

| 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 | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

1

| 田夕 | ∃Ŧ | i = | F |
|----|-----|-----|---|
| 四台 | THE | iス | V |

| 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-d]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 | 旨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 | 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 | 経口投生 | Ģ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-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 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-d]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-d]

| | | 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 |
| | | | |
| 参考文南 | 伏 | | 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-tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine |
| Arg | arginine |
| Asp | asparagine |
| BINAP | 2, 2'-bis(diphenylphosphino)-1, 1'-binaphthyl |
| Bn | benzyl |
| CDI | N, N'-carbonyldiimidazole |
| CKD | Chronic Kidney Diseases |
| DMT1 | divalent metal transporter 1 |
| dba | dibenzylideneacetone |
| dppf | 1,1'-ferrocenediyl-bis(diphenylphosphine) |
| DavePhos | 2-dicyclohexylphosphino-2'-(N, N-dimethylamino)biphenyl |
| DEAD | diethyl azodicarboxylate |
| DMF | N, N-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 | (2R)-1-[(1R)-1-(dicyclohexylphosphino)ethyl]-2-(diphenylphosphino)ferrocene |
| Me | methyl |
| Me4 ^t BuXPhos | (2-di-tert-butylphosphino-3,4,5,6-tetramethyl-2', 4', 6'-triisopropyl-1, 1- |
| | biphenyl) |

| MeOH | methanol |
|--------------------------|---|
| MS | mass spectrometry |
| Ms | methanesulfonyl |
| NBS | N-bromosuccinimide |
| NK1 | neurokinin 1 |
| NMP | N-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 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 |
| WSCI | 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-tert-butylphosphino-2', 4', 6'-triisopropylbiphenyl |
| ^t BuBrettPhos | 2-di-tert-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 PKC0 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、PKC0 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 PKC0 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 PKC0 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-アミノピラゾロ[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こと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-ピリミドンは酸性プロトンを有する芳 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、Zn²⁺, Cu²⁺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ビリミドン-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、ピリミドンを形成する方法 (Scheme 4-3) ¹³が代表例として挙げられる。しかし、Scheme4-1 はピリミドンの低反応性により収率が 低いこと、Scheme4-2 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、Scheme4-3 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ビ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。

6



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 HIFa の機能を制御している (Figure 4)。通常酸素濃度下では、HIF-PHD は HIFa を基 質とし、二価鉄イオン、酸素、2-オキソグルタル酸を利用して HIFa 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 HIFa 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 HIFa 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 は低酸素応答が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、"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 48³³ 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 反応が進行したかったためである (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 化的付加が起こ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'Pr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のシクロへキシル基を*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'BuXPhos⁴⁴、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. ジアルキルビ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 'BuONa 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) (Pd₂(dba)₃)、Buchwald らにより報告されているジアルキルビアリー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、'BuOH 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、'BuOH 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'Bu 基を持つ'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、 '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)。'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。Me4'BuXPhos⁴⁹では収率 25%と予想外に低収率に留 まったが (entry 6)、'BuBrettPhos⁵⁰では収率 69%となり、'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 '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 (entry12, 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 | | XPhos | | toluene | trace |
| 2 | | | | dioxane | <10 |
| 3 | | | | ^t BuOH | 13 |
| 4 | | ^t BuXPhos | | ^t BuOH | 75 |
| 5 | | | K ₃ PO ₄ | dioxane | 80 |
| 6 | Pd ₂ (dba) ₃ | Me4 ^t BuXPhos | | | 25 |
| 7 | | ^t BuBrettPhos | | | 69 |
| 8 | | rac-BINAP | | ^t BuOH | 13 |
| 9 | | dppf | | | 13 |
| 10 | | ^t BuXPhos | '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 'BuOH 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 Pd₂(dba)₃、20mol%の '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

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

^a10 mol% of Pd₂(dba)₃ and 20 mol% of ^tBuXPhos were used.

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- 2α 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-1a | | |
| HIF-PHD2 | HIF-1a、HIF-2a | | |
| HIF-PHD3 | HIF-2a | | |

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 54¹⁹、ベンズイミダゾールとピラゾールから成る 55⁶⁷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。



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 57⁶⁸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, Me₄'BuXPhos, K₃PO₄, 'BuOH, 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

^{*a*}Reagents 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, Me₄[']BuXPhos, K₃PO₄, [']BuOH,
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。



^{*a*}Reagents 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ビリミドン-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)。チエノビリミドン 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ビリミドン 70、ピラゾロピ リミドン 72 の活性を評価した。ピロロビリミドン 70 では活性が減弱したが、非常に強力 な HIF-PHD2 阻害活性を有するビラゾロビリミドン 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

| | | | N=/ | | |
|----------|----------------------|------------------------------------|----------|----------|------------------------------------|
| compound | R_1R_2 | hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM) | compound | R_1R_2 | hHIF-PHD2 IC ₅₀ (nM) |
| 56 | S. | 290 | 65d | S -s | 23 |
| 63 | S. | 140 | L | | |
| 65a | S. | 78 | 70 | | 51 |
| 65b | F ₃ C | 68 | 72 | | 9 |
| 65c | CF ₃ S | 45 | 73 | | 12 |



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、sp³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 μg/mL) は、4-クロロビフェニル (400 μg/mL) や 2,4'-ジクロロビフェニル (637 μg/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。

33



Figure 11. 脂溶性低減によらない溶解度改善事例

ビラゾロビリミドン 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 ℃ 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 ℃ 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

| $\begin{array}{c} R^{-N} & N \\ O & N \\ H & N \\ N \end{array} \\ CO_2 H \end{array}$ | | | | | | | | | | | |
|--|----|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------|---------------------------|--|--|--|--|--|
| 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 | F | 16 | - | 52 | 299–303 | 1.53 | | | | | |
| 75 | F | 25 | 49 | 42 | 283–285 | 1.67 | | | | | |
| 76 | CI | 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 ゼンが捩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捩れると予想された 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 よりもさらに捩れた配座となった (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捩れた 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 じ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 $^{\circ}$ 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。

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

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

^{*a*}Solubility of pH 6.5 buffer. ^{*b*}Solubility of pH 6.5 artificial intestinal fluids. ^{*c*}logD 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 2-7 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。





^{*a*}Reagents 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) に位置選択性が無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 a* conditions: 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無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)。ヘテロアリールアミンより、芳香族縮環ピ リミドンを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)。ヘテロアリールアミン 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 ノビラゾロ[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 TMSCI 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、TMSCI 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、TMSCI 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 ℃ 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



^{*a*}Determined by UV (254 nm) area of HPLC analysis of the reaction mixture. ^{*b*}4.0 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を合成した例である。次に4-トルイジン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

^{*a*}The yields were calculated by ¹H NMR spectra of the mixture **106b** and **106c**. ^{*b*}NMP 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 94⁸⁹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、TMSCI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*} ^{*a*}Reagents and conditions: (a) Ms₂O, Et₃N, CHCl₃, rt; (b) 94, Cs₂CO₃, DMF, rt; (C) TFA, CH₂Cl₂, rt, 50% (3 steps); (d) ethoxycarbonyl isothiocyanate, CHCl₃, rt, then ethyl 4-pyrazolecarboxylate, WSCI, Et₃N; (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 TMSCI 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 ルキルビアリ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 -ピラゾールの刻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、TMSCI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 ¹³C 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-4carboxylate (50)

A mixture of **48** (100 mg, 0.328 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (55 mg, 0.394 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (15 mg, 0.0164 mmol), 'BuXPhos (14 mg, 0.0328 mmol), and K_3PO_4 (105 mg, 0.492 mmol) in '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 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) to afford **50** (101 mg, 75%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 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)

¹³C NMR (CDCl₃, 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 $C_{20}H_{21}O_4N_6$ [M+H]⁺: 409.1619, found: 409.1609

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

A mixture of **51a** (101mg, 0.332 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (56mg, 0.398 mmol), Pd₂(dba)₃ (15 mg, 0.0164 mmol), 'BuXPhos (14mg, 0.0328 mmol), and K₃PO₄ (106 mg, 0.497 mmol) in '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 $CHCl_3$ 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), 'BuXPhos (13mg, 0.0318 mmol), and K₃PO₄ (101 mg, 0.476 mmol) in '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 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), 'BuXPhos (13mg, 0.0318 mmol), and K₃PO₄ (101 mg, 0.476 mmol) in '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 = 95/5-30/70) 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 $C_{18}H_{27}O_4N_6Si$ [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), 'BuXPhos (11 mg, 0.0251 mmol), and K₃PO₄ (80 mg, 0.377 mmol) in 'BuOH (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): $\delta = 9.09$ (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): $\delta = 168.2$, 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 $C_{19}H_{16}O_4N_4F$ [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), $Pd_2(dba)_3$ (9 mg, 0.00940 mmol), 'BuXPhos (8 mg, 0.0188 mmol), and K_3PO_4 (60 mg, 0.282 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– 60/40) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5–50/50) to afford **52e** (48 mg, 67%).

¹H NMR (CHLOROFORM-d, 400MHz): $\delta = 9.09$ (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): $\delta = 168.9$, 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 $C_{19}H_{17}O_3N_4S$ (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), $Pd_2(dba)_3$ (23 mg, 0.00253 mmol), 'BuXPhos (21 mg, 0.0506 mmol), and K_3PO_4 (81 mg, 0.380 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 = 95/5-30/70-0/100) and silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 50/50-10/90-0/100) to afford **52f** (49 mg, 64%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): $\delta = 9.05$ (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): $\delta = 163.1$, 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 $C_{14}H_{16}O_3N_5$ [M+H]⁺: 302.1248, found: 302.1244

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

A mixture of **51g** (51 mg, 0.166 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (28 mg, 0.199 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (8 mg, 0.00827 mmol), 'BuXPhos (7 mg, 0.0166 mmol), and K_3PO_4 (53 mg, 0.248 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 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): $\delta = 9.13$ (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): $\delta = 163.4$, 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), 'BuXPhos (11 mg, 0.0257 mmol), and K₃PO₄ (82 mg, 0.385 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 = 95/5–65/35–50/50) 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), $Pd_2(dba)_3$ (12 mg, 0.0129 mmol), 'BuXPhos (11 mg, 0.0258 mmol), and K_3PO_4 (82 mg, 0.387 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 = 95/5-85/15) 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), $Pd_2(dba)_3$ (12 mg, 0.0128 mmol), 'BuXPhos (11 mg, 0.0258 mmol), and K_3PO_4 (82 mg, 0.385 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 = 95/5-45/55) 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), '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 **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): $\delta = 8.30$ (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): $\delta = 159.6$, 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), '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 = 95/5–60/40) 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 $C_{18}H_{16}O_2N_6F_3$ [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-nitrolpyrazole (22 mg, 0.197 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (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 = 95/5–50/50) 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): $\delta = 159.6$, 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): $\delta = 6.97-6.91$ (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), $Pd_2(dba)_3$ (776 mg, 0.847 mmol), Me₄'BuXPhos (917 mg, 1.91 mmol) and K₃PO₄ (320 mg, 1.51 mmol) in 'BuOH (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- ^{*i*}Pr₂O to give **29** (5.21 g, 77%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 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-3H-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-d₆, 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-4carboxylate (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-d₆, 400 MHz): $\delta = 12.93$ (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-tertbutyl(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-3H-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-4carboxylic 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-d₆, 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 = 90/10–20/80) 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 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 (g, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H),

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-4carboxylic 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-4carboxylate (64d)

A mixture of **60** (200 mg, 0.503 mmol), 4-phenylphenylboronic acid (200mg, 1.01 mmol), bis(ditert-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): $\delta = 12.96$ (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-d₆ + CDCl₃, 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 CH₃CN (4 ml) was stirred at room temperature for 5 h. 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 (Hexane/EtOAc = 80/20-65/35) and the resulting solid was triturated with CH₂Cl₂-^{*i*}Pr₂O to give **68** (110 mg, 84%) as a colorless powder.

¹H NMR (DMSO-d₆, 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-4carboxylate (69)

A mixture of **68** (86 mg, 0.246 mmol), ethyl 4-pyrazolecarboxylate (86 mg, 0.615 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (11 mg, 0.0123 mmol), $Me_4'BuXPhos$ (18 mg, 0.0369 mmol) and K_3PO_4 (78 mg, 0.369 mmol) in '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 CHCl₃. 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

triturated with $CH_2Cl_2-^{i}Pr_2O$ 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]-3*H*-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 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-1*H*-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]-6*H*-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 'Pr₂O. 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): $\delta = 12.96$ (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 (3um, 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]-6*H*-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 CHCl₃. 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 CH₂Cl₂ and ⁱPr₂O, and the precipitate was collected by filtration and washed with ⁱPr₂O. 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 (DMSO-d₆, 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 [M+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-4carboxylate (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 (CDCl₃, 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 [M+H]⁺

ethyl 1-[1-[[4-(2-fluorophenyl)phenyl]methyl]-7-methoxy-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5yl]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 CHCl₃. 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 CH₂Cl₂ and ^{*i*}Pr₂O to give **84a** (291 mg, 84%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 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-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4carboxylic 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-d₆, 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-5yl]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 CH₂Cl₂ and ^{*i*}Pr₂O 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-5yl]pyrazole-4-carboxylate (84b)

A mixture of **83b** (120 mg, 0.252 mmol), (2-fluorophenyl)boronic acid (71 mg, 0.507 mmol), bis(ditert-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 ^{*i*}Pr₂O 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-5yl]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 C₂₂H₁₅O₃N₆F₂ [M+H]⁺: 449.1168, found: 449.1158 HPLC: 99.26% (t_R = 26.415 min, column: GL Sciences Inertsil ODS-3 (3 µm, 4.6×150 mm), eluent: 0.05%TFA in H₂O/0.05%TFA in CH₃CN (95:5-0:100/40min))

1-[1-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4carboxylic 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-d₆, 400 MHz): δ = 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-[(1*S*)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4carboxylic acid (80)

To a mixture of **71** (555 mg, 1.93 mmol), (1*R*)-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 $C_{17}H_{13}O_3N_6Cl_2$ [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-4carboxylic 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 μ l, 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-4carboxylic 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 μ l, 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 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-d₆, 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 $C_{14}H_{16}N_5O [M+H]^+$: 270.1349, found: 270.1346.

1-phenyl-5-(1-piperidyl)-6*H*-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) ¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) 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 C₁₆H₁₈N₅O [M+H]⁺ : 296.1506, found: 296.1470

5-(4-methylanilino)-1-phenyl-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one (106b) 6-methyl-2-[(1-phenylpyrazol-4-yl)amino]-3*H*-quinazolin-4-one (106c)

To a solution of 1-phenylpyrazole-4-amine (100mg, 0.628 mmol) in CHCl₃ (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), Et₃N (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 CHCl₃ twice. The combined organic phases were concentrated under reduced pressure and the residue was purified by NH silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 95/5-75/25-70/35). 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 NaHCO3 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 1phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

MS(ESI) m/z 318 [M+H]+

106b

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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)
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆) 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 C₁₈H₁₆N₅O [M+H]⁺ : 318.1349, found: 318.1345

106c

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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-d₆): 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 Φ 20mm*250mm 5µm, 0.05%TFA-H₂O/0.05%TFA-CH₃CN = 58/42–48/52) to give **106d** (39 mg, 91%, 40% from 1phenylpyrazole-4-amine) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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-d₆) 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 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

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

To a solution of (1R)-1-(2, 5-dichlorophenyl)ethanol 93 (498 mg, 2.61 mmol, 93.38%ee) in CHCl₃ (10 ml) was added Et₃N (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 CHCl₃ 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-(1H-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 there 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 (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 CH₂Cl₂ (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 NaHCO₃. The resulting mixture was extracted with CHCl₃ 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, CDCl₃) 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)

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 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-[(1*S*)-1-(2,5-dichlorophenyl)ethyl]-7-oxo-6*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl]pyrazole-4carboxylic 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 there 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 $C_{17}H_{13}N_6O_3Cl_2 [M+H]^+$: 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 comformers 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.; Sloand, 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) Dooleweerdt, 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 synthesisized 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.; Bijiu, P. M.; Liu, Q.; Unger, L. T.; Rha, J.; Johnson, S. R.; Simon, C. M.; Keith, B.; Haase, H. V. J. Clin. Invst. 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.; Bennett, 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.; Dirkx, R.; Zacchigna1, 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.; Aragones, 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) AI-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.

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、分析テ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

- <u>Goi, T.;</u> 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) <u>Goi, T.;</u> 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) <u>Goi, T.;</u> Matsudaira, T.; Fukase, K. Practical Synthesis of 1-Substituted 5-Aminopyrazolo[4,3d]pyrimid-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

- Tanaka, S.; <u>Goi, T.</u>; 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.; <u>Goi, T.</u>; 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) <u>Goi, T.;</u> 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.