。2つ目は芳香環を飽和環に変換し溶解度改善が達成されている (Figure 11-2)⁷⁵。これは芳香環を減らすことで平面性が下がり、溶解度改善が可能であることを示している。そして3つ目は芳香環が連続する化合物に置換基を導入し、二面角を大きくすることにより分子の平面性が低減され、溶解度を改善させることが報告されている (Figure 11-3)⁷⁶。私が見出したピラゾロピリミドン **72** は3つ目の事例と同様に連続した平面構造のため、芳香環削減、ならびに二面角増大による平面性低減が溶解度改善の最適な手段と考えた。

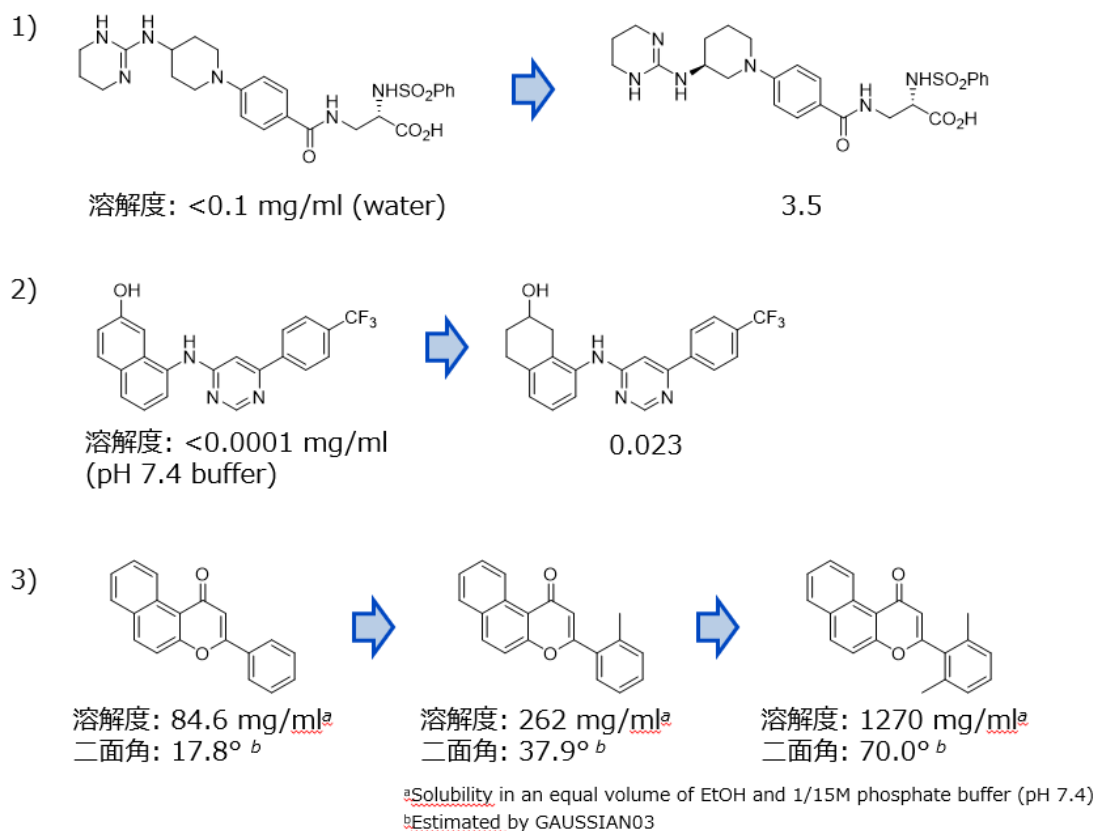


Figure 11. 脂溶性低減によらない溶解度改善事例

ピラゾロピリミドン **72** のビフェニル部分の二面角増大を考えフッ素を導入した化合物 **74**、**75**、ならびに芳香環削減による溶解度改善を意図して化合物 **76** を設計した。なお、**65a** と **65d** の構造活性相関より、芳香環を削減すると活性減弱が予想されたため、脂溶性基であるクロロ基を導入することとした (Figure 12)。

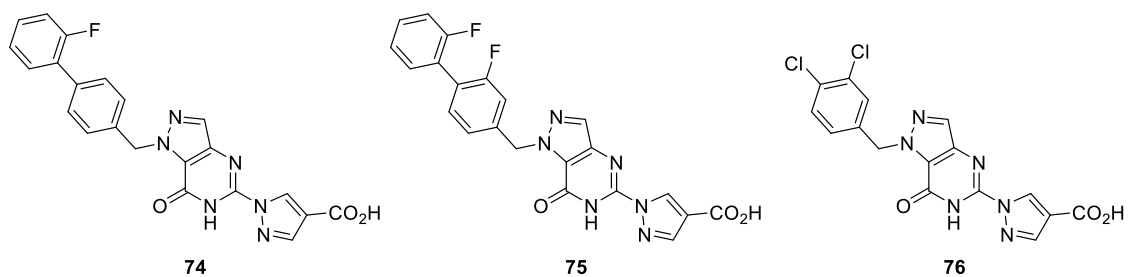


Figure 12. 溶解度改善を指向した化合物設計

量子計算により **72**、**74–75** のビフェニル部分の安定配座における二面角を計算したとこ

ろ、**72** が 45°、**74** が 49°、**75** が 51°ならびに 58°とフッ素導入に伴いわずかであるが二面角が大きくなり溶解度が改善する可能性が示唆された (Figure 13)。

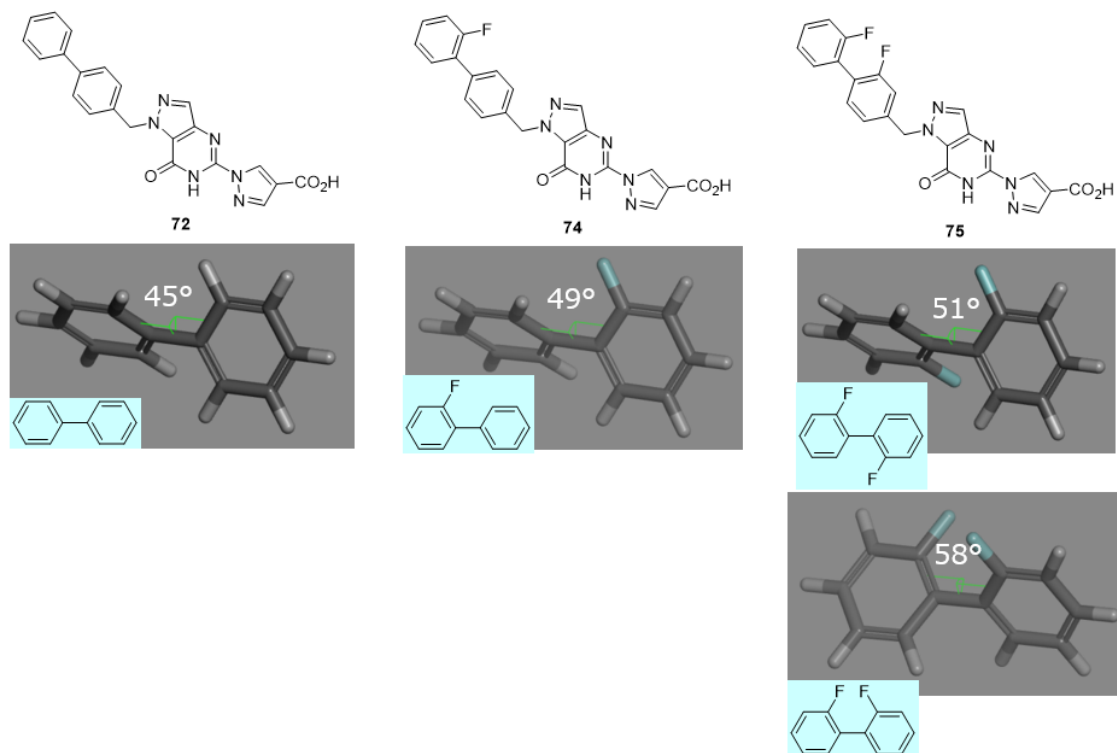


Figure 13. 量子化学計算によるビフェニル部分の二面角予測

Table 6 に化合物 **74–76** の *in vitro* 活性、溶解度、融点を示す。化合物 **72** と比較し、モノフルオロ体 **74** は *in vitro* 活性がわずかに減弱したが、pH6.5 の人工腸液において 2 倍以上の溶解度改善が見られた。**72** よりも融点が約 10 °C 低下していることから、ビフェニルの二面角が増大したことが平面性、パッキングを低下させた結果、結晶性が低下し、溶解度が向上したと考えている。ジフルオロ体 **75** は **74** と比較して *in vitro* 活性がわずかに減弱したが、十分に強力な活性を示した。また、融点は約 15 °C 低下したためさらなる溶解度改善が考えられたがむしろ **74** よりわずかに溶解度は低かった。融点が低下したことからフッ素基導入により、**74** よりもさらにビフェニルの二面角が増大し、結晶性が低下しているが、**74** よりも脂溶性が高くなり (logD(pH 6.5): 1.53 vs 1.67)、溶媒である水への親和性が低下したことが強く影響した結果と考えている。**74–75** は化合物設計の際に意図した通り、脂溶性を下げることなく溶解度を改善させることに成功した化合物である。ベンゼン環を除去したジクロロベンジル体 **76** は強い *in vitro* 活性を有し、**74–75** 以上に溶解度を改善す

ることができた。**72**と比較して平面性低下による結晶性低下と脂溶性低下による水への親和性向上の2点が溶解度改善に寄与したと考えられる。この結果より、**76**の溶解度をさらに向上させることとした。

Table 6. ピラゾロピリミドン誘導体のヒト HIF-PHD2 阻害活性と物性値

compound	R	hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM)	solubility ^a (μg/ml)	solubility ^b (μg/ml)	m.p. (°C)	logD(pH 6.5) ^c
72		9	9.5	22	311–314	1.39
74		16	-	52	299–303	1.53
75		25	49	42	283–285	1.67
76		24	88	163	290–291	0.81

^aSolubility of pH 6.5 buffer. ^bSolubility of pH 6.5 artificial intestinal fluids. ^clogD values were estimated by calculation using the Daylight ClogP, and pKa values calculated using the ChemAxon pKa plugin.^{77, 78}

私は側鎖ベンゼン環の配座が溶解度に寄与すると考え、**76**と異なるベンゼン環の配座を持つ化合物を用いた溶解度向上を検討することとした。量子化学計算を用いて**76**のベンジル位とベンゼン環の炭素-炭素結合を回転させた際の最安定配座 (Figure 14-A) を基準として、ベンゼン環の向きが変わるよう化合物を設計した。**76**のベンジル位にメチル基を導入

した **77** では側鎖ベンゼン環の水素とメチル基の立体障害のため、**76** よりもわずかにベンゼンが振れた最安定配座となった (Figure 14-B)。**77** の配座より、ベンゼン環の 2 位に置換基を導入するとカルボニルとの立体障害のため、さらにベンゼン環が振れると予想されたため **78** を計算した。その結果、カルボニル基とメチル基の両方の立体障害を避ける位置にベンゼン環が配置し、**76** よりもさらに振れた配座となった (Figure 14-C)。メチル基の無い **79** は **76** に近い配座となったが、2 位クロロ基がカルボニルとの立体障害により反対側に配置した (Figure 12-D)。以上より、化合物 **76** と比較して側鎖ベンゼンが振れた **77-78** が溶解度改善すると期待し、その光学活性体 **16, 80-81** ならびに側鎖ベンゼン環の 3 位から 4 位に置換基の位置を変えた **82** の HIF-PHD2 阻害活性、溶解度を評価することとした。

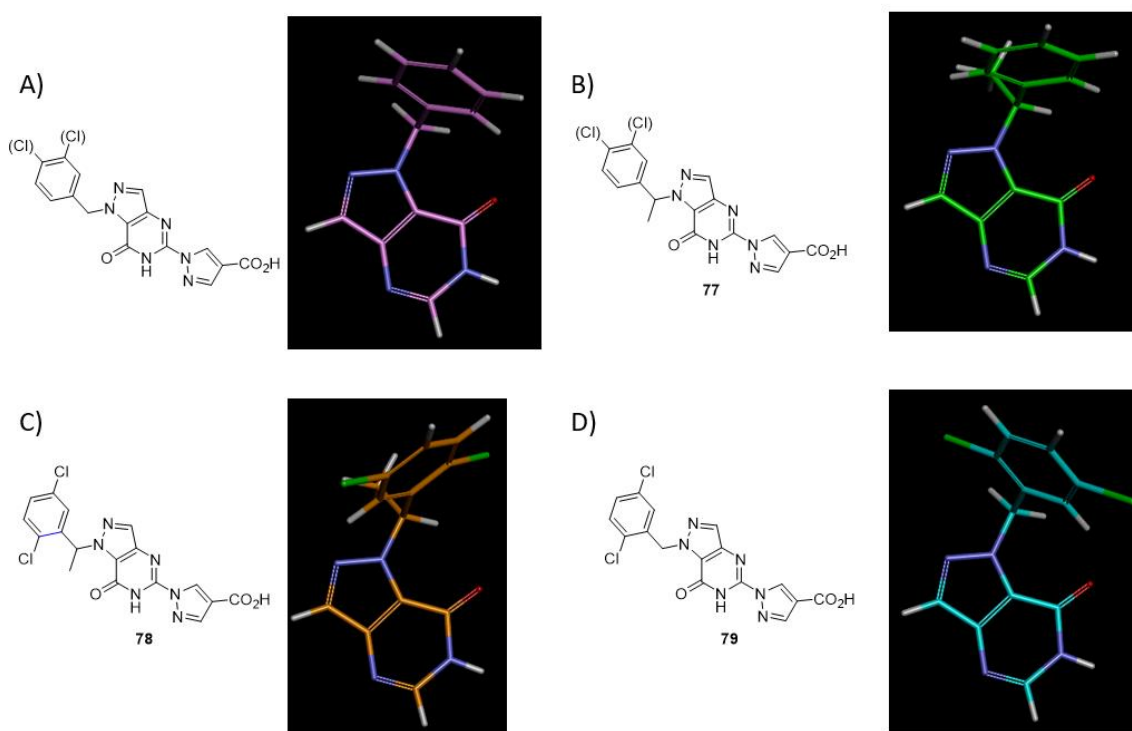


Figure 14. 側鎖ベンゼン環の配座に着目した溶解度改善を指向した化合物設計

Table 7 に **16, 80-82** の *in vitro* 活性、溶解度、融点を示す。**77** の光学活性体である **80** と **81** ではメチル基の立体が S 配置の **80** の方が HIF-PHD2 阻害活性が強く、**80** は **72** と同等の非常に強力な阻害活性を有していたが、溶解度は **76** よりもわずかに低下し、期待した溶解度改善は無かった。融点が低下しているため、**76** よりも結晶性は低下しているが、メチル基導入によって脂溶性が上がり、水への溶解性が低下したためであると考えている。**80** と同

ジメチル基の立体を持つ **78** の光学活性体 **16** は、HIF-PHD2 阻害活性がやや減弱したが溶解度が 1000 µg/ml 以上と大幅に改善した。**76** より融点が 50 °C 以上と大幅に低下したことにより結晶性が大きく低下し、劇的な溶解度改善をもたらしたと考えている。また、化合物 **16** と同様に側鎖ベンゼン環の 2 位にクロロ基を有する **82** も溶解度が大幅に向上した。以上より側鎖ベンゼン環の配座に着目した化合物設計により、強い HIF-PHD2 阻害活性と高い溶解度を有する **16** の取得に成功した。また、**16** の *in vivo* 活性を評価したところ、良好な経口吸収性 (バイオアベイラビリティ: 77%)、ラット腎性貧血モデルにおいて貧血改善作用が見られた。

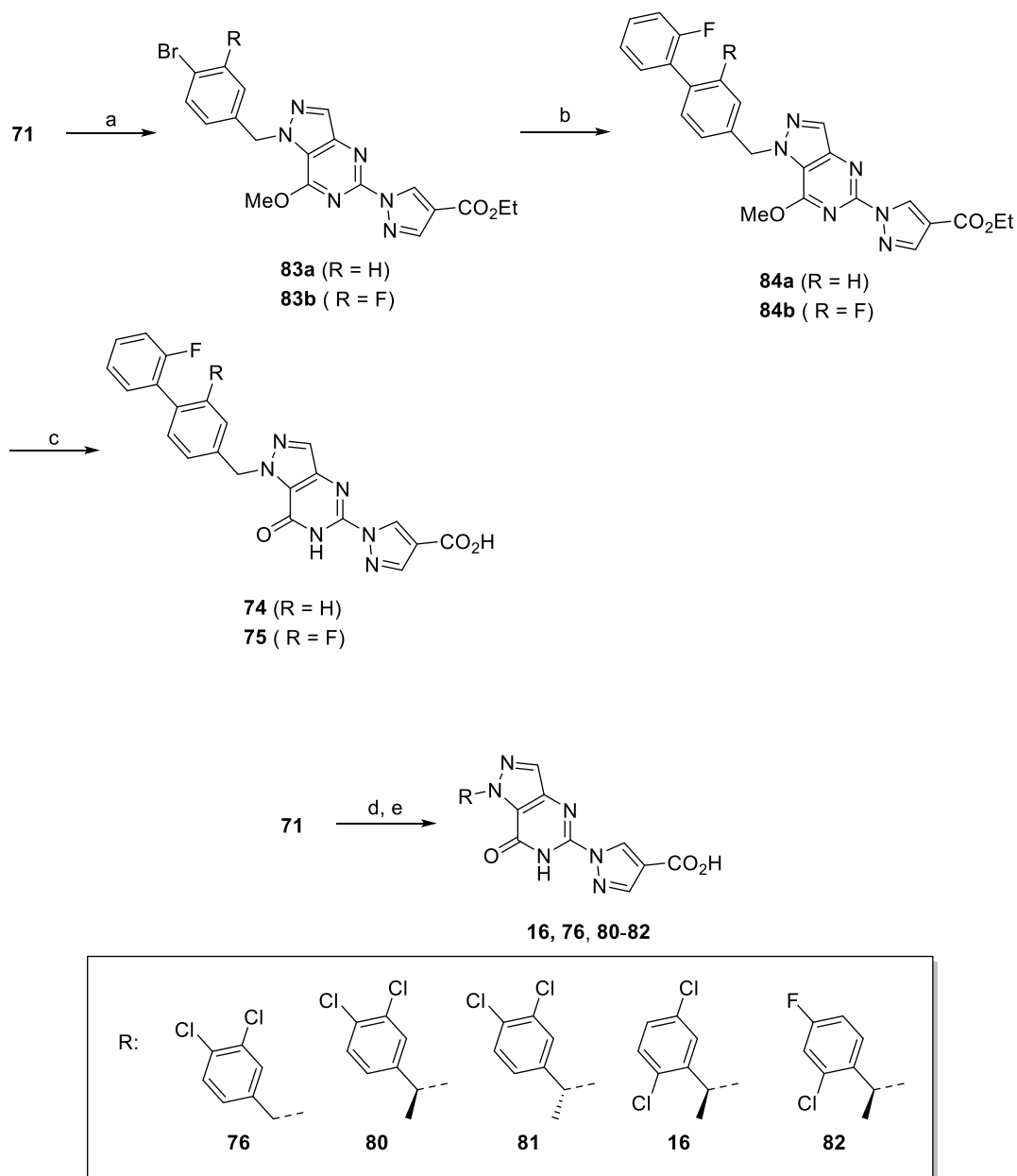
Table 7. ピラゾロピリミドン誘導体のヒト HIF-PHD2 阻害活性と物性値

compound	R	hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM)	solubility ^a (μg/ml)	solubility ^b (μg/ml)	m.p. (°C)	logD(pH 6.5) ^c
76		24	88	163	290–291	0.81
80		9	75	149	265–268	1.11
81		60	-	-	-	1.11
16		54	>1000	>1000	239	1.23
82		99	>1000	>1000	232–259	0.66

^aSolubility of pH 6.5 buffer. ^bSolubility of pH 6.5 artificial intestinal fluids. ^clogD values were estimated by calculation using the Daylight ClogP, and pKa values calculated using the ChemAxon pKa plugin.^{77, 78}

溶解度改善を目的として設計した化合物 **16**, **74–76**, **80–82** の合成について示す (Scheme 17)。光延反応によって Scheme 16 で得た **71** にベンジル基を導入した **82** を得た。次に 2-フルオロフェニルボロン酸との鈴木-宮浦カップリングを用いて **83** を得た。続いて水酸化ナトリウムを用いたエステルならびにメトキシ基の加水分解によりピラゾロピリミドン **74**, **75** を合成した。また、**71** の光延反応を用いたベンジル化と水酸化ナトリウム条件下でエス

テルならびにメトキシ基を加水分解により **16**, **76**, **79–81** を得た。



Scheme 17. 溶解度改善のために設計したピラゾロピリミドン誘導体の合成^a

^aReagents and conditions: (a) 4-bromobenzyl alcohol or 3-fluoro-4-bromobenzyl alcohol, DIAD, PPh₃, rt, 67% (**83a**), 55% (**83b**); (b) 2-fluorophenyl boronic acid, PdCl₂(amphos)₂, K₃PO₄, dioxane, 100 °C, 84% (**84a**), 86% (**84b**); (c) aqueous NaOH, THF, EtOH, 60 °C, 70% (**74**), 99% (**75**); (d) ROH, Mitsunobu reagent, PPh₃, THF, rt; (e) aqueous NaOH, THF, EtOH, 60 °C, 47% (2 steps, **76**), 27% (2 steps, **80**), 45% (2 steps, **81**), 37% (2 steps, **16**), 34% (2 steps, **82**)

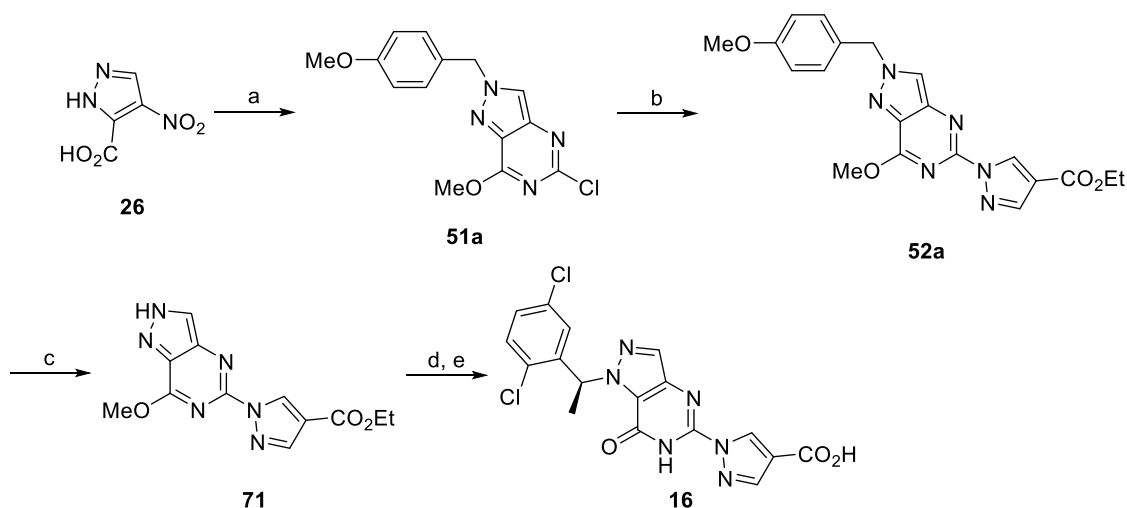
第四節 小括

芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの合成法を用いた経口投与可能な HIF-PHD 阻害薬の探索研究に取り組んだ。報告されている HIF-PHD2 とその阻害薬の X 線結晶構造による相互作用解析より、HIF-PHD2 阻害活性を有する芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **56** を見出した。次に、構造活性相関取得により、非常に強力な HIF-PHD2 阻害活性を有するピラゾロピリミドン誘導体を見出したが、溶解度が低く経口吸収性が低かった。これは連続する芳香環構造を有するため結晶性が高いことが原因であると考えられた。そこで分子の結晶性低減による溶解度改善に取り組み、強い HIF-PHD2 阻害活性と高い溶解度を有する化合物 **16** を見出すことに成功した。

第三章 標的指向型合成法開発: 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの効率的合成法開発と HIF-PHD 阻害薬への応用

第一節 背景

第二章の創薬研究で私が用いた HIF-PHD 阻害薬合成法の概略を示す (Scheme 18)。文献既知法により、市販のピラゾール **26** より **51a** を 7 段階、17% で合成し、第一章で見出した Pd 触媒を用いたカップリング反応を用いて **52** に誘導した。続いて酸を用いて **52** の *p*-メトキシベンジル基を除去した **71** に対し、光延反応によるピラゾールの 1-*N* ベンジル化ならびに加水分解により **16** が得られる。ベンジル側鎖の多様性を考えた合成法であるため、工程数が多く (11 工程)、*N*-ベンジル化 (**71**→**16**) に位置選択性がないことが理由で総収率が低い (総収率 4%) ことから、工業的合成は困難であると考えられる。そこで、**16** の標的指向型合成法を設計することとした。

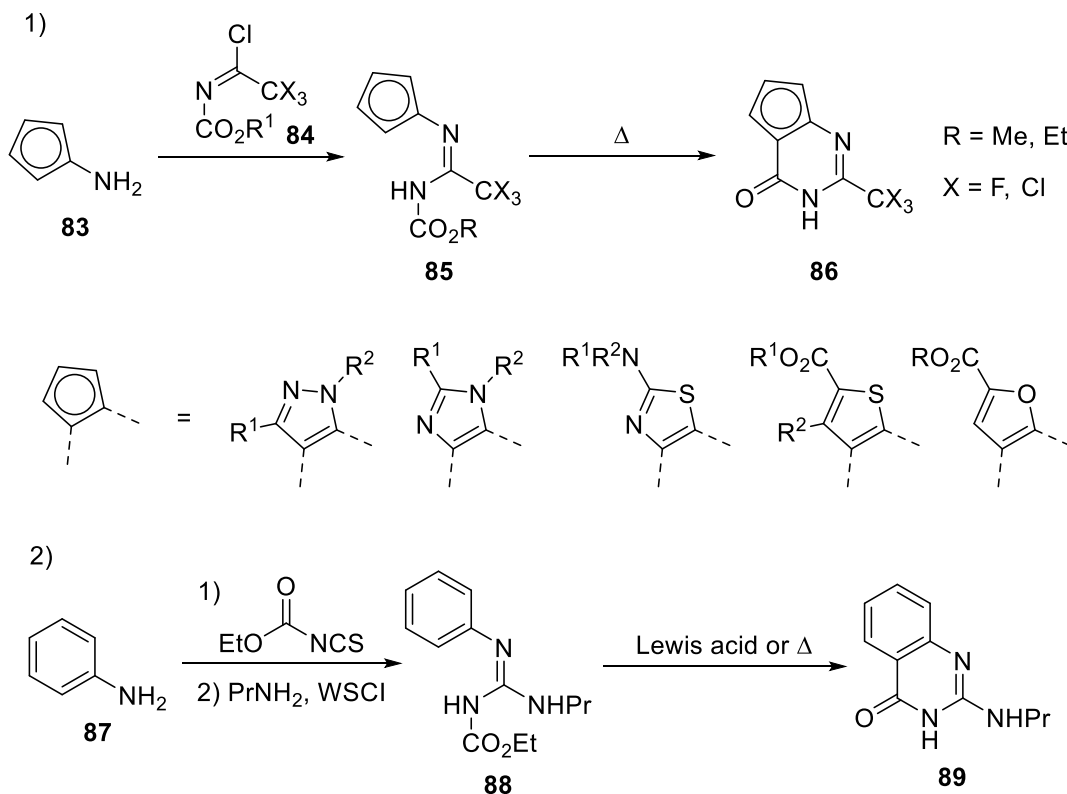


Scheme 18. 創薬研究に用いた-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成 ^a

^aconditions: a) See ref. 33, 17% (in 7 steps); b) See Table 1, 83%; c) See Scheme 16, 80 %; d), e) See Scheme 17, 37%

16 の多様性指向型合成において、ピラゾール *N*-ベンジル化の位置選択性がないことが収率低下の最大の原因であることから、標的指向型合成では位置選択性改善が必須と考えた。そこで、4-アミノピラゾール **94** の 1-*N* ベンジル化により 1-*N*-ベンジル-4-アミノピラゾール **92** を合成することとした (Scheme 20)。ヘテロアリアルアミンより、芳香族縮環ピリミドン合成する方法として、分子内フリーデルクラフツ型環化反応によるピリミドン構築法が知られている (Scheme 19)。ヘテロアリアルアミン **83** と **84** より得られるアミジ

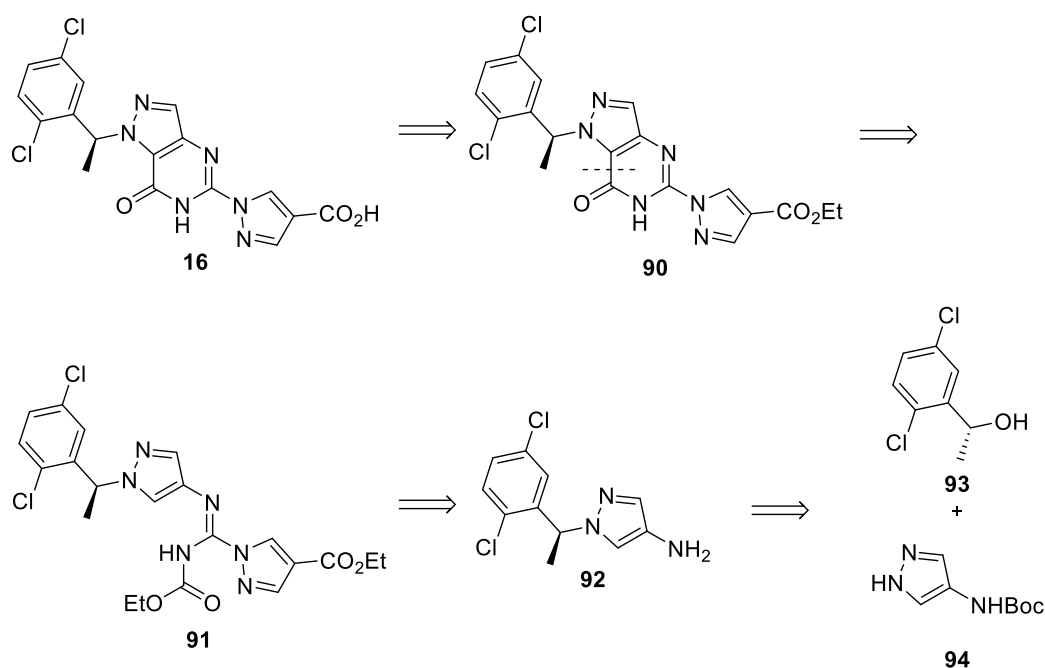
ン **85** を環化前駆体とし、イソシアネートを中間体として経由した分子内でフリーデルクラフツ型反応が進行し、ピリミドン環を構築する方法である (Scheme 20-1)⁷⁹⁻⁸⁴。また、アニリン **87** より得られるグアニジン **88** を環化前駆体として用いた分子内フリーデルクラフツ型反応による 2-アミノキナゾロン **89** の合成が報告されている (Scheme 20-2)⁸⁵⁻⁸⁷。



Scheme 19. 分子内フリーデルクラフツ型反応を用いた芳香族が縮環したピリミドンの合成

Scheme 19-2 の方法を応用した HIF-PHD 阻害薬の逆合成スキームを示す (Scheme 20)。

最終工程でエステルの加水分解を行い (**90**→**16**)、ピリミドン環は分子内フリーデルクラフツ反応により構築する (**91**→**90**)。環化前駆体はアミノピラゾールより誘導可能であり (**92**→**91**)⁸⁹、アミノピラゾール **92** はピラゾール **94** と光学活性ベンジルアルコール **93** より合成可能であると考えた。出発原料としてピラゾール **94** を用いるためアルキル化の選択性は問題とならず、加えて工程数が削減され、創薬研究で用いた方法の問題点が改善されることから工業的合成に応用可能と考えられた。しかし、分子内フリーデルクラフツ反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成は達成されていないため、反応条件を最適化することとした。



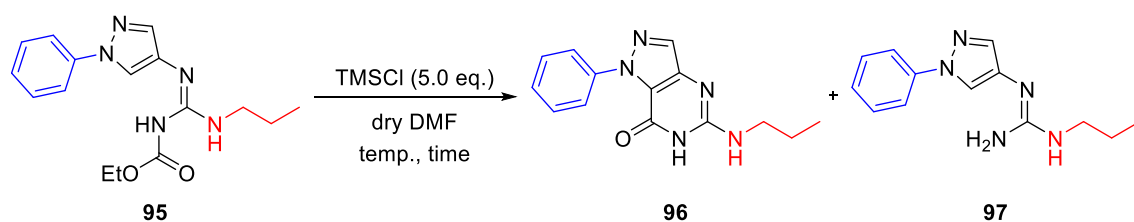
Scheme 20. 分子内フリーデルクラフツ環化による HIF-PHD 阻害薬の逆合成

第二節 分子内フリーデルクラフツ型環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン合成反応の条件最適化

入手容易な 1-フェニル-4-アミノピラゾールから既知なワンボット反応⁸⁸により合成したグアニジン **95** を環化前駆体とした分子内フリーデルクラフツ型環化反応を用いて、5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン **96** を合成する反応条件を最適化した (Table 8)。Scheme 2-2 に示した反応において、DMF 中 TMSCl を加えることにより、反応に要する温度が 150°C から 80°C に低下することが報告されているため、DMF を溶媒に用い、TMSCl 存在下、80 °C で検討を始めることとした。その結果、目的物の生成は確認できたが、出発原料が多く残っていた (entry 1)。80 °C で副生成物が認められなかったため、反応温度を 100、120°C に昇温して検討した (entry 2, 3)。その結果、反応温度の上昇とともに反応は進行し、120°C、反応時間 90 分で反応が完結した (entry 4)。次に反応が加速すると報告されているマイクロウェーブによる加熱条件で検討した⁸⁷。反応温度 80 °C、60 分では出発原料の残存が確認されたが (entry 5)、100 °C で反応が完結し、報告されているようにマイクロウェーブによる加熱で反応加速が見られた (entry 6)。また、120 °C においても特に副生成物は見られず、100 °C の場合と同様に収率 77% で目的物が得られた (entry 7)。以上の検討により、DMF 中、TMSCl 存在下 120 °C、90min もしくはマイクロウェーブ加熱の場合では 100 °C、60 分で環化反応が進行することを見出した。キナゾロンは 80°C で反応が進行するこ

とが報告されているが、ピラゾールでは 120 °C を要した。これはベンゼンと比較してピラゾールは電子不足系芳香環であり、環化反応が進行しにくかったためと考えている。また、マイクロウェーブ照射により反応が加速された理由は不明である。

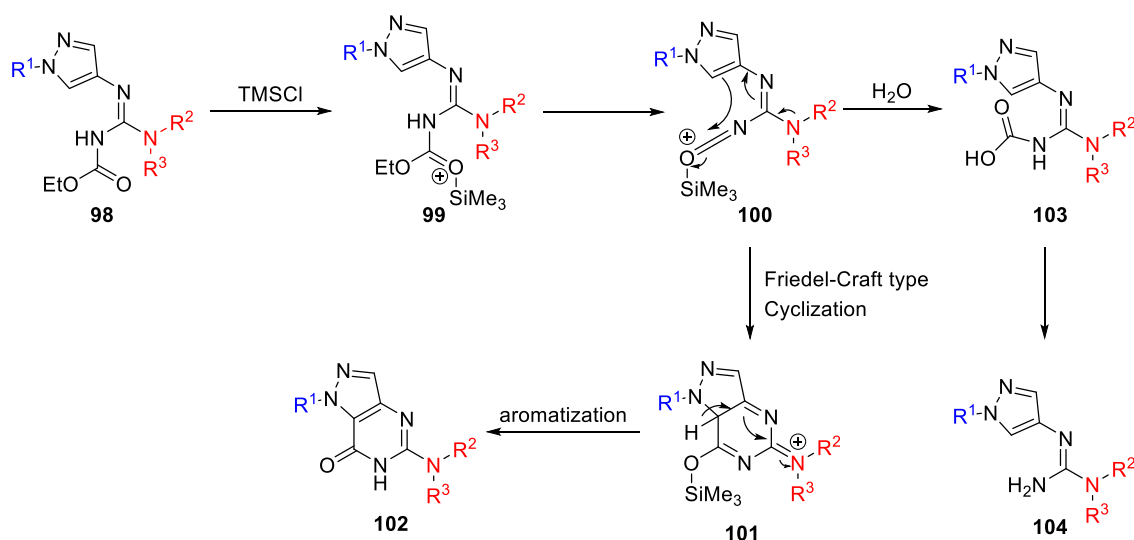
Table 8. 分子内フリーデルクラフツ型環化反応条件の最適化



entry	temp. (°C)	time (min)	95:96:97 ^a	isolated yield (%)
1	80	60	67:33:0	
2	100	60	41:59:0	
3	120	60	22:78:0	
4	120	90	0:100:0	
5	80 (μW)	60	74:26:0	
6	100 (μW)	60	0:100:0	77
7	120 (μW)	60	0:100:0	77
8 ^b	120 (μW)	60	0:0:100	

^aDetermined by UV (254 nm) area of HPLC analysis of the reaction mixture. ^b4.0 equivalent of water was added.

水を添加した条件で反応を実施したところ、出発原料が加水分解した **97** の生成が確認された (entry 8)。この結果より Scheme 21 に示す機構で反応が進行していると考えている。TMS 基が環化前駆体 **98** のカルバモイル基酸素に配位し、エタノールが脱離することで、**100** が生成する。次にアミノ基からの電子の押し出しによってフリーデルクラフツ型環化反応が進行し、ピリミドン **102** が生成する。水が存在する場合、**100** に水が作用し、不安定なカルバミン酸 **103** を経由しグアニジン **104** へと分解される。

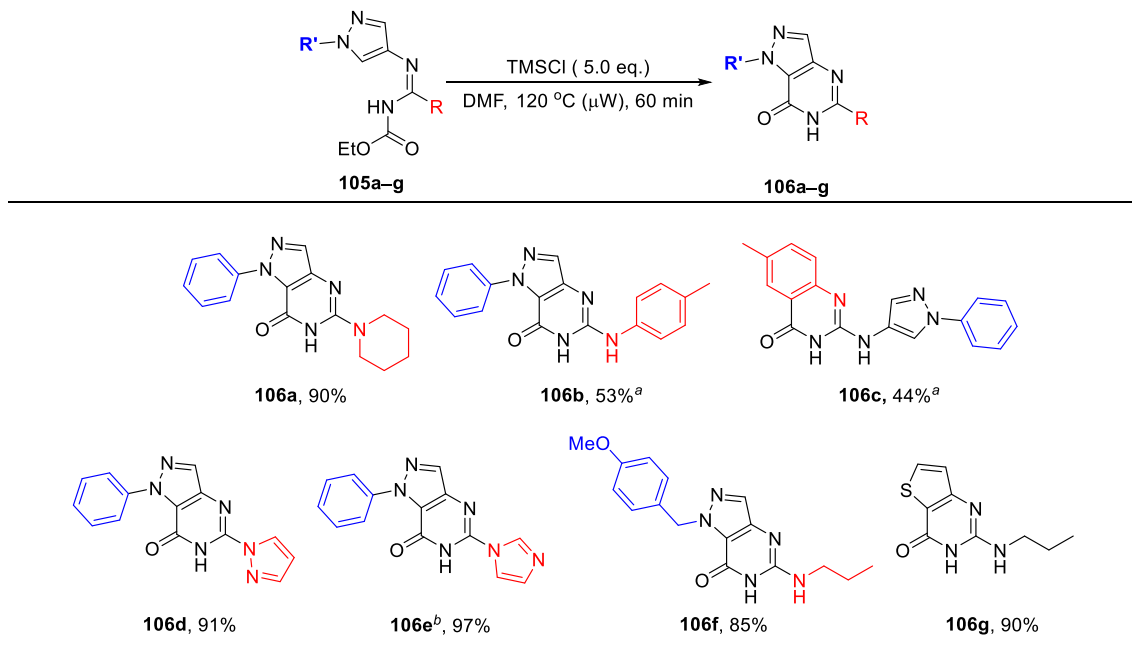


Scheme 21. 分子内フリーデルクラフツ型環化反応機構

第三節 分子内フリーデルクラフツ型反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン合成と HIF-PHD 阻害薬への応用

第二節で検討した条件を用い、様々な 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを合成した (Table 9)。1 位にフェニル基を有し、5 位アミノ基の異なるピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを合成した。5 位にピペリジン基を有するピラゾロピリミドン **106a** を高収率で得ることができた (収率 90%)。これはフリーデルクラフツ環化反応により、初めて 2 級アミンを有する芳香族縮環ピリミドン合成した例である。次に 4-トルイジン基を導入した化合物の合成を試みた。その結果、目的物 **106b** が収率 53% で得られたが、副生成物として **106c** が収率 44% で得られた。これは環化反応が 4-トルイル基の 2 位で環化した生成物であり、ピラゾール 5 位とトルイル基 2 位が同等に電子豊富であったため 2 種類の生成物が得られたと考えている。5 位にアゾールを導入したピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを合成した。私が第二章で見出した HIF-PHD 阻害薬と同様にピラゾールを有する **106d** を高収率で得ることに成功した。これは本反応の HIF-PHD 阻害薬への応用を期待させる結果であった。イミダゾールを導入した **106e** は溶媒に NMP を用いることにより高収率で得ることができた。DMF を用いた場合、反応条件によって DMF より生じるジメチルアミンが **105e** と反応し、イミダゾールが脱離したと考えられる生成物が認められたためである。ピラゾールの置換基を *p*-メトキシベンジル基に変換したピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン **106f**、チエノ[3,2-*d*]ピリミド-4-オン **106g** とともに高い収率で得られた。本反応により、チエノ[3,2-*d*]ピリミド-4-オンを合成した初めての例である。

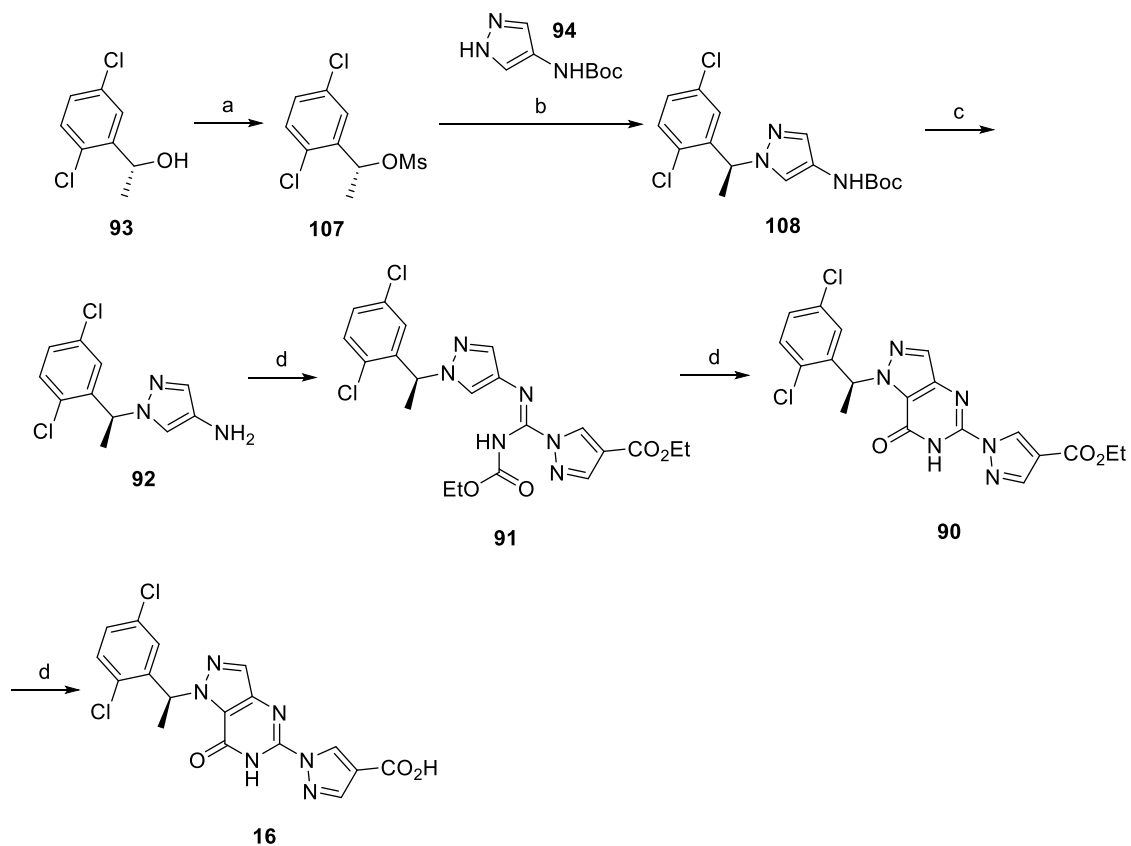
Table 9. 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成



^aThe yields were calculated by ¹H NMR spectra of the mixture **106b** and **106c**. ^bNMP was used as a solvent.

次に分子内フリーデルクラフツ反応を HIF-PHD 阻害薬の合成に応用した (Scheme 22)。市販の光学活性なベンジルアルコール **93** (エナンチオマー過剰率: 93%) をメシル化した **107** を用い、ピラゾール **94**⁸⁹ を *N*-ベンジル化した **108** を得た。続いて TFA により脱 Boc 化することにより、3 段階収率 50%で **92** を得た。次に、環化前駆体であるグアニジン **91** に誘導し、TMSCl 存在下、NMP 中でフリーデルクラフツ環化反応を行い **90** とした。**106d** の合成の際に、わずかにジメチルアミンが **105d** と反応してピラゾールが脱離した生成物が確認されたため、溶媒に NMP を用いた。最後に水酸化ナトリウムを用いてエステルを加水分解し 3 段階収率 34%で HIF-PHD 阻害薬 **16** を得た。**16** はエナンチオマー過剰率 99%であったことから、1 位置換基に不斉ベンジル炭素を有する 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成に適用可能であることがわかった。

分子内フリーデルクラフツ環化反応を利用した **16** の合成は (6 工程、総収率 17%)、創薬研究で用いた合成と比較して、工程数削減、総収率向上を達成し、工業的合成に応用されることが期待される。



Scheme 22. 分子内フリーデルクラフツ環化反応を用いた HIF-PHD 阻害薬 **16** の合成 ^a

^aReagents and conditions: (a) Ms_2O , Et_3N , CHCl_3 , rt; (b) **94**, Cs_2CO_3 , DMF, rt; (C) TFA, CH_2Cl_2 , rt, 50% (3 steps); (d) ethoxycarbonyl isothiocyanate, CHCl_3 , rt, then ethyl 4-pyrazolecarboxylate, WSCI, Et_3N ; (e) TMSCl , NMP, 120 °C (μW); (f) aqueous NaOH, EtOH, 34% (3 steps)

第四節 小括

第二章で見出した HIF-PHD 阻害薬 **16** のプロセス合成に応用可能な効率的合成法開発を目的として、分子内フリーデルクラフツ環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの効率的合成法を確立した。分子内フリーデルクラフツ環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン合成の反応条件を最適化により TMSCl 存在下、DMF 中で加熱することにより反応が円滑に進行することを見出し、様々な 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを高収率で合成した。続いて分子内フリーデルクラフツ環化反応を応用し、工業的合成への応用が期待される HIF-PHD 阻害薬の合成を達成した。

総括

私は本研究において、医薬候補品の探索研究に貢献する多様性指向型合成法開発、それを活用した医薬候補品創製、医薬候補品の工業的合成に貢献する標指向型合成法の開発に取り組んだ。

第一章では多様性指向型効率的反応開発として、創薬研究に用いられる芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの効率的合成法開発に取り組んだ。反応基質の汎用性から 2-クロロ 4-メトキシピリミジンを 2-クロロ-4-ピリミドンユニットとして用い Pd 触媒と入手容易なジアルキルビアールホスフィン配位子を用いた C-N 結合形成反応により効率的に芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールを合成することを考えた。加水分解抑制のため塩基にリン酸カリウムを用い、アリールクロリドを用いた場合でも円滑に反応が進行する XPhos を配位子として用いたが、予想に反して酸化的付加が進行しなかった。そこで、酸化的付加を促進させる目的でリン原子の電子密度を高めた配位子 **BuXPhos** を適用することで反応が円滑に進行することを見出した。次に、最適化した条件を用い、様々な芳香族縮環ピリミジン-ピラゾールだけでなく、芳香環が縮環したピリジンの合成にも成功し、多様な芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの効率的合成法の開発に成功した。本方法により様々な芳香族縮環ピリミドンとピラゾールの組み合わせが合成可能であることから創薬研究への応用が期待され、すでに実例が報告されている。

第二章では第一章で見出した芳香族縮環ピリミドン-ピラゾールの合成法を活用した創薬研究として、医療現場から求められている経口投与可能な HIF-PHD 阻害薬の探索研究に取り組んだ。報告されている HIF-PHD2 とその阻害薬の X 線結晶構造による相互作用解析を調査し、芳香族縮環ピリミドン-ピラゾール **56** が HIF-PHD2 阻害活性を有することを見出した。次に、HIF-PHD2 と **56** のドッキングスタディを活用した構造活性相関取得により、非常に強力な HIF-PHD2 阻害活性を有するピラゾロピリミドン誘導体 **72** を得ることに成功した。しかし、連続する芳香環構造を有するため結晶性が高いことが理由で溶解度が低く経口吸収性が低かった。そこで結晶性低減のために芳香環数を減らした **76** を設計した。**76** は **72** と比較して大幅に溶解度が改善したことから **76** の溶解度をさらに改善することとし、量子化学計算において置換基導入によりベンジル側鎖が **76** と異なる配座を取る化合物を設計した。その結果、強い HIF-PHD2 阻害活性と高い溶解度を有する化合物 **16** を見出すことに成功した。腎性貧血治療の問題解決ならびに HIF が関与する疾患治療ならびに疾患発症メカニズム解明に貢献できると考えている。

第三章では HIF-PHD 阻害薬 **16** の工業的合成に応用可能な標的指向型合成法開発を目的

とし、分子内フリーデルクラフツ型環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの効率的合成法を開発に着手した。第二章で用いた多様性指向型合成法、ならびに既存の 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オン合成法が持つ問題点を解析し、様々な芳香族縮環ピリミドンの合成が報告されている分子内フリーデルクラフツ環化反応を用いて 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを合成する方法が工業的合成に適していると考えた。分子内フリーデルクラフツ環化反応による 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンの合成は達成されていないため、反応条件を最適化し、TMSCl 存在下、DMF 中で加熱することにより反応が円滑に進行することを見出した。さらに様々な 5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを高収率で合成した。続いて分子内フリーデルクラフツ環化反応を用いた HIF-PHD 阻害薬の合成を達成し、プロセス合成への応用が期待される HIF-PHD 阻害薬の合成法開発に成功した。HIF-PHD に関わる研究に対する迅速な化合物供給、5-アミノピラゾロ[4,3-*d*]ピリミド-7-オンを用いた医薬候補品合成への活用が期待される。

本研究を通して、多様性指向型合成法ならびに標的指向型合成法を開発し、医薬候補品の創製とその工業的合成法開発に成功した。以上より、私が開発した多様性指向型合成法は今後の創薬探索研究による医薬候補品の創製に、標的指向型合成法はその医薬品候補品の工業的合成に活用されることが期待され、創薬研究の発展に貢献する成果であると考えている。また HIF-PHD 阻害薬を見出したことは、HIF が関与する疾患治療に貢献可能であることから、今後の医療の発展に寄与する成果と考えている。

実験項

General

^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on Bruker 400 UltraShield Plus. Chemical shifts in the NMR spectra are reported in parts per million (ppm) with relative to tetramethylsilane ($\delta = 0.00$ ppm) as the internal standard. The following abbreviations are used to designate the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. Coupling constants (J) are in hertz. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a LTQ Orbitrap Velos Pro mass spectrometer equipped with an ESI Lockspray source for accurate mass values.

ethyl 1-[7-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (50**)**

A mixture of **48** (100 mg, 0.328 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (55 mg, 0.394 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (15 mg, 0.0164 mmol), $t\text{BuXPhos}$ (14 mg, 0.0328 mmol), and K_3PO_4 (105 mg, 0.492 mmol) in $t\text{BuOH}$ (3 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl_3 twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) to afford **50** (101 mg, 75%).

^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): $\delta = 9.03$ (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.26–7.23 (m, 2H), 6.86–6.83 (m, 2H), 5.67 (s, 2H), 4.36 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.33 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 1.39 ppm (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz): $\delta = 162.8, 159.5, 157.3, 148.9, 146.6, 143.5, 133.8, 132.5, 129.2, 128.5, 120.3, 117.1, 114.2, 60.6, 55.4, 55.3, 55.0, 14.4$ ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 409.1619, found: 409.1609

ethyl 1-[7-methoxy-2-[(4-methoxyphenyl)methyl]pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (52a**)**

A mixture of **51a** (101mg, 0.332 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (56mg, 0.398 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (15 mg, 0.0164 mmol), $t\text{BuXPhos}$ (14mg, 0.0328 mmol), and K_3PO_4 (106 mg, 0.497 mmol) in $t\text{BuOH}$ (3 ml) was stirred at 80 °C for 16 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was

cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 100/0–80/20) and NH silica gel column chromatography (Hexane/CHCl₃ = 70/30–0/100) to afford **52a** (113 mg, 83%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.04 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.31–7.26 (m, 2H), 6.92–6.88 (m, 2H), 5.54 (s, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.33 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 1.39 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 162.8, 162.8, 160.1, 149.2, 143.6, 142.0, 132.7, 130.9, 129.7, 126.5, 123.8, 116.9, 114.5, 60.6, 58.3, 55.4, 55.0, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₁O₄N₆ [M+H]⁺: 409.1619, found: 409.1608

ethyl 1-[6-methoxy-7-(2-trimethylsilylethoxymethyl)purin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (52b)

A mixture of **51b** (100 mg, 0.318 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (53 mg, 0.398 mmol), Pd₂(dba)₃ (15 mg, 0.0159 mmol), ^tBuXPhos (13mg, 0.0318 mmol), and K₃PO₄ (101 mg, 0.476 mmol) in ^tBuOH (3 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–30/70) to afford **52b** (96 mg, 72%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.16 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.32 (s, 3H), 3.62–3.58 (m, 2H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.95–0.91 (m, 2H), -0.03 ppm (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 163.0, 162.8, 158.1, 150.4, 147.1, 143.6, 132.7, 117.2, 111.4, 76.1, 67.1, 60.6, 55.0, 17.7, 14.4, -1.5 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₂₇O₄N₆Si (M+H)⁺: 419.1858, found: 419.1852

ethyl 1-[6-methoxy-9-(2-trimethylsilylethoxymethyl)purin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (52c)

A mixture of **51c** (100 mg, 0.318 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (53 mg, 0.398 mmol), Pd₂(dba)₃ (15 mg, 0.0159 mmol), ^tBuXPhos (13mg, 0.0318 mmol), and K₃PO₄ (101 mg, 0.476 mmol) in ^tBuOH (3 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture

was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–30/70) to afford **52c** (106 mg, 79%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.09 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.32 (s, 3H), 3.67–3.63 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.97–0.93 (m, 2H), -0.05 ppm (s, 9H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 162.7, 161.8, 153.2, 150.2, 143.8, 142.8, 132.8, 120.0, 117.3, 72.7, 67.5, 60.7, 55.0, 17.8, 14.4, -1.5 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₂₇O₄N₆Si [M+H]⁺: 419.1858, found: 419.1851

ethyl 1-[6-(4-fluorophenyl)-4-methoxy-furo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (52d)

A mixture of **51d** (70 mg, 0.251 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (42 mg, 0.301 mmol), Pd₂(dba)₃ (11 mg, 0.0126 mmol), ^tBuXPhos (11 mg, 0.0251 mmol), and K₃PO₄ (80 mg, 0.377 mmol) in ^tBuOH (2 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–70/30–60/40) to afford **52d** (95 mg, 99%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.09 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.84–7.79 (m, 2H), 7.20–7.15 (m, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.27 (s, 3H), 1.40 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 168.2, 164.4, 163.4 (d, *J* = 250.5 Hz), 162.6, 153.9, 150.6, 143.8, 132.5, 126.9 (d, *J* = 7.7 Hz), 125.3 (d, *J* = 3.1 Hz), 117.5, 116.3 (d, *J* = 22.3 Hz), 104.9, 97.1 (d, *J* = 1.5 Hz), 60.7, 55.1, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₁₆O₄N₄F [M+H]⁺: 383.1150, found: 383.1143

ethyl 1-(4-methoxy-6-phenyl-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (52e)

A mixture of **51e** (52 mg, 0.188 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (32 mg, 0.226 mmol), Pd₂(dba)₃ (9 mg, 0.00940 mmol), ^tBuXPhos (8 mg, 0.0188 mmol), and K₃PO₄ (60 mg, 0.282 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was

extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–60/40) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) to afford **52e** (48 mg, 67%).

¹H NMR (CHLOROFORM-d, 400MHz): δ = 9.09 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.71–7.68 (m, 2H), 7.48–7.43 (m, 2H), 7.41–7.37 (m, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.27 (s, 3H), 1.41 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CHLOROFORM-d, 100MHz): δ = 168.9, 164.6, 162.7, 150.6, 143.8, 143.2, 133.2, 132.6, 129.2, 129.0, 126.5, 119.1, 117.4, 113.2, 60.7, 54.8, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₁₇O₃N₄S (M+H)⁺: 381.1016, found: 383.1004

ethyl 1-(4-methoxy-5-methyl-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (52f)

A mixture of **51f** (50 mg, 0.253 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (43 mg, 0.304 mmol), Pd₂(dba)₃ (23 mg, 0.00253 mmol), ^tBuXPhos (21 mg, 0.0506 mmol), and K₃PO₄ (81 mg, 0.380 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–30/70–0/100) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 50/50–10/90–0/100) to afford **52f** (49 mg, 64%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.05 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 1.39 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 163.1, 157.3, 151.5, 148.1, 143.0, 134.9, 132.1, 116.5, 114.6, 102.7, 60.5, 54.1, 36.4, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₄H₁₆O₃N₅ [M+H]⁺: 302.1248, found: 302.1244

ethyl 1-[6-(4-chlorophenyl)-4-methoxy-7-methyl-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (52g)

A mixture of **51g** (51 mg, 0.166 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (28 mg, 0.199 mmol), Pd₂(dba)₃ (8 mg, 0.00827 mmol), ^tBuXPhos (7 mg, 0.0166 mmol), and K₃PO₄ (53 mg, 0.248 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to

ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃/EtOAc = 100/0–99/1–95/5) and NH silica gel column chromatography (Hexane/CHCl₃ = 100/0–50/50) to afford **52g** (29 mg, 43%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.13 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.49–7.44 (m, 4H), 6.59 (s, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.24 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 1.41 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 163.4, 162.9, 153.9, 149.3, 143.4, 139.3, 134.8, 132.5, 130.3, 129.9, 129.1, 116.8, 104.1, 98.7, 60.6, 54.4, 30.7, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₁₉O₃N₅Cl [M+H]⁺: 412.1171, found: 412.1161

ethyl 1-(4-methoxyquinazolin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (52h)

A mixture of **51h** (50 mg, 0.257 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (43 mg, 0.308 mmol), Pd₂(dba)₃ (12 mg, 0.0128 mmol), ^tBuXPhos (11 mg, 0.0257 mmol), and K₃PO₄ (82 mg, 0.385 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–65/35–50/50) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) to afford **52h** (51 mg, 67%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.16 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.87 (ddd, *J* = 8.2, 6.7, 1.5 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.2, 6.7, 1.5 Hz, 1H), 4.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.32 (s, 3H), 1.41 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 169.0, 162.7, 151.6, 151.0, 143.9, 134.7, 132.8, 127.9, 126.8, 123.8, 117.2, 115.3, 60.6, 55.1, 14.4 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₅H₁₅O₃N₄ [M+H]⁺: 299.1139, found: 299.1136

ethyl 1-(1-methoxy-3-isoquinolyl)pyrazole-4-carboxylate (52i)

A mixture of **51i** (50 mg, 0.258 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (43 mg, 0.310 mmol), Pd₂(dba)₃ (12 mg, 0.0129 mmol), ^tBuXPhos (11 mg, 0.0258 mmol), and K₃PO₄ (82 mg, 0.387 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was

cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–85/15) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–85/15) to afford **16i** (67 mg, 87%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.03 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.68 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.0 Hz, 1H), 7.51 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.0 Hz, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.41 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 163.1, 160.8, 143.4, 142.7, 139.3, 131.4, 130.3, 126.9, 126.4, 124.4, 118.7, 116.2, 100.9, 60.5, 54.3, 14.5 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₆O₃N₃ [M+H]⁺: 298.1186, found: 298.1183

ethyl 1-(4-methoxy-1,8-naphthyridin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (52j)

A mixture of **51j** (50 mg, 0.257 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (43 mg, 0.308 mmol), Pd₂(dba)₃ (12 mg, 0.0128 mmol), ^tBuXPhos (11 mg, 0.0258 mmol), and K₃PO₄ (82 mg, 0.385 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–45/55) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 50/50–0/100) to afford **52j** (38 mg, 50%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.44 (s, 1H), 9.06 (dd, *J* = 4.1, 2.1 Hz, 1H), 8.56 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.2, 4.1 Hz, 1H), 4.35 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.20 (s, 4H), 1.39 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 165.2, 162.7, 155.6, 154.4, 153.2, 143.3, 132.0, 131.4, 120.9, 117.7, 115.5, 92.1, 60.6, 56.8, 14.3 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₅H₁₅O₃N₄ [M+H]⁺: 299.1139, found: 299.1135

7-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-pyrazol-1-yl-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (53a)

A mixture of **48** (50 mg, 0.164 mmol), pyrazole (13 mg, 0.197 mmol), Pd₂(dba)₃ (8 mg, 0.00821 mmol), ^tBuXPhos (7 mg, 0.0164 mmol), and K₃PO₄ (52 mg, 0.246 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was

stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–30/70) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–0/100) to afford **53a** (37 mg, 67%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 8.56 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.27–7.21 (m, 2H), 6.87–6.81 (m, 2H), 6.47 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.31 (s, 3H), 3.77 ppm (s, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 159.5, 157.1, 149.7, 146.8, 143.0, 133.6, 129.2, 129.1, 128.7, 120.0, 114.1, 107.9, 55.28, 55.26, 54.7 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₇O₄N₆ [M+H]⁺: 337.1408, found: 337.1403

7-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-(4-methylpyrazol-1-yl)pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (53b)

A mixture of **48** (50 mg, 0.164 mmol), 4-methylpyrazole (16 mg, 0.197 mmol), Pd₂(dba)₃ (8 mg, 0.00821 mmol), 'BuXPhos (7 mg, 0.0164 mmol), and K₃PO₄ (52 mg, 0.246 mmol) in 'BuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–30/70) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–0/100) to afford **53b** (26 mg, 45%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 8.30 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.27–7.21 (m, 2H), 6.87–6.81 (m, 2H), 5.65 (s, 2H), 4.30 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.17 ppm (s, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 159.6, 157.2, 150.0, 146.9, 144.2, 133.5, 129.1, 128.7, 127.5, 119.9, 118.5, 114.1, 55.3, 55.2, 54.6, 9.0 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₉O₂N₆ [M+H]⁺: 351.1564, found: 351.1559

7-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-[4-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (53c)

A mixture of **48** (50 mg, 0.164 mmol), 4-trifluoromethylpyrazole (27 mg, 0.197 mmol), Pd₂(dba)₃ (8

mg, 0.00821 mmol), ^tBuXPhos (7 mg, 0.0164 mmol), and K₃PO₄ (52 mg, 0.246 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–60/40) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–50/50) to afford **53c** (38 mg, 57%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 8.83 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.27–7.21 (m, 2H), 6.87–6.81 (m, 2H), 5.68 (s, 2H), 4.33 (s, 3H), 3.77 ppm (s, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 159.5, 157.3, 148.7, 146.5, 139.6(*q*, *J* = 2.6 Hz), 133.7, 129.1, 128.7(*q*, *J* = 3.9 Hz), 128.5, 122.3(*q*, *J* = 266.6 Hz), 120.3, 115.6(*q*, *J* = 38.5 Hz), 114.2, 55.4, 55.3, 55.0 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₆O₂N₆F₃ [M+H]⁺: 405.1281, found: 405.1272

7-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-(4-nitropyrazol-1-yl)pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (53d)

A mixture of **48** (50 mg, 0.164 mmol), 4-nitrolypyrazole (22 mg, 0.197 mmol), Pd₂(dba)₃ (8 mg, 0.00821 mmol), ^tBuXPhos (7 mg, 0.0164 mmol), and K₃PO₄ (52 mg, 0.246 mmol) in ^tBuOH (1.5 ml) was stirred at 80 °C for 15 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) and silica gel column chromatography (CHCl₃/EtOAc = 100/0–85/15) to afford **18d** (35 mg, 56%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.25 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.27–7.21 (m, 2H), 6.87–6.81 (m, 2H), 5.69 (s, 2H), 4.35 (s, 3H), 3.77 ppm (s, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 159.6, 157.5, 148.0, 146.4, 137.9, 137.2, 133.9, 129.2, 128.3, 128.1, 120.5, 114.2, 55.5, 55.29, 55.26 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₆O₄N₇ [M+H]⁺: 382.1258, found: 382.1252

2-chloro-4-methoxy-5-methyl-thieno[2,3-*d*]pyrimidine (58)

To a solution of **57** (4.79 g, 21.9 mmol) in THF (40 ml) and MeOH (80 ml) was added 28% NaOMe in MeOH (4.40 ml, 21.6 mmol) at 0 °C. After being stirred for 2 h at room temperature, the reaction mixture was evaporated. The precipitate was collected by filtration and washed with water to obtain **58** (4.57 g, 97%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.97–6.91 (m, 1H), 4.15 (s, 3H), 2.53 ppm (s, 3H)

MS(APCI) m/z 350/352 [M+H]⁺

ethyl 1-(4-methoxy-5-methyl-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (59)

A mixture of **58** (4.55 g, 21.2 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (3.56 g, 25.4 mmol), Pd₂(dba)₃ (776 mg, 0.847 mmol), Me₄^tBuXPhos (917 mg, 1.91 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in ^tBuOH (100 ml) was stirred at 90 °C for 9 h under nitrogen atmosphere. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of NH silica gel eluting with CHCl₃ and the eluent was concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with CH₂Cl₂–^tPr₂O to give **29** (5.21 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 9.09 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.45–7.38 (m, 1H), 4.30 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.32 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) m/z 319 [M+H]⁺

1-(5-methyl-4-oxo-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylic acid (56)

To a solution of **59** (270 mg, 0.85 mmol) in CH₃CN (10 ml) was added TMSI (850 mg, 4.24 mmol) at room temperature. After being stirred at 50 °C for 1 h, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water, and the precipitate was collected by filtration and washed with water. To a solution of the obtained solid in THF (1 ml) and EtOH (1 ml) was added 1 M NaOH aq. (1.00 ml, 1.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 40 °C for 1 h, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added 1 M HCl (1.00 ml) at room temperature and the suspension was concentrated *in vacuo*. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **56** (28 mg, 12%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 12.95 (brs, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 2.49 ppm (s, 3H)

MS(ESI) m/z 277 [M+H]⁺

ethyl 1-[5-(bromomethyl)-4-methoxy-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (60)

To a solution of **59** (6.00 g, 18.8 mmol) in CCl₄ (180 ml) were added NBS (3.68 g, 20.7 mmol) and AIBN (309 mg, 1.88 mmol) at room temperature. After being stirred for 4 h under reflux, the mixture was cooled to ambient temperature and evaporated. The residue was purified twice by silica gel column chromatography (first: Hexane/EtOAc = 90/10–50/50, second: CHCl₃/EtOAc = 100/0–97/3) to give **60** (4.81 g, 64%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 9.09 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.31 (s, 3H), 1.41 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) *m/z* 319 [M+H]⁺

ethyl 1-[5-(cyclohexen-1-ylmethyl)-4-methoxy-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (61)

A mixture of **60** (400 mg, 1.01 mmol), cyclohexene-1-boronic acid pinacol ester (416mg, 2.00 mmol), bis(di-*tert*-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II) (36 mg, 0.0508) and K₃PO₄ (640 mg, 3.02 mmol) in dioxane (6 ml) was stirred at 100 °C for 6 h under nitrogen atmosphere. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of the mixture of silica gel and NH silica gel eluting with EtOAc. The eluent was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–30/70) and NH-silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 100/0–50/50) to give **61** (131 mg, 33%) as a colorless powder.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.44–5.37 (m, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.22 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 2.05–1.95 (m, 4H), 1.69–1.52 (m, 4H), 1.40 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) *m/z* 399 [M+H]⁺

ethyl 1-[5-(cyclohexylmethyl)-4-methoxy-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (62)

To a solution of **61** (130 mg, 0.326 mmol) in EtOH (20 ml) was added 10% Pd/C (200 mg) at room temperature. After being stirred for 3 days at room temperature, the insoluble material was removed by filtration and the filtrate was evaporated. The residue was purified by HPLC to give **62** (88 mg, 67%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (s, 3H), 2.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.78–1.53 (m, 6H), 1.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.28–1.14 (m, 3H), 1.08–0.91 ppm (m, 2H)

MS(ESI) *m/z* 401 [M+H]⁺

1-[5-(cyclohexylmethyl)-4-oxo-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (63)

To a solution of **27** (81 mg, 0.202 mmol) in CH₃CN (10 ml) were added NaI (180 mg, 1.20 mmol) and TMSCl (0.13 ml, 1.00 mmol) at room temperature. After being stirred for 30 min at 80 °C, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water, and the precipitate was collected by filtration and washed with water and EtOH. To the suspension of obtained solid in THF (2 ml) and EtOH (2 ml) was added 1 M NaOH aq. (1.00 ml, 2.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 50 °C for 2 h, to the mixture was added 1 M HCl (1.00 ml) at room temperature. The suspension was concentrated *in vacuo* and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **63** (38 mg, 52%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 12.93 (brs, 2H), 8.90 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 2.79 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.72–1.53 (m, 6H), 1.25–1.05 (m, 3H), 1.05–0.86 ppm (m, 2H)

MS(ESI) *m/z* 359 [M+H]⁺

ethyl 1-(5-benzyl-4-methoxy-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylate (64a)

A mixture of **60** (200 mg, 0.503 mmol), phenylboronic acid (71 mg, 0.992 mmol), bis(di-*tert*-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II) (18 mg, 0.0254 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in dioxane (6 ml) was stirred at 100 °C for 6 h under nitrogen atmosphere. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of silica gel eluting with EtOAc and the eluent was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–50/50) and triturated with CH₂Cl₂–*i*Pr₂O to give **64a** (97 mg, 49%) as a colorless powder.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.07 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.38–7.29 (m, 2H), 7.29–7.20 (m, 3H), 6.83–6.79 (m, 1H), 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.19 (s, 3H), 1.40 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) *m/z* 395 [M+H]⁺

1-(5-benzyl-4-oxo-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)pyrazole-4-carboxylic acid (65a)

To a solution of **64a** (93 mg, 0.236 mmol) in CH₃CN (2 ml) were added NaI (212 mg, 1.41 mmol) and TMSCl (0.15 ml, 1.18 mmol) at room temperature. After being stirred for 20 min at 80 °C, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water and the precipitate was collected by filtration and washed with water. To the suspension of obtained solid in THF (1 ml) and EtOH (1 ml) was added 1 M NaOH aq. (2.00 ml, 4.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 40 °C for 1 h, to the mixture was added 1 M HCl (2.00 ml) at 0 °C. The suspension was concentrated *in vacuo*, and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **65a** (51 mg, 61%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.96 (brs, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.35–7.25 (m, 4H), 7.23–7.15 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.29 ppm (s, 2H)

MS(ESI) m/z 353 [M+H]⁺

ethyl 1-[4-methoxy-5-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (64b)

A mixture of **60** (200 mg, 0.50 mmol), 4-trifluoromethyl phenylboronic acid (190mg, 1.00 mmol), bis(di-tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II) (18 mg, 0.0254 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in dioxane (6 ml) was stirred at 100 °C for 6 h under nitrogen atmosphere. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of the mixture of silica gel and NH silica gel eluting with EtOAc. The eluent was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–20/80) and NH-silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–70/30) to give **64b** (61 mg, 26%) as a colorless powder.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.93 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.38 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) m/z 463 [M+H]⁺

1-[4-oxo-5-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (65b)

To a solution of **64b** (53 mg, 0.115 mmol) in CH₃CN (5 ml) were added NaI (103 mg, 0.687 mmol) and TMSCl (0.073 ml, 0.575 mmol) at room temperature. After being stirred for 20 min at 80 °C, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water and the precipitate was

collected by filtration and washed with water and EtOH. To the suspension of obtained solid in THF (1 ml) and EtOH (1 ml) was added 1 M NaOH aq. (2.00 ml, 2.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 1 h, to the mixture was added 1 M HCl (2.00 ml) at room temperature. The suspension was concentrated *in vacuo*, and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **65b** (32 mg, 78%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 8.89 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.39 ppm (s, 2H)

MS(ESI) *m/z* 421 [M+H]⁺

ethyl 1-[4-methoxy-5-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (64c)

A mixture of **60** (200 mg, 0.50 mmol), 2-trifluoromethyl phenylboronic acid (190mg, 1.00 mmol), bis(di-*tert*-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II) (18 mg, 0.0254 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in dioxane (6 ml) was stirred at 100 °C for 6 h under nitrogen atmosphere. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of the mixture of silica gel and NH silica gel eluting with EtOAc. The eluent was concentrated *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–20/80) and NH-silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–70/30) to give **64c** (72 mg, 31%) as a colorless powder.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 9.07 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.40 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) *m/z* 463 [M+H]⁺

1-[4-oxo-5-[[2-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (65c)

To a solution of **64c** (61 mg, 0.132 mmol) in CH₃CN (5 ml) were added NaI (119 mg, 0.792 mmol) and TMSCl (0.084 ml, 0.662 mmol) at room temperature. After being stirred for 20 min at 80 °C, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water and the precipitate was collected by filtration and washed with water and EtOH. To the suspension of obtained solid in THF (1 ml) and EtOH (1 ml) was added 1 M NaOH aq. (2.00 ml, 2.00 mmol) at room temperature. After

being stirred at 60 °C for 1 h, to the mixture was added 1 M HCl (2.00 ml) at room temperature. The suspension was concentrated *in vacuo*, and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **65c** (37 mg, 72%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 8.93 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.76 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.29 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.50 ppm (s, 2H)

MS(ESI) *m/z* 421 [M+H]⁺

ethyl 1-[4-methoxy-5-[(4-phenylphenyl)methyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (64d)

A mixture of **60** (200 mg, 0.503 mmol), 4-phenylphenylboronic acid (200mg, 1.01 mmol), bis(di-tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II) (18 mg, 0.0254 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in dioxane (6 ml) was stirred at 100 °C under nitrogen atmosphere overnight. After being cooled to ambient temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of the mixture of silica gel and NH silica gel eluting with EtOAc. The eluent was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–60/40) and triturated with CH₂Cl₂–*i*Pr₂O to give **64d** (169 mg, 71%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 9.09 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.71–7.56 (m, 4H), 7.56–7.28 (m, 6H), 4.36–4.24 (m, 4H), 4.19 (s, 3H), 1.32 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) *m/z* 471 [M+H]⁺

1-[4-oxo-5-[(4-phenylphenyl)methyl]-3*H*-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (65d)

To a solution of **64d** (143 mg, 0.304 mmol) in CH₃CN (6 ml) were added NaI (273 mg, 1.82 mmol) and TMSCl (0.19 ml, 1.52 mmol) at room temperature. After being stirred for 10 min at 80 °C, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added water and the precipitate was collected by filtration and washed with water. To the suspension of obtained solid in THF (2 ml) and EtOH (2 ml) was added 1 M NaOH aq. (2.00 ml, 4.00 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 30 min, to the mixture was added 1 M HCl (2.00 ml) at 0 °C. The suspension was concentrated *in vacuo*, and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **65d** (119 mg, 91%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.96 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.68–7.52 (m, 4H),

7.49–7.28 (m, 5H), 7.20 (s, 1H), 4.33 ppm (s, 2H)

MS(ESI) m/z 429 $[M+H]^+$

2-chloro-4-methoxy-5H-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine (67)

To a solution of **66** (188 mg, 1.00 mmol) in THF (2 ml) and MeOH (2 ml) was added 28% NaOMe in MeOH (197 mg, 1.02 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature overnight, the reaction mixture was evaporated. The precipitate was collected by filtration and washed with water to obtain **67** (128 mg, 70%).

^1H NMR (DMSO- d_6 + CDCl_3 , 400 MHz): δ = 11.20 (brs, 1H), 7.46–7.41 (m, 1H), 6.55–6.50 (m, 1H), 4.16 ppm (s, 3H)

MS(APCI) m/z 184/186 $[M+H]^+$

2-chloro-4-methoxy-5-[(4-phenylphenyl)methyl]pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine (68)

A mixture of **67** (69 mg, 0.376 mmol), 4-phenyl benzyl bromide (121 mg, 0.489 mmol) and potassium carbonate (104 mg, 0.752 mmol) in CH_3CN (4 ml) was stirred at room temperature for 5 h. To the mixture was added water and the mixture was extracted with CHCl_3 . The organic phase was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20–65/35) and the resulting solid was triturated with CH_2Cl_2 – $i\text{Pr}_2\text{O}$ to give **68** (110 mg, 84%) as a colorless powder.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 7.97 (d, J = 3.1, 1H), 7.67–7.55 (m, 4H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.39–7.32 (m, 1H), 7.31–7.25 (m, 2H), 6.59 (d, J = 3.1, 1H), 5.58 (s, 2H), 4.06 ppm (s, 3H)

MS(APCI) m/z 350/352 $[M+H]^+$

ethyl 1-[4-methoxy-5-[(4-phenylphenyl)methyl]pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylate (69)

A mixture of **68** (86 mg, 0.246 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (86 mg, 0.615 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (11 mg, 0.0123 mmol), $\text{Me}_4\text{tBuXPhos}$ (18 mg, 0.0369 mmol) and K_3PO_4 (78 mg, 0.369 mmol) in $t\text{BuOH}$ (2.5 ml) was stirred at 130 °C under microwave irradiation for 2 h. After being cooled to ambient temperature, to the mixture was added water and the mixture was extracted with CHCl_3 . The organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20–45/55–40/60) and the resulting solid was

trituted with CH₂Cl₂-iPr₂O to give **69** (77 mg, 69%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 9.02 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 3.1, 1H), 7.66–7.58 (m, 4H), 7.48–7.40 (m, 2H), 7.38–7.28 (m, 3H), 6.68 (d, *J* = 3.1, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.28 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.18 (s, 3H), 1.31 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) *m/z* 454 [M+H]⁺

1-[4-oxo-5-[(4-phenylphenyl)methyl]-3H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-2-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (70)

To the suspension of **69** in THF (1.5 ml) and EtOH (1.5 ml) were added 2 M NaOH aq. (3.00 ml, 6.00 mmol) and 6 M NaOH aq. at room temperature. After being stirred at 80 °C overnight, to the mixture was added 6 M NaOH aq. (1.50 ml, 9.00 mmol), THF (1ml) and EtOH (1 ml) at room temperature. After being stirred at 80 °C for 4.5 h, the suspension was concentrated *in vacuo*. To the residue were added 6 M NaOH aq. (1.00 ml, 6.00 mmol), THF (3ml) and MeOH (3 ml) and the mixture was stirred at 75 °C overnight. After the mixture was concentrated *in vacuo*, the residue was suspended to water and the suspension was neutralized with 1 M HCl. The precipitate was collected by filtration, purified by silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH = 97/13–80/20) and purified by HPLC. The residue was suspended to CHCl₃/MeOH and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The precipitate was suspended to 2 M HCl and collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **70** (27 mg, 40%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.67 (brs, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 2.1, 1H), 7.66–7.57 (m, 4H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.40–7.30 (m, 3H), 7.47 (d, *J* = 2.1, 1H), 5.67 ppm (s, 2H)

MS(APCI) *m/z* 412[M+H]⁺

ethyl 1-(7-methoxy-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)pyrazole-4-carboxylate (71)

52a (44.6 g, 109 mmol) was dissolved in trifluoroacetic acid (165 ml) and the solution was stirred at 60 °C overnight. After the reaction mixture was cooled to ambient temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. To the suspension of the residue in EtOH (200ml) was added triethylamine (100 ml) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with 200 ml of EtOH twice. To the suspension of solid obtained above in CHCl₃ (300 ml) and the mixture was stirred at room temperature overnight. The precipitate was collected by filtration and washed with 100 ml of CHCl₃ twice and dried under pressure to

afford **71** (25.2 g, 80%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 14.39 (brs, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 4.29 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.28 (s, 3H), 1.32 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) *m/z* 289 [M+H]⁺

1-[7-oxo-1-[(4-phenylphenyl)methyl]-6H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (72)

A mixture of **71** (346 mg, 1.20 mmol), 4-phenyl benzyl bromide (386 mg, 1.56 mmol) and potassium carbonate (332 mg, 2.40 mmol) in CH₃CN (12 ml) was stirred at 80 °C for 3 h. After it was cooled to ambient temperature, to the mixture was added water and the mixture was extracted with CHCl₃. The organic phase was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (SiO₂, Hexane/EtOAc = 65/35–45/55–40/60) and the resulting solid was collected by filtration and washed with ⁴Pr₂O. To the solution of the obtained solid in THF (5 ml) and EtOH (5 ml) was added 2 M NaOH aq. (5.00 ml, 10.0 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 1.5 h, the mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was added 2 M HCl (5.20 ml), and the precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **72** (205 mg, 43%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.96 (brs, 2H), 8.87 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.66–7.60 (m, 4H), 7.48–7.42 (m, 2H), 7.39–7.32 (m, 3H), 5.81 ppm (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 162.8, 153.2, 143.0, 142.4, 139.7, 139.6, 138.4, 136.1, 133.1, 131.6, 128.8, 128.1, 127.4, 126.9, 126.6, 123.8, 118.3, 53.7 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₁₇O₃N₆ [M+H]⁺: 413.1357, found: 413.1346

HPLC: 99.86% (*t_R* = 2.796 min, column: Sumipax ODS D-210SLP (3μm, 4.6x50mm, Serial No. D210SLP231), eluent: 0.05% TFA in MeCN/0.05 % TFA in H₂O=50/50)

mp: 321.5–322 °C

1-[7-oxo-2-[(4-phenylphenyl)methyl]-6H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (73)

A mixture of **71** (144 mg, 0.50 mmol), 4-phenyl benzyl bromide (161 mg, 0.65 mmol) and potassium carbonate (173 mg, 1.25 mmol) in CH₃CN (4 ml) was stirred at 80 °C for 2.5 h. After it was cooled to ambient temperature, to the mixture was added water and the mixture was extracted

with CHCl_3 . The organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20–60/40–40/60–20/80–0/100). To the residue was added CH_2Cl_2 and $^i\text{Pr}_2\text{O}$, and the precipitate was collected by filtration and washed with $^i\text{Pr}_2\text{O}$. To the solution of obtained solid in THF (2 ml) and EtOH (2 ml) was added 2 M NaOH aq. (2.00 ml, 4.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 2 h, the mixture was cooled to ambient temperature and to the mixture was added 2 M HCl (2.20 ml). The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **73** (65 mg, 32%) as a colorless powder.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ = 12.95 (brs, 1H), 12.32 (brs, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.70–7.61 (m, 4H), 7.50–7.41 (m, 4H), 7.40–7.33 (m, 1H), 5.62 ppm (s 2H)

MS(APCI) m/z 413 $[\text{M}+\text{H}]^+$

The isomers **72** and **73** are distinguished by the NOESY. In the case of **73**, the NOESY was observed between the benzyl proton (5.62 ppm) and the scaffold pyrazole proton (8.58 ppm). But it was not observed in **72** (5.81, 8.23 ppm).

ethyl 1-[1-[(4-bromophenyl)methyl]-7-methoxy-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (83a**)**

To a mixture of **71** (308 mg, 1.07 mmol), 4-bromophenylmethanol (300 mg, 1.60 mmol) and triphenylphosphine (560 mg, 2.14 mmol) in THF (8 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (1.12 ml, 2.14 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–75/25–70/30–65/35) to give **83a** (330 mg, 67%).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 9.02 (s, 1H), 8.20–8.15 (m, 2H), 7.50–7.40 (m, 2H), 7.18–7.11 (m, 2H), 5.69 (s, 2H), 4.36 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.31 (s, 1H), 1.40 ppm (t, J = 7.2 Hz, 3H)

MS(ESI) m/z 457/459 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ethyl 1-[1-[[4-(2-fluorophenyl)phenyl]methyl]-7-methoxy-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (84a**)**

A mixture of **83a** (335 mg, 0.733 mmol), (2-fluorophenyl)boronic acid (205 mg, 1.47 mmol), bis(di-

tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichlorolalladium(II) (52mg, 0.0733 mmol) and K_3PO_4 (467 mg, 2.20 mmol) in dioxane (7 ml) was stirred at 100 °C under nitrogen atmosphere. After being stirred overnight, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with $CHCl_3$. The organic phase was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20–50/50), which was recrystallized from CH_2Cl_2 and iPr_2O to give **84a** (291 mg, 84%).

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.55–7.45 (m, 3H), 7.45–7.34 (m, 3H), 7.34–7.24 (m, 2H), 5.82 (s 2H), 4.31 (s, 3H), 4.29 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.32 ppm (t, J = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) m/z 473 $[M+H]^+$

1-[1-[[4-(2-fluorophenyl)phenyl]methyl]-7-oxo-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (74)

To the solution of **84a** (256mg, 0.542 mmol) in THF (2 ml) and EtOH (2 ml) was added 1 M NaOH aq. (1.60 ml, 1.60 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 6.5 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was neutralized with 1 M HCl (1.65 ml). The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **74** (242 mg, quant.) as a colorless powder.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 12.92 (brs, 2H), 8.86 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.55–7.45 (m, 3H), 7.45–7.34 (m, 3H), 7.34–7.24 (m, 2H), 5.83 ppm (s 2H)

MS(APCI) m/z 431 $[M+H]^+$

ethyl 1-[1-[(4-bromo-3-fluoro-phenyl)methyl]-7-methoxy-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (83b)

To a mixture of **71** (400 mg, 1.39 mmol), (4-bromo-3-fluoro-phenyl)methanol (427 mg, 2.08 mmol) and triphenylphosphine (728 mg, 2.78 mmol) in THF (8 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (913 μ l, 2.78 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 4 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20–50/50), which was recrystallized from CH_2Cl_2 and iPr_2O to give **83b** (364 mg, 55%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.67 (dd, *J*=9.8, 8.2 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 9.8, 2.1 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 5.77 (s, 2H), 4.30 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.27 (s, 3H), 1.32 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) *m/z* 475/477 [M+H]⁺

ethyl 1-[1-[[3-fluoro-4-(2-fluorophenyl)phenyl]methyl]-7-methoxy-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylate (84b**)**

A mixture of **83b** (120 mg, 0.252 mmol), (2-fluorophenyl)boronic acid (71 mg, 0.507 mmol), bis(di-tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichlorolalladium(II) (9 mg, 0.0127 mmol) and K₃PO₄ (161 mg, 0.758 mmol) in dioxane (3 ml) was stirred at 100 °C under nitrogen atmosphere. After being stirred overnight, the reaction mixture was cooled to ambient temperature. The reaction mixture was filtered through a pad of silica gel eluting with EtOAc and the eluent was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 85/15–50/50) and triturated with ^tPr₂O to give **84b** (106 mg, 86%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 9.08 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.73–7.38 (m, 3H), 7.37–7.14 (m, 4H), 5.85 (s, 2H), 4.30 (s, 3H), 4.30 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.32 ppm (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

MS(APCI) *m/z* 491 [M+H]⁺

1-[1-[[3-fluoro-4-(2-fluorophenyl)phenyl]methyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (75**)**

To a solution of **84b** (100mg, 0.204 mmol) in THF (2 ml) and EtOH (2 ml) was added 2 M NaOH aq. (2.00 ml, 4.00 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 2 h, the reaction mixture was cooled to ambient temperature. To the mixture was 2 M HCl (2.05 ml) at 0 °C and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was added water and the precipitate was collected by filtration. The obtained powder was washed with water and Et₂O, and dried under reduced pressure to afford **75** (86 mg, 94%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 8.87 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.52–7.39 (m, 3H), 7.36–7.27 (m, 2H), 7.26–7.16 (m, 2H), 5.85 ppm (s, 2H)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): δ = 162.8, 159.0 (d, *J* = 246.4 Hz), 158.8 (d, *J* = 246.2 Hz), 153.3, 143.0, 142.5, 139.7 (d, *J* = 7.6 Hz), 138.4, 133.4, 131.8 (d, *J* = 3.0 Hz), 131.6, 131.5 (d, *J* = 2.2 Hz), 130.4 (d, *J* = 8.3 Hz), 124.6 (d, *J* = 3.3 Hz), 124.0, 123.7 (d, *J* = 3.0 Hz), 122.2 (d, *J* = 15.5 Hz),

122.1 (d, $J = 16.1$ Hz), 115.6 (d, $J = 23.0$ Hz), 118.3, 114.7 (d, $J = 23.1$ Hz), 53.2 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{22}H_{15}O_3N_6F_2$ $[M+H]^+$: 449.1168, found: 449.1158

HPLC: 99.26% ($t_R = 26.415$ min, column: GL Sciences Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm), eluent: 0.05%TFA in H_2O /0.05%TFA in CH_3CN (95:5-0:100/40min))

1-[1-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]-7-oxo-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (76)

To a mixture of **71** (317 mg, 1.10 mmol), 3, 4-dichlorophenylmethanol (331 mg, 1.87 mmol) and triphenylphosphine (722 mg, 2.75 mmol) in THF (11 ml) was added 2.2 M diethyl azodicarboxylate in toluene (1.20 ml, 2.64 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature overnight, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 60/40–35/65). The residue was added iPr_2O and the precipitate was collected by filtration. To the solution of obtained solid in THF (5 ml) and EtOH (5 ml) was added 2 M NaOH aq. (5.00 ml, 10.0 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 1.5 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was neutralized with 1 M HCl (5.20 ml). The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **76** (208 mg, 47%) as a colorless powder.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 12.98$ (brs, 2H), 8.86 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 5.78 ppm (s, 2H)

MS(APCI) m/z 405/407 $[M+H]^+$

1-[1-[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (80)

To a mixture of **71** (555 mg, 1.93 mmol), (1R)-1-(3, 4-dichlorophenyl)ethanol (552 mg, 2.89 mmol) and triphenylphosphine (1.01 g, 3.85 mmol) in THF (10 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (2.02 ml, 3.85 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography (SiO₂, Hexane/EtOAc = 90/10–55/45) and NH-silica gel column chromatography (90/10–70/30). To the solution of the resulting residue in THF (4 ml) and EtOH (4 ml) was added 1 M NaOH aq. (7.33 ml, 7.33 mmol) at room temperature. After being stirred at

60 °C for 1 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was neutralized with 1 M HCl. The precipitate was collected by filtration, recrystallized from hot THF (3 ml) and EtOH (3 ml), and washed with THF/EtOH (1/1) to give **80** containing EtOH, which was suspended in water (4ml) and THF (0.8 ml) for 1 h to remove EtOH and filtered. The obtained cake was dried under air blow at 50 °C to afford **80** (218 mg, 27%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.90 (brs, 2H), 8.84 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 1H) 6.46 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.90 ppm (d, *J*=6.9 Hz, 3H)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 162.8, 153.3, 143.0, 142.7, 142.5, 138.4, 133.0, 131.6, 131.0, 130.7, 130.3, 128.5, 126.7, 123.7, 118.2, 57.7, 20.3 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₃O₃N₆Cl₂ [M+H]⁺: 419.0421, found: 419.0410

HPLC: 99.53% (*t_R* = 27.370 min, column: column: GL Sciences Inertsil ODS-3 (3 μm, 4.6×150 mm), eluent: 0.05%TFA in H₂O/0.05%TFA in CH₃CN (95:5–0:100/40 min))

Enantiomer excess: 99.60%ee (*t_R* = 16.923 min, column: Daisel CHIRALPAK IC-3 (4.6×150 mm), eluent: Hexane/ⁱPrOH/AcOH=85/15/0.5)

1-[1-[(1*R*)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (81**)**

To a mixture of **71** (200 mg, 0.694 mmol), (1*S*)-1-(3, 4-dichlorophenyl)ethanol (199 mg, 1.04 mmol) and triphenylphosphine (364 mg, 1.39 mmol) in THF (4 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (730 μl, 1.39 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1.5 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–65/35) and NH-silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–65/35). The residue was added ⁱPr₂O and the precipitate was collected by filtration. To the solution of the obtained solid in THF (3 ml) and EtOH (3 ml) was added 1 M NaOH aq. (3.01 ml, 3.01 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 1 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was neutralized with 1 M HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **80** (125 mg, 45%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.90 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H), 6.48 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.91 ppm (d, *J* = 7.2 Hz, 1H)

MS(APCI) *m/z* 419/421 [M+H]⁺

Enantiomer excess: 99.82%*ee* (*t_R* = 13.163 min, column: Daisel CHIRALPAK IC-3 (4.6×150 mm), eluent: Hexane/ⁱPrOH/AcOH=85/15/0.5)

1-[1-[(1*S*)-1-(2,5-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (16**)**

To a mixture of **71** (250 mg, 0.867 mmol), (1*R*)-1-(2, 5-dichlorophenyl)ethanol (206 mg, 1.30 mmol) and triphenylphosphine (455 mg, 1.73 mmol) in THF (5 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (913 μl, 1.73 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20) and NH-silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 80/20). To the solution of the resulting residue in THF (4 ml) and EtOH (4 ml) was added 1 M NaOH aq. (4.73 ml, 4.73 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 3 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was added 1 M HCl (4.80 ml). The precipitate was collected by filtration, recrystallized from THF (2 ml) and EtOH (5 ml), washed with water and dried under reduced pressure to afford **16** (133 mg, 37%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.92 (brs, 2H), 8.86 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H) 7.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.76 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.87 ppm (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 162.8, 152.9, 143.1, 142.5, 140.9, 138.5, 133.2, 132.0, 131.6, 131.2, 130.4, 129.3, 127.2, 123.9, 118.3, 56.0, 19.8 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₃O₃N₆Cl₂ [M+H]⁺: 419.0421, found: 419.0410

HPLC: 99.86% (*t_R* = 8.871 min, column: Waters ACQUITY BEH C18 (1.7 μm, 2.1×100 mm), eluent: 0.05%TFA in H₂O/0.05%TFA in CH₃CN (98:2–0:100/15 min))

Enantiomer excess: 99.70%*ee* (*t_R* = 9.923 min, column: Daisel CHIRALPAK IC-3 (4.6×150 mm), eluent: Hexane/EtOH/AcOH=70/30/0.5)

1-[1-[(1*S*)-1-(2-chloro-4-fluoro-phenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (82**)**

To a mixture of **71** (200 mg, 0.694 mmol), (1*R*)-1-(2-chloro-4-fluorophenyl)ethanol (182 mg, 1.04 mmol) and triphenylphosphine (364 mg, 1.39 mmol) in THF (4 ml) was added 1.9 M diisopropyl azodicarboxylate in toluene (632 μ l, 1.39 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–70/30–60/40). To the solution of the obtained solid in THF (3 ml) and EtOH (3 ml) was added 1 M NaOH aq. (2.85 ml, 2.85 mmol) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 1 h, the mixture was cooled to ambient temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was added 1 M HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried under reduced pressure to afford **82** (94 mg, 34%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ = 12.89 (brs, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.46(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.30–7.13 (m, 2H) 6.76 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.85 ppm (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)

MS(APCI) *m/z* 403/405 [M+H]⁺

ethyl *N*-[*N'*-(1-phenylpyrazol-4-yl)-*N*-propyl-carbamimidoyl]carbamate (95**)**

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (132mg, 0.829 mmol) in CHCl₃ (3 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (120 mg, 0.912 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1 h, to the mixture were added WSCI (191 mg, 1.20 mmol), Et₃N (0.346 ml, 2.49 mmol) and *n*-propylamine (0.0818 ml, 0.995 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 4 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–50/50) to give **95** as a pale yellow gum (207 mg, 79%).

¹H NMR (400 M Hz, CDCl₃) δ = 10.35 (brs, 1H), 7.93(s, 1H), 7.71–7.63 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.52–7.45 (m, 2H), 7.39–7.32 (m, 1H), 4.71 (brs, 1H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.53 (sextet, 2H, *J* = 7.3 Hz), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.90 ppm (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 164.8, 159.7, 139.7, 138.2, 129.6, 127.21, 123.7, 120.2, 119.0, 60.9, 42.9, 22.8, 14.7, 11.3 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₂₂N₅O₂ [M+H]⁺ : 316.1768, found: 316.1762

1-phenyl-5-(propylamino)-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one (96)

A mixture of **95** (50 mg, 0.16 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.10 ml, 0.79 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, to the mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with EtOAc three times. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–92/8) to give **96** (33 mg, 77%) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.94 (brs, 1H), 7.92(s, 1H), 7.66–7.60 (m, 2H), 7.54–7.43 (m, 2H), 7.40–7.33 (m, 1H), 6.16 (brs, 1H), 3.24 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.55 (sextet, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.90 ppm (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 M Hz, DMSO-d₆) δ = 164.8, 159.7, 139.7, 138.2, 129.6, 127.21, 123.7, 120.2, 119.0, 60.9, 42.9, 22.8, 14.7, 11.3 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₄H₁₆N₃O [M+H]⁺ : 270.1349, found: 270.1346.

1-phenyl-5-(1-piperidyl)-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one (106a)

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (101mg, 0.634 mmol) in CHCl₃ (2 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (92 mg, 0.70 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 1 h, to the mixture were added WSCI (146 mg, 0.761 mmol), Et₃N (0.27 ml, 1.90 mmol) and piperidine (0.075 ml, 0.76 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 3 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 90/10–25/75) to give **105a** (147 mg, 68%). A mixture of **105a** (50 mg, 0.15 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.094 ml, 0.73 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, to the mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with EtOAc and EtOAc/THF (1/1) three times respectively. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–93/7–90/10–85/15) to give **106a** (39 mg, 90%, 61% from 1-phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.31 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.77–7.66 (m, 2H), 7.55–7.44 (m,

2H), 7.41–7.34 (m, 1H), 3.64–3.45 (m, 4H), 1.67–1.47 ppm (m, 6H)

^{13}C NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ = 154.0, 151.8, 144.2, 139.4, 133.5, 128.4, 126.9, 123.5, 119.8, 46.6, 24.9, 23.8 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 296.1506, found: 296.1470

5-(4-methylanilino)-1-phenyl-6H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one (106b)

6-methyl-2-[(1-phenylpyrazol-4-yl)amino]-3H-quinazolin-4-one (106c)

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (100mg, 0.628 mmol) in CHCl_3 (2 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (91 mg, 0.69 mmol). After the reaction was stirred at room temperature for 1 h, the mixture was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (41 mg, 0.31 mmol) again and stirred at room temperature for an additional 1 h. After the reaction was completed, to the mixture were added WSCI (145 mg, 0.754 mmol), Et_3N (0.26 ml, 1.88 mmol) and *p*-toluidine (81 mg, 0.75 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature overnight, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl_3 twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–75/25–70/30). The resulting residue was crystallized with EtOAc to give crude **105b** as a colorless solid (192 mg, 84%). A mixture of **105b** (51 mg, 0.14 mmol), chlorotrimethylsilane (0.090 ml, 0.70 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, to the mixture was added saturated aqueous NaHCO_3 and the resulting mixture was extracted with EtOAc/THF (1/1) three times. The combined organic phases were washed with brine and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–80/20–70/30) to give the mixture of **106b** and **106c** (43 mg, 97%, 81% from 1-phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

MS(ESI) m/z 318 $[\text{M}+\text{H}]^+$

106b

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.96 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.78–7.69 (m, 2H), 7.60–7.46 (m, 4H), 7.44–7.36 (m, 1H), 7.21–7.11 (m, 2H), 2.28 ppm (s, 3H)

^{13}C NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ = 152.7, 147.9, 143.6, 139.3, 136.4, 133.8, 131.2, 129.1, 128.4, 127.1, 123.7, 120.8, 119.1, 20.3 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 318.1349, found: 318.1345

106c

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.98 (brs, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.92–7.78 (m, 3H), 7.59–7.39 (m, 4H), 7.35–7.25 (m, 1H), 2.38 ppm (s, 3H)

¹³C NMR (150MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.2, 148.7, 139.7, 134.9, 133.4, 131.0, 129.4, 125.5, 125.2, 125.0, 124.7, 117.6, 117.6, 116.7, 88.4, 20.5 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₆N₅O [M+H]⁺ : 318.1349, found: 318.1344

1-phenyl-5-pyrazol-1-yl-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one (106d)

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (152mg, 0.955 mmol) in CHCl₃ (3 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (151 mg, 1.15 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 2 h, to the mixture were added WSCI (219 mg, 1.15 mmol), Et₃N (0.40 ml, 2.86 mmol) and pyrazole (78 mg, 1.15 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 5 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–55/45) to give crude **105d** (137 mg, 44%). A mixture of **105d** (50 mg, 0.15 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.099 ml, 0.77 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, the mixture was purified by HPLC (Capcellpak C18 UG80 Φ20mm*250mm 5μm, 0.05%TFA-H₂O/0.05%TFA-CH₃CN = 58/42–48/52) to give **106d** (39 mg, 91%, 40% from 1-phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.62 (s, 1H), 8.63 (dd, *J* = 2.7, 0.64 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.77–7.69 (m, 2H), 7.59–7.51 (m, 2H), 7.50–7.43 (m, 1H), 6.69 ppm (dd, *J* = 2.7, 1.7 Hz, 1H)

¹³C NMR (100MHz, DMSO-*d*₆) δ = 152.3, 143.3, 143.0, 140.8, 138.9, 134.7, 128.9, 128.5, 127.7, 124.4, 123.4, 109.7 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₄H₁₁N₆O [M+H]⁺ : 279.0989, found: 279.0989

5-imidazol-1-yl-1-phenyl-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one (106e)

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (201mg, 1.26 mmol) in CHCl₃ (4 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (199 mg, 1.52 mmol) at room temperature. After the reaction was stirred at room temperature for 1 h, the mixture was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (83 mg,

0.63 mmol) again and stirred at room temperature for additional 1 h. After the reaction was completed, to the mixture were added WSCI (290 mg, 1.52 mmol), Et₃N (0.70 ml, 5.05 mmol) and imidazole (103 mg, 1.52 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 2.5 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/10–90/10) to give crude **105e** (265 mg, 65%). A mixture of **105e** (50 mg, 0.15 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.099 ml, 0.77 mmol) in NMP (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to ambient temperature, to the mixture was added Et₃N (0.11 ml, 0.77 mmol) and the resulting mixture was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–50/50, and EtOAc/MeOH = 100/0–65/35) to give **106e** (44 mg, 97%, 63% from 1-phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.59 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.80–7.71 (m, 2H), 7.58–7.47 (m, 2H), 7.46–7.38 (m, 1H), 7.15 ppm (s, 1H)

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ = 155.8, 144.8, 142.2, 139.3, 135.7, 134.4, 128.9, 128.4, 127.2, 124.2, 123.7, 117.3 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₄H₁₁N₆O [M+H]⁺ : 279.0989, found: 279.0985

1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-(propylamino)-6H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one (106f)

To a solution of 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]pyrazol-4-amine (200 mg, 0.984 mmol) in CHCl₃ (4 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (155 mg, 1.18 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1 h, to the mixture were added WSCI (226 mg, 1.18 mmol), Et₃N (0.410 ml, 2.95 mmol) and *n*-propylamine (0.0971 ml, 1.18 mmol) at 50 °C. After being stirred at room temperature for 1.5 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ three times. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–40/60) to give **105f** (296 mg, 78%). A mixture of **105f** (50 mg, 0.14 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.089 ml, 0.70 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, to the mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with EtOAc/THF (1/1) three times. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The filtrate was concentrated under reduced

pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–90/10) to give **106f** (37 mg, 85%, 66% from 1-[(4-methoxyphenyl)methyl]pyrazol-4-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.76 (brs, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.23–7.14 (m, 2H), 6.90–6.81 (m, 2H), 6.03–5.94 (m, 1H), 5.52 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.18 (sextet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 0.88 ppm (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ = 158.6, 153.9, 150.7, 142.3, 130.6, 129.5, 128.9, 120.2, 113.7, 55.0, 53.2, 42.1, 21.9, 11.2 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₂₀N₅O₂ [M+H]⁺ : 314.1612, found: 314.1606

2-(propylamino)-3*H*-thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-one (**106g**)

To a suspension of thiophene-3-amine hydrochloride (200 mg, 1.48 mmol) in CHCl₃ (4 ml) was added Et₃N (0.225 ml, 1.62 mmol) and ethoxycarbonyl isothiocyanate (232 mg, 1.77 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1 h, to the mixture were added WSCI (339 mg, 1.77 mmol), Et₃N (0.820 ml, 5.90 mmol) and *n*-propylamine (0.146 ml, 1.77 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–70/30) to give **105g** (190 mg, 50%). A mixture of **105g** (53 mg, 0.21 mmol) and chlorotrimethylsilane (0.13 ml, 1.0 mmol) in DMF (2 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to room temperature, to the mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with EtOAc/THF (1/1) three times. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH = 100/0–85/15) to give **106g** (39 mg, 90%, 45% from thiophene-3-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.80 (brs, 1H), 7.95 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 6.26 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.24 (dt, *J* = 7.1, 5.7 Hz, 2H), 1.54 ppm (sextet, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ = 164.6, 159.0, 134.8, 126.9, 125.0, 117.7, 60.9, 42.9, 22.7, 14.7, 11.3 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_9H_{12}N_3OS$ $[M+H]^+$: 210.0696, found: 210.0697

1-[(1S)-1-(2,5-dichlorophenyl)ethyl]pyrazol-4-amine (92)

To a solution of (1*R*)-1-(2, 5-dichlorophenyl)ethanol **93** (498 mg, 2.61 mmol, 93.38%ee) in $CHCl_3$ (10 ml) was added Et_3N (0.725 ml, 5.21 mmol) and methanesulfonic anhydride (681 mg, 3.91 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 2 h, to the reaction mixture was added 1 M HCl and the resulting mixture was extracted with $CHCl_3$ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure to give crude **107** as a yellow gum. To a solution of **107** in DMF (10 ml) were added *tert*-butyl *N*-(1*H*-pyrazol-4-yl)carbamate **94** (525 mg, 2.87 mmol) and cesium carbonate (2.55 g, 7.82 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 2 h, to the reaction mixture was added water and the resulting mixture was extracted with EtOAc three times. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–75/25) and NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–80/20) to give crude **108**. To a solution of **108** in CH_2Cl_2 (4ml) was added TFA (4.0 ml) at room temperature. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and to the residue was added saturated aqueous $NaHCO_3$. The resulting mixture was extracted with $CHCl_3$ three times and the combined organic phases were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 50/50–0/100) to give **92** (326 mg, 50%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.28 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 0.77 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 0.90 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.74 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 2.93 (s, 2H), 1.82 ppm (d, J = 7.1 Hz, 3H)

^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ = 142.0, 133.4, 131.9, 130.7, 130.2, 129.2, 128.9, 127.3, 117.8, 57.5, 19.9 ppm

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{11}H_{12}N_3Cl_2$ $[M+H]^+$: 256.0403, found: 256.0403

1-[1-[(1S)-1-(2,5-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4-carboxylic acid (16)

To a solution of **92** (321 mg, 1.25 mmol) in $CHCl_3$ (6 ml) was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (197 mg, 1.50 mmol) at room temperature. After being stirred at rt for 2.5 h, to the mixture were

added WSCI (288 mg, 1.50 mmol), Et₃N (0.523 ml, 3.76 mmol) and ethyl 4-pyrazolecarboxylate (211 mg, 1.50 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was purified by silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) to give crude **91** (351 mg). A mixture of **91** (100 mg) and chlorotrimethylsilane (0.123 ml, 1.01 mmol) in NMP (3 ml) was stirred at 120 °C under microwave irradiation for 1 h. After it was cooled to ambient temperature, to the reaction mixture was added saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with EtOAc three times. The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The filtrate was concentrated under reduced pressure to give crude **90**. To a solution of **90** in THF (1ml) and EtOH (1ml) was added 1 M NaOH aq. (1.01 ml, 1.01 mmol) at room temperature. After being stirred at room temperature for 6 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in water and to the solution was added 1 M HCl. The precipitate was collected by filtration, which was then suspended in EtOH at 50 °C to afford **16** (50 mg, 33%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 12.96 (brs, 2H), 8.86 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.75 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.86 ppm (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ = 162.9, 153.0, 143.1, 142.6, 141.0, 138.6, 133.2, 132.1, 131.7, 131.3, 130.5, 129.3, 127.3, 124.0, 118.3, 56.1, 19.9 ppm

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₃N₆O₃Cl₂ [M+H]⁺ : 419.0421, found: 419.0426

Enantiomeric Excess: 98.93%ee (*t_R* = 9.678 min, column: Daisel CHIRALPAK IC-3 (4.6×150 mm), eluent: Hexane/EtOH/AcOH=70/30/0.5)

Conformational Study

MOE was used to search possible conformations at the molecular force field level. Gaussian 09 was then used to obtain the most stable structure by the energy-stabilization calculations of these conformers at the B3LYP/6 -31G** level using the Density Functional Theory (DFT).

参考文献

- (1) Katoh, T.; Tomata, Y.; Tsukamoto, T.; Nakada, Y. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6043–6046.
- (2) Katoh, T.; Tomata, Y.; Setoh, M.; Sasaki, S.; Takai, T.; Yoshitomi, Y.; Yukawa, T.; Nakagawa, H.; Fukumoto, S.; Tsukamoto, T.; Nakada, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2497–2501.
- (3) Kawasuji, T.; Johns, S. B.; Yoshida, H.; Weatherhead, G. J.; Akiyama, T.; Taishi, T.; Taoda, Y.; Mikamiyama-Iwata, M.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Tanimoto, N.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Garvey, P. E.; Fujiwara, T. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1124–1135.
- (4) Yasukata, T.; Masui, M.; Ikarashi, F.; Okamoto, K.; Kurita, T.; Nagai, M.; Sugata, Y.; Miyake, N.; Hara, S.; Adachi, Y.; Sumino, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 565–570.
- (5) Haynes, N.-E.; Hermann, J. C.; Kim, K.; Scott, N. R.; Yi, L. PCT Int. Appl. WO2013182580.
- (6) Khalifa, N. M.; Alkahtani, M. H.; Al-Omar, A. M.; Bakheit, H. A. *Russian Journal of General Chemistry*, **2019**, *89*, 1683–1690.
- (7) Tebbe, M. J.; Atton, H. V.; Avery, C.; Bromidge, S. M.; Kerry, M.; Kotey, A. K.; Monck, N. J.; Meniconi, M.; Ridgill, M. P.; Tye, H.; Saiah, E.; Johnsson, K. P.; Gorska, K. I.; Peng, H.; McCall, J. M. PCT Int. Appl. WO2017059191.
- (8) El-Gazzar, A. B. A.-R.; El-Enany, M. M.; Mahmoud, N. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3261–3273.
- (9) Konishi, K.; Kuragano, T. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, **1990**, *15*, 13–22.
- (10) Taherpour, S.; Golubev, O.; Lönnberg, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8990–8999.
- (11) Poirier, M.; Pujol-Giménez, J.; Manatschal, C.; Bühlmann, S.; Embaby, A.; Javor, S.; Hediger, A. M.; Reymond, J.-L. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, in press.
- (12) Okuyama, M.; Fukunaga, K.; Usui, K.; Hayashi, N.; Iijima, D.; Horiuchi, H.; Itagaki, N. PCT Int. Appl. WO2015163339.
- (13) Yoburn, C. J.; Baskaran, S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3801–3803.
- (14) Astor, B. C.; Muntner, P.; Levin, A.; Eustace, J. A.; Coresh, J. *Arch. Intern. Med.* **2002**, *162*, 1401–1408.
- (15) Roth, D.; Smith, R. D.; Schulman, G.; Steinman, T. I.; Hatch, F. E.; Rudnick, M. R.; Sloan, J. A.; Freedman, B. I.; Williams, W. W. Jr; Shadur, C. A. *Am. J. Kidney Dis.* **1994**, *24*, 777–784.
- (16) Supuran, T. C. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2008**, *7*, 168–181.
- (17) Mimura, L.; Nangaku, M. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6*, 667–678.
- (18) Pandya, V. B.; Joharapukar, A. A.; Jain, M. R.; Desai, R. C. *Med. Chem. Rev.* **2015**, *50*, 119–133.

- (19) Arend, M. P.; Flippin, L. A.; Guenzlerpukall, V.; Ho, W.-B.; Turtle, E. D.; Du, X. PCT Int. Appl. WO 2004/108681, 2004.
- (20) Richard, M. K. US 2007/0299086, 2007.
- (21) Ogoshi, Y.; Matsui, T.; Mitani, I.; Yokota, M.; Terashita, M.; Motoda, D.; Ueyama, K.; Hotta, T.; Ito, T.; Hase, Y.; Fukui, K.; Deai, K.; Yoshiuchi, H.; Ito, S.; Abe, H. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 1320–1325.
- (22) Duffy, K. J.; Fitch, D. M.; Jin, J.; Liu, R.; Shaw, A. N.; Wiggall, L. PCT Int. Appl. WO 2007/150011
- (23) Beck, H.; Jeske, M.; Thede, K.; Stoll, F.; Flamme, I.; Akbaba, M.; Ergüden, J.-K.; Karig, G.; Keldenich, J.; Oehme, F.; Militzer, H.-C.; Hartung, V. I.; Thuss, U. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 988–1003.
- (24) Terrett, A. J.; Chen, H.; Constantineau-Forget, L.; Larouche-Gauthier, R.; Lépissir, L.; Beaumier, F.; Déry, M.; Grand-Maître, C.; Sturino, C.; Volgraf, M.; Villemure, E. US20190284179.
- (25) Wu, M.-H.; Hu, J.-H.; Shen, D.-S.; Brémond, P.; Guo, H. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 5112–5120.
- (26) Fletcher, S. R.; Merayo, N. M.; Schmitt, B. A.; Dykes, G. J. PCT Int. Appl. WO2009071707.
- (27) Yu, X. Y.; Xing, L. H.; Wang, M.; McComas, C.; Silverman, M.; Soll, R. PCT Int. Appl. WO2020132174.
- (28) Poudel, Y. B.; Gangwar, S.; He, L.; Vaprakasam, P.; Broekema, M.; Chowdari, N. S.; Cox, M.; Tarby, C. M.; Zhang, Q. PCT Int. Appl. WO2020028608.
- (29) Rosa, L. S.; Benicchi, T.; Bettinetti, L.; Ceccarelli, I.; Diodato, E.; Federico, C.; Fiengo, P.; Franceschini, D.; Gokce, O.; Heits, F.; Lazzeroni, G.; Luthi-Carter, R.; Magnoni, L.; Miragliotta, V.; Scali, C.; Valacchi, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 979–984.
- (30) Kashiwagi, T.; Takamuro, Y.; Watanabe, Y.; Yato, M. PCT Int. Appl. WO2006126718.
- (31) Ondi, L.; Schlosser, M. *Eur. J. Org. Chem* **2006**, *2006*, 2417–2422.
- (32) Nakai, T.; Perl, N. R.; Moore, J. PCT Int. Appl. WO2014047325.
- (33) Nakajima, T.; Goi, T.; Kawata, A.; Sugahara, M.; Yamakoshi, S. PCT Int. Appl. WO2014030716.
- (34) Kosugi, M.; Kameyama, M.; Migita, T. *Chem. Lett.* **1983**, 927–928.
- (35) Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969–5970.
- (36) Guram, S. A.; Buchwald, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901–7902.
- (37) Guram, S. A.; Rennels, A. R.; Buchwald, L. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 1348–1350.
- (38) Louie, J.; Hartwig, F. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609–3612.

- (39) Wolfe, P. J.; Wagaw, S.; Buchwald, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215–7216.
- (40) Driver, S. M.; Hartwig, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7217–7218.
- (41) Shen, Q.; Ogata, T.; Hartwig, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6586–6596.
- (42) Old, W. D.; Wolfe, P. J.; Buchwald, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9722–9723.
- (43) Huang, X.; Anderson, W. K.; Zim, D.; Jiang, L.; Klapars, A.; Buchwald, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6653–6655.
- (44) Anderson, W. K.; Tundel, E. R.; Ikawa, T.; Altman, A. R.; Buchwald, L. S.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6523–6527.
- (45) Fors, P. B.; Watson, A. Donald; Biscoe, R. M.; Buchwald, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13552–13554.
- (46) Mann, G.; Hartwig, F. J.; Driver, S. M.; Fernández-Rivas, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 827–828.
- (47) Old, W. D.; Harris, C. M.; Buchwald, L. S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1403–1406.
- (48) Wolfe, P. J.; Buchwald, L. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6359–6362.
- (49) Burgos, H. C.; Barder, E. T.; Huang, X.; Buchwald, L. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4321–4326.
- (50) Dooleweerd, K.; Fors, P. B.; Buchwald, L. S. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2350–2353.
- (51) Valente, C.; Çalimsiz, S.; Hoi, H. K.; Mallik, D.; Sayah, M.; Organ, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3314–3332.
- (52) **51b-f** are readily synthesized from the corresponding dichloropyrimidine. For the synthesis of dichloropyrimidines: (a) Burnett, D. A.; Zhao, Z.; Cole, D.; Josien, H.; Pissarnitski, D. A.; Sasikumar, T.; Wu, W.-L.; Domalski, M. PCT Int. Appl. WO2012078448. (b) Li, Z.-H.; Jiang, Z.-J.; Shao, Q.-L.; Qin, J.-J.; Shu, Q.-F.; Lu, W.-H.; Su, W.-K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 6423–6431. (c) Cabrera, G. D.; Manach, L. C.; Douelle, F.; Younis, Y.; Feng, T.-S.; Paquet, T.; Nchinda, T. A.; Street, J. L.; Taylor, D.; Kock, de, Carmen; Wiesner, L.; Duffy, S. White, L. K.; Zabiulla, M. K.; Sambandan, Y.; Bashyam, S.; Waterson, D.; Witty, J. M.; Charman, A. S.; Avery, M. V.; Wittlin, S. J. *Med. Chem.* **2014**, *57*, 1014–1022. (d) Girgis, S. N.; Michael, A. M.; Smee, F. D.; Alaghamandan, A. H.; Robins, K. R.; Cottam, B. H. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2750–2755.
- (53) For the synthesis of **51h-j**: (a) Kuroiwa, K.; Ishii, H.; Matsuno, K.; Asai, A.; Suzuki, Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 287–291. (b) Steinig, G. A.; Mulvihill, J. M.; Wang, J.; Werner, S. D.; Weng, Q.; Kan, J.; Coate, H.; Chen, X. US 20090197862. (c) Armstrong, S. A.; Berge, J. M.; Brown, P.;

- Elder, J. S.; Forrest, A. K.; Hamprecht, D. W.; Jarvest, R. L. PCT Int. Appl. WO200071524.
- (54) Siddig, A.; Aminova, R. L.; Ratan, R. R., *Neurochemical Research*, **2007**, *32*, 931–946.
- (55) Warnecke, C.; Zaborowska, Z.; Kurreck, J.; Erdmann, A. V.; Frei, U.; Wiesener, M.; Eckardt, K.-U. *FASEB. J.*, **2004**, *18*, 1462–1464.
- (56) Gruber, M.; Hu, C.-J., Johnson, S. R., Brown, J. E.; Keith, B.; Simon, C. M. *PNAS*, **2007**, *104*, 2301–2306.
- (57) Rankin, B. E.; Biju, P. M.; Liu, Q.; Unger, L. T.; Rha, J.; Johnson, S. R.; Simon, C. M.; Keith, B.; Haase, H. V. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1068–1077.
- (58) Kojima, I.; Tanaka, T.; Inagi, R.; Kato, H.; Yamashita, T.; Sakiyama, A.; Ohneda, O.; Takeda, N.; Sata, M.; Miyata, T.; Fujita, T.; Nangaku, M. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 1218–1226.
- (59) Scortegagna, M.; Ding, K.; Zhan, Q.; Oktay, Y.; Bennett, J. M.; Bennet, M.; Shelton, M. J.; Richardson, A. J.; Moe, O.; Garcia, A. J. *Blood*, **2005**, *105*, 3133–3140.
- (60) Takeda, K.; Ho, C. V.; Takeda, H.; Duan, L.-J.; Nagy, A.; Fong, G.-H. *Mol. Cell. Biol.*, **2006**, *26*, 8336–8346.
- (61) Takeda, K.; Cowan, A.; Fong, G.-H. *Circulation*, **2007**, *116*, 774–781.
- (62) Minamishita, A. Y.; Moslehi, J.; Bardeesy, N.; Cullten, D.; Bronson, T. R.; Kaelin, G. B.; Kaelin Jr, G. W.; *Blood*, **2008**, *111*, 3236–3244.
- (63) Takeda, K.; Aguila, L. H.; Parikh, S. N.; Lamothe, K. L.; Duan, L.-J.; Takeda, H.; Lee, S. F.; Fong, G.-H. *Blood*, **2008**, *111*, 3229–3235.
- (64) Aragonés, J.; Schneider, M.; Geyte, V. K.; Fraisl, P.; 1,2,20, Dresselaers, T.; Mazzone, M.; Dirx, R.; Zacchigna, S.; Lemieux, H.; Jeoung, H. N.; Lambrechts, D.; Bishop, T.; Lafuste, P.; Diez-Juan, A.; Harten, K. S.; Noten, V. P.; Bock, D. K.; Willam, C.; Tjwa, M.; Grosfeld, A.; Navet, R.; Moons, L.; Vandendriessche, T.; Deroose, C.; Wijeyekoon, B.; Nuyts, J.; Jordan, B.; Silasi-Mansat, R.; Lupu, F.; Dewerchin, M.; Pugh, C.; Salmon, P.; Mortelmans, L.; Gallez, B.; Gorus, F.; Buyse, J.; Sluse, F.; Harris, A. H.; Gnaiger, E.; Hespe, P.; Hecke, V. P.; Schuit, F.; Veldhoven, V. P.; Ratcliffe, P.; Baes, M.; Maxwell, P.; Carmeliet, P. *Nature Genomics*, **2008**, *40*, 170–180.
- (65) Bishop, T.; Gallagher, D.; Pascual, A.; Lygate, A. C.; de Bono, P. J.; Nicholls, G. L.; Ortega-Saenz, P.; Oster, H.; Wijeyekoon, B.; Sutherland, A.; Grosfeld, A.; Aragonés, J.; Schneider, M.; Geyte, V. K.; Teixeira, D.; Dies-Juan, A.; Lopez-Barneo, J.; Channon, M. K.; Maxwell, H. P.; Pugh, W. C.; Davies, M. A.; Carmeliet, P.; Ratcliffe, J. P. *Mol. Cell. Biol.*, **2008**, *28*, 3386–3400.
- (66) Percy, J. M.; Furlow, W. P.; Lucas, S. G.; Li, X.; Lappin, J. R. T.; McMullin, F. M.; Lee, S. F. *N.*

- Engl. J. Med.* **2008**, 358, 162–168.
- (67) Rosen, D. M.; Venkatesan, H.; Peltier, M. H.; Bembenek, D. S.; Kanelakis, C. K.; Zhao, X. L.; Leonard, E. B.; Hocutt, M. F.; Wu, X.; Palomino, L. H.; Brondstetter, I. T.; Haugh, V. P.; Cagnon, L.; Yan, W.; Liotta, A. L.; Yong, A.; Mirzadegan, T.; Shankley, P. N.; Barrett, D. T.; Rabinowits, H. M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1, 526–529.
- (68) Deng, J.; Peng, L.; Zhang, G.; Lan, X.; Li, C.; Chen, F.; Zhou, Y.; Lin, Z.; Chen, L.; Dai, R.; Xu, H.; Yang, L.; Zhang, X.; Hu, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 71–76.
- (69) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6752–6756.
- (70) Hoover, T. B. *PCB Newsl.* **1971**, 3, 4–5.
- (71) Lee, M. C.; Chian, E. S. K.; Griffin, R. A. *Water Res.* **1979**, 13, 1249–1258.
- (72) Gavezzotti, A. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1399–1404.
- (73) Ishikawa, M. Hashimoto, Y. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1539–1554.
- (74) Ishikawa, M.; Hiraiwa, Y.; Kubota, D.; Tsushima, M.; Watanabe, T.; Murakami, S.; Ouchi, S.; Ajito, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 2131–2150.
- (75) Doherty M. E.; Retz, D.; Gavva, R. N.; Tamir, R.; Treanor, S. J. J.; norman, H. M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1830–1834.
- (76) Fujita, Y.; Yonehara, M.; Tetsuhashi, M.; Noguchi-Yachide, T.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 1194–1203.
- (77) Daylight Chemical Information Systems, Inc. (2011) CLOGP reference manual.
<http://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/>. Accessed 25 Aug 2016.
- (78) ChemAxon. <https://www.chemaxon.com>. Accessed 25 Aug 2016.
- (79) Al-Shaar, H. A.; Gilmour, W. D.; Lythgoe, J. D.; McClenaghan, I.; Ramsden, A. C. *J. Chem. Soc. Commun.* **1989**, 551–552.
- (80) Iaroshenko, O. V.; Volochnyuk, M. D.; Yan, W.; Vovk, V. M.; Boiko, J. V.; Rusanov, B. E.; Groth, M. U.; Tolmachev, A. A. *Synthesis*, **2007**, 3309–3318.
- (81) Vovk, V. M.; Bolbut, V. A.; Boiko, I. V.; Pirozhenko, V. V.; Chernega, N. A.; Tolmachev, A. A. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2004**, 40, 370–376.
- (82) Vovk, V. M.; Bol'but, V. A.; Boiko, I. V.; Pirozhenko, V. V.; Chernega, N. A. *Mendeleev, Commun.* **2001**, 11, 198–199.
- (83) Iaroshenko, O. V.; Sevenard, V. D.; Kotljarov, A.; Volochnyuk, M. D.; Tolmachv, O. A.; Sosnovskikh, Y. V. *Synthesis*, **2009**, 731–740.

- (84) Volk, V. M.; Bol'but, V. A.; Dorokhov, I. V.; Pyrozhenko, V. V. *Syn. Commun.* **2002**, *32*, 3749–3753.
- (85) Dean, D. W.; Papadopoulos J. *Heterocyclic Chem.* **1982**, *19*, 171–176.
- (86) Zeghida, W.; Debray, J.; Chierici, S.; Dumy, P.; Demeunynck, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2473–2475.
- (87) Debray, J.; Bonte, S.; Lozach, O.; Meijer, L.; Demeunynck, M. *Mol. Divers.* **2012**, *16*, 659–667.
- (88) Manimala, C. J.; Anslyn, V. E. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 565–567.
- (89) Liang, X.; Zang, J.; Li, X.; Tang, S.; Huang, M.; Geng, M.; Chou, J. C.; Li, C.; Cao, Y.; Xu, W.; Liu, H.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3898–3923.

謝辞

本研究を行い、本論文を執筆するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院理学研究科 深瀬浩一教授に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、大変有益なご助言を賜りました大阪大学理学研究科 村田道雄教授、島本啓子教授、大阪大学産業科学研究所 鈴木孝禎教授に深く感謝致します。

第二章の創薬研究遂行にあたり、計算化学に関して多くの有益なご助言を頂きました田辺三菱製薬株式会社 岡田興昌博士に深く感謝致します。また、論文作成にあたりご指導頂きました菅原正克博士に御礼申し上げます。

第三章の研究にあたり、有益なご助言を頂きました田辺三菱製薬株式会社 松平鉄二氏に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、分析データ取得に関して数々のご助言を頂きました田辺三菱製薬株式会社 藤井絵里氏に深く感謝致します。

最後に、本研究の機会を与えて下さった田辺三菱製薬株式会社関係者の皆様、HIF-PHD 阻害薬研究の生物試験、薬物動態試験、物性試験を担当して頂きました皆様に感謝致します。

主論文リスト

- (1) Goi, T.; Fukase, K. Highly Efficient Coupling of Unstable Bicyclic Pyrimidines and Parasols under Basic Conditions, and its Application to Synthesis of Pharmaceutical Compounds. *Synlett* **2018**, 29, 1867–1870.
- (2) Goi, T.; Nakajima, T.; Komatsu, Y.; Kawata, A.; Yamakoshi, S.; Okada, O.; Sugahara, M.; Umeda, A.; Takada, Y.; Murakami, J.; Ohashi, R.; Watanabe, T.; Fukase, K. Pyrazolo[4, 3-*d*]pyrimidine Derivatives as a Novel Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitor for the Treatment of Anemia. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, 11, 1416–1420.
- (3) Goi, T.; Matsudaira, T.; Fukase, K. Practical Synthesis of 1-Substituted 5-Aminopyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-ones Using Intramolecular Friedel–Crafts Type Cyclization and Its Application to the Synthesis of Pharmaceutically Active Compounds.

参考論文リスト

- (1) Tanaka, S.; Goi, T.; Tanaka, K.; Fukase, K. Highly Efficient α -Sialylation by Virtue of Fixed Dipole Effects of *N*-Phthalyl Group: Application to Continuous Flow Synthesis of α (2-3)- and α (2-6)-Neu5Ac-Gal Motifs by Microreactor. *J. Carbohydr. Chem.* **2007**, 26, 369–394.
- (2) Tanaka, K.; Goi, T.; Fukase, K. Highly Efficient Sialylation towards α (2-3)- and α (2-6)-Neu5Ac-Gal Synthesis: Significant ‘Fixed Dipole Effect’ of *N*-Phthalyl Group on α -Selectivity. *Synlett* **2005**, 16, 2958–2962.
- (3) Goi, T.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. Separation of S-form lipopolysaccharide with resins having branched tri-lysine, a putative phosphate recognition sequence. *Peptide Science* **2005**, 433–436.