

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 355**

51 Int. Cl.:

C07D 237/24 (2006.01)

A61K 31/50 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 14196983 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2889289**

54 Título: **Derivados de glicina N-sustituída con piridazin-diona como inhibidores de HIF hidoxilasas**

30 Prioridad:

12.01.2007 US 884710 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.05.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
Corporation Service Company 2711 Centreville
Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US**

72 Inventor/es:

**DUFFY, KEVIN J.;
SHAW, ANTONY, N.;
MILLER, WILLIAM, HENRY;
MYERS, ANDREA, K. y
ZIMMERMANN, MICHAEL, N.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de glicina N-sustituida con piridazin-diona como inhibidores de HIF hidoxilasas

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a ciertos derivados de glicina N-sustituida con un grupo heteroaromático que son inhibidores de HIF prolil-hidroxilasas y, por lo tanto, son para uso en el tratamiento de enfermedades que se benefician de la inhibición de esta enzima, siendo un ejemplo la anemia.

Antecedentes de la invención

- 10 La anemia se produce cuando hay una disminución o anomalía en los glóbulos sanguíneos, lo que conduce a niveles reducidos de oxígeno en la sangre. La anemia se produce con frecuencia en pacientes con cáncer, particularmente los que reciben quimioterapia. La anemia se observa con frecuencia en los ancianos, los pacientes con enfermedad renal y en una amplia variedad de estados asociados a enfermedades crónicas.

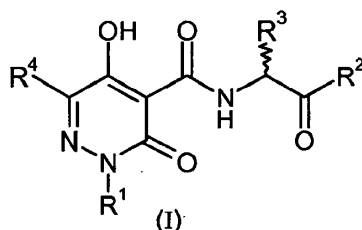
Frecuentemente, la causa de la anemia es la producción reducida de eritropoyetina (Epo) lo que da como resultado la prevención de la eritropoyesis (maduración de los eritrocitos). La producción de Epo se puede aumentar por inhibición de las prolil-hidroxilasas que regulan el factor inducible por hipoxia (HIF).

- 15 Una estrategia para aumentar la producción de eritropoyetina (Epo) es estabilizar y por tanto aumentar la actividad transcripcional del HIF. Las subunidades HIF-alfa (HIF-1 alfa, HIF-2 alfa y HIF-3 alfa) son degradadas rápidamente por el proteosoma en condiciones normóxicas por hidroxilación de residuos de prolina por las prolil-hidroxilasas (EGLN1, 2, 3). La hidroxilación de la prolina permite la interacción con la proteína de von Hippel Lindau (VHL), un componente de una ubiquitina-ligasa E3. Esto conduce a la ubiquitinación del HIF-alfa y su posterior degradación.
- 20 Bajo condiciones hipóxicas, se suprime la actividad inhibidora de las prolil-hidroxilasas, por tanto se estabilizan las subunidades HIF-alfa y se transcriben los genes sensibles al HIF, incluyendo el de la Epo. Por lo tanto, la inhibición de las prolil-hidroxilasas da como resultado niveles crecientes de HIF-alfa y por lo tanto mayor producción de Epo.

- Los compuestos de esta invención proporcionan un medio para inhibir estas hidroxilasas, aumentar la producción de Epo y tratar de este modo la anemia. La isquemia, el ictus y la citoprotección también pueden beneficiarse por la administración de estos compuestos.
- 25

Sumario de la invención

Se describen compuestos de fórmula (I):



en donde:

- 30 R¹ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -NR⁵R⁶, alquilo de C₁-C₁₀, alquenilo de C₂-C₁₀, alquinilo de C₂-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-cicloalquilo de C₃-C₈, cicloalquenilo de C₅-C₈, alquil de C₁-C₁₀-cicloalquenilo de C₅-C₈, heterocicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-heterocicloalquilo de C₃-C₈, arilo, alquil de C₁-C₁₀-arilo, heteroarilo y alquil de C₁-C₁₀-heteroarilo;

- 35 R⁴ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, COOR⁹, CONR⁷R⁸, -NR⁵R⁶, alquilo de C₁-C₁₀, alquenilo de C₂-C₁₀, alquinilo de C₂-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-cicloalquilo de C₃-C₈, cicloalquenilo de C₅-C₈, alquil de C₁-C₁₀-cicloalquenilo de C₅-C₈, heterocicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-heterocicloalquilo de C₃-C₈, arilo, alquil de C₁-C₁₀-arilo, heteroarilo y alquil de C₁-C₁₀-heteroarilo;

R² es -NR⁷R⁸ o -OR⁹;

R³ es H o alquilo de C₁-C₄;

- 40 R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de C₁-C₁₀, cicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-cicloalquilo de C₃-C₈, heterocicloalquilo de C₃-C₈, alquil de C₁-C₁₀-heterocicloalquilo de C₃-C₈, arilo, alquil de C₁-C₁₀-arilo, heteroarilo, alquil de C₁-C₁₀-heteroarilo, -CO(alquilo de C₁-C₄), -CO(cicloalquilo de C₃-C₆), -CO(heterocicloalquilo de C₃-C₆), -CO(arilo), -CO(heteroarilo) y -SO₂(alquilo de C₁-C₄); o R⁵ y R⁶ considerados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo saturado de 5 o 6 o

7 miembros que contiene opcionalmente otro heteroátomo seleccionado del grupo que consisten en oxígeno, nitrógeno y azufre;

R^7 y R^8 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de C_1 - C_{10} , alquenilo de C_2 - C_{10} , alquinilo de C_2 - C_{10} , cicloalquilo de C_3 - C_8 , heterocicloalquilo de C_3 - C_8 , arilo y heteroarilo;

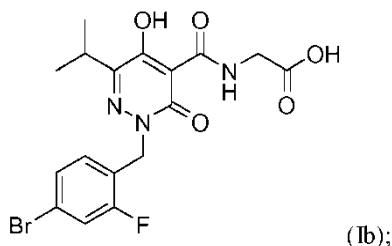
- 5 R^9 es H o un catión, o alquilo de C_1 - C_{10} que no está sustituido o está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en cicloalquilo de C_3 - C_6 , heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y

10 en donde cualquier átomo de carbono o heteroátomo de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 no está sustituido o, cuando sea posible, está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de C_1 - C_6 , arilo, heteroarilo, halógeno, $-OR^{10}$, $-NR^5R^6$, ciano, nitro, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-SR^{10}$, $-S(O)R^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-NR^5R^6$, $-CONR^5R^6$, $-N(R^5)C(O)R^{10}$, $-N(R^5)C(O)OR^{10}$, $-OC(O)NR^5R^6$, $-N(R^5)C(O)NR^5R^6$, $-SO_2NR^5R^6$, $-N(R^5)SO_2R^{10}$, alquenilo de C_1 - C_{10} , alquinilo de C_1 - C_{10} , cicloalquilo de C_3 - C_6 , heterocicloalquilo de C_3 - C_6 , arilo y heteroarilo; en donde R^5 y R^6 son como se han definido anteriormente y R^{10} es hidrógeno, alquilo de C_1 - C_{10} , alquenilo de C_2 - C_{10} , alquinilo de C_2 - C_{10} , $-CO$ (alquilo de C_1 - C_4), $-CO$ (arilo), $-CO$ (heteroarilo), $-CO$ (cicloalquilo de C_3 - C_6), $-CO$ (heterocicloalquilo de C_3 - C_6), $-SO_2$ (alquilo de C_1 - C_4), cicloalquilo de C_3 - C_8 , heterocicloalquilo de C_3 - C_8 , arilo de C_6 - C_{14} , alquil de C_1 - C_{10} -arilo, heteroarilo o alquil de C_1 - C_{10} -heteroarilo;

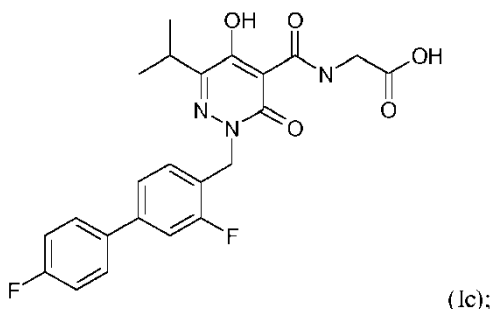
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto seleccionado de:

- 20 N -{[2-[(4-Bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Ib)

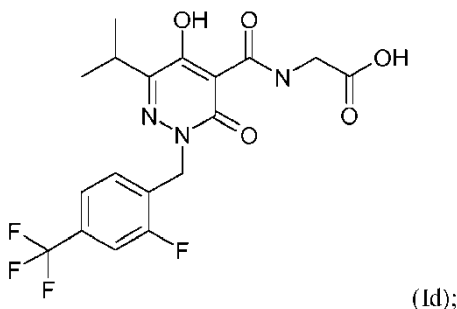


N -{[2-[(3,4'-Difluoro-4-bifenilil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Ic)



25 y

N -{[2-[[2-Fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Id)



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en terapia de mamíferos, por ejemplo, el tratamiento de la anemia. Un ejemplo de esta propuesta terapéutica es la de un método para el tratamiento de la anemia aumentando la producción de eritropoyetina (Epo) mediante la inhibición de prolil-hidroxilasas del HIF que comprende administrar un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, a un paciente que lo necesite, solo o mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para aumentar la producción de Epo.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un cuarto aspecto, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), or (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de la anemia.

Descripción detallada de la invención

Para evitar dudas, salvo indicación contraria, el término "sustituido" significa sustituido con uno o más grupos definidos. En el caso en el que los grupos se puedan seleccionar entre varios grupos alternativos, los grupos seleccionados pueden ser iguales o diferentes.

El término "independientemente" significa que cuando se selecciona más de un sustituyente entre varios sustituyentes posibles, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Una "cantidad eficaz" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado la mejora del tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución del avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene el número especificado de átomos de carbono, así por ejemplo, tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "alquilo de C₁-C₄" y "alquilo de C₁-C₁₀" se refieren a un grupo alquilo que tiene al menos 1 y hasta 4 o 10 átomos de carbono, respectivamente. Ejemplos de dichos grupos alquilo de cadena lineal o ramificada incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo, y los análogos ramificados de los últimos 5 alcanos normales.

Cuando se utiliza el término "alquenilo" (o "alquenileno") se refiere a cadenas hidrocarbonadas lineales o ramificadas que contienen el número especificado de átomos de carbono y al menos 1 y hasta 5 dobles enlaces carbono-carbono. Los ejemplos incluyen etenilo (o etenileno) y propenilo (o propenileno).

Cuando se utiliza el término "alquinilo" (o "alquinileno") se refiere a cadenas hidrocarbonadas lineales o ramificadas que contienen el número especificado de átomos de carbono y al menos 1 y hasta 5 triples enlaces carbono-carbono. Los ejemplos incluyen etinilo (o etinileno) y propinilo (o propinileno).

Cuando se utiliza "cicloalquilo" se refiere a un anillo hidrocarbonado cíclico, saturado, no aromático, que contiene el número especificado de átomos de carbono. Así, por ejemplo, el término "cicloalquilo de C₃-C₈" se refiere a un anillo hidrocarbonado cíclico no aromático que tiene de tres a ocho átomos de carbono. Grupos "cicloalquilo de C₃-C₈" ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

El término "cicloalquenilo de C₅-C₈" se refiere a un anillo carboxicíclico monocíclico no aromático que tiene el número especificado de átomos de carbono y hasta 3 dobles enlaces carbono-carbono. "Cicloalquenilo" incluye a modo de ejemplo ciclopentenilo y ciclohexenilo.

Cuando se usa "heterocicloalquilo de C₃-C₈", significa un anillo heterocíclico no aromático que contiene el número especificado de átomos en el anillo siendo saturado o teniendo uno o más grados de insaturación y que contiene uno o más sustituciones de heteroátomos seleccionados de O, S y/o N. Dicho anillo puede estar opcionalmente condensado con uno u otro más anillos "heterocíclicos" o anillos cicloalquilo. Los ejemplos de restos "heterocíclicos" incluyen, aunque sin limitación, aziridina, tiirano, oxirano, azetidina, oxetano, tietano, tetrahidrofurano, pirano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxano, piperidina, piperazina, 2,4-piperazindiona, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, morfolina, tiomorfolina, tetrahidrotiopirano, tetrahidrotiofeno y similares.

"Ariolo" se refiere a grupos no condensados o condensados monocíclicos y policarbocíclicos opcionalmente sustituidos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono y que tienen al menos un anillo aromático que cumple con la regla de Hückel. Ejemplos de grupos ariolo son fenilo, bifenilo, naftilo, antraceno, fenantreno y similares.

5 "Heteroarilo" significa un anillo monocíclico aromático opcionalmente sustituido o un sistema de anillos condensados policarbocíclicos en donde al menos un anillo cumple con la regla de Hückel, tiene el número especificado de átomos en el anillo y el anillo contiene al menos un heteroátomo seleccionado de N, O y/o S. Los ejemplos de grupos "heteroarilo" incluyen furanilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxo-piridilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo e indazolilo.

10 El término "opcionalmente" significa que pueden ocurrir o no el o los eventos posteriormente descritos e incluye tanto el o los eventos que ocurren como los eventos que no ocurren.

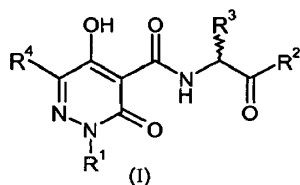
El término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto y un disolvente. Dichos disolventes para la finalidad de la invención pueden no interferir con la actividad biológica del soluto. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, metanol, etanol y ácido acético. 15 Preferiblemente, el disolvente usado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, agua, etanol y ácido acético. Más preferiblemente, el disolvente usado es agua.

En la presente memoria, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto sujeto y presentan efectos toxicológicos no deseados mínimos. Estas sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento final y la purificación del compuesto o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o de base libre con una base o ácido adecuado, respectivamente. 20

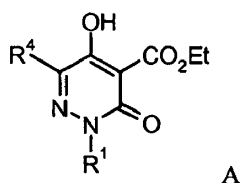
Ciertos compuestos de acuerdo con la fórmula (I) pueden contener un grupo funcional ácido, suficientemente ácido para formar sales. Las sales representativas incluyen sales de metales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, aluminio y zinc; carbonatos y bicarbonatos de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, aluminio y zinc; aminas primarias, secundarias y terciarias orgánicas farmacéuticamente aceptables que incluyen aminas alifáticas, aminas aromáticas, diaminas alifáticas e hidroxialquilaminas, tales como metilamina, etilamina, 2-hidroxietilamina, dietilamina, trietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina y ciclohexilamina. 25

Ciertos compuestos de acuerdo con la fórmula (I) pueden contener un grupo funcional básico y por tanto ser capaces de formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables por tratamiento con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables representativas incluyen hidrocloreto, hidrobromuro, nitrato, metilnitrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, fosfato, acetato, hidroxiacetato, 30 fenilacetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, maleato, hidroximaleato, acrilato, fumarato, malato, tartrato, citrato, salicilato, *p*-aminosalicilato, glicolato, lactato, heptanoato, ftalato, oxalato, succinato, benzoato, *o*-acetoxibenzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, mandelato, tanato, formiato, estearato, ascorbato, palmitato, oleato, piruvato, pamoato, malonato, laurato, glutarato, glutamato, estolato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato (esilato), 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), 40 *p*-aminobencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato (tosilato) y naftaleno-2-sulfonato.

También se describen procedimientos para preparar el compuesto de fórmula (I). Como ilustración se describe un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I)

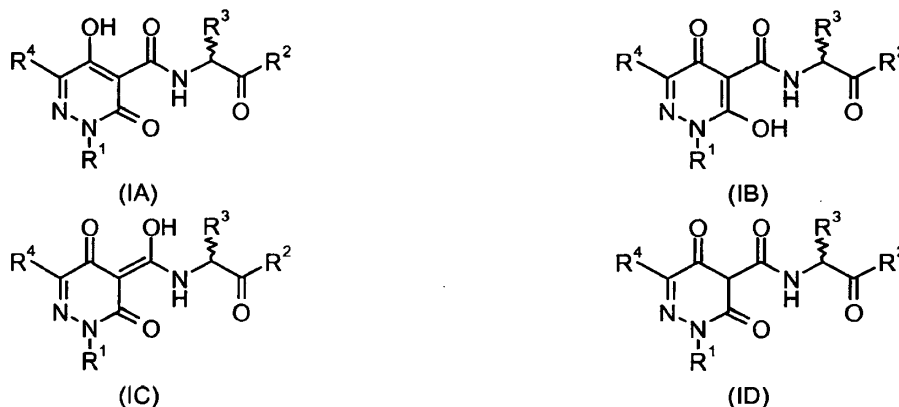


45 en donde R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son como se han definido anteriormente para la fórmula (I), comprendiendo el procedimiento tratar un compuesto de fórmula A:



en donde R^1 y R^4 son los mismos que para los grupos de la fórmula (I), con una sal de sodio de α -aminoácido en un disolvente apropiado, tal como 2-metoxietanol, en condiciones térmicas convencionales o por irradiación de microondas, formando un compuesto de fórmula (I) en donde R^2 es $-\text{OH}$.

Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de fórmula (I) pueden existir en una o más formas tautómeras, tales como:



Todas las formas tautómeras de los compuestos descritos en la presente memoria, incluyendo sus mezclas, están destinadas a ser abarcadas por el alcance de la invención. En general, a los compuestos ilustrativos de la presente memoria se les han asignado nombres basados en la estructura del tautómero de fórmula (IA). Debe entenderse que cualquier referencia a los compuestos nombrados de esta invención pretende abarcar todos los tautómeros de los compuestos nombrados y cualesquiera mezclas de tautómeros de los compuestos nombrados.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar en forma cristalina o no cristalina y, si es cristalina, pueden estar opcionalmente solvatados, por ejemplo, como el hidrato. Esta invención incluye dentro de su alcance solvatos estequiométricos (por ejemplo, hidratos) así como compuestos que contienen cantidades variables de disolvente (por ejemplo, agua).

Algunos de los compuestos descritos en la presente memoria pueden contener uno o más átomos quirales o pueden ser capaces de existir de otra manera como dos enantiómeros. Los compuestos descritos incluyen mezclas de enantiómeros, así como enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente enriquecidas. También se describen los isómeros individuales de los compuestos representados por la fórmula (I), así como cualquiera de sus mezclas total o parcialmente equilibradas. Además, se entiende que cualquiera de los tautómeros y mezclas de tautómeros de los compuestos reivindicados están incluidos dentro del alcance de los compuestos de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Cuando existen diferentes formas isómeras se pueden separar o resolver unas de las otras por métodos convencionales, o se puede obtener cualquier isómero dado por métodos de síntesis convencionales o por síntesis estereoespecífica o asimétrica.

Si bien es posible que, para uso en terapia, un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), así como sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueda administrar como una preparación neta, es decir, sin vehículo adicional, la práctica más habitual es presentar el ingrediente activo asociado a un vehículo o diluyente. Por consiguiente, la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula (Ib), (Ic), o (Id) y sus sales, son como se han descrito anteriormente. El o los vehículos, diluyentes o excipientes deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para su receptor. También se proporciona un proceso para la preparación de una formulación farmacéutica que incluye mezclar un compuesto de la fórmula (I), o sus sales, solvatos, etc., con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los expertos en la técnica apreciarán que ciertos derivados protegidos de los compuestos de fórmula (I), que pueden ser preparados antes de una etapa de desprotección final, pueden no poseer actividad farmacológica como tales, pero pueden, en ciertos casos, ser administrados por vía oral o parenteral y posteriormente ser metabolizados en el cuerpo formando compuestos de fórmula (I) que son farmacológicamente activos. Por tanto, dichos derivados se pueden describir como "profármacos". Los ejemplos de profármacos adecuados para los compuestos de fórmula (I) están descritos en *Drugs of Today, Volume 19, Number 9, 1983, pp 499-538* y en *Topics in Chemistry, Chapter 31, pp 306-316* y en *"Design of Prodrugs"* de H. Bundgaard, Elsevier, 1985, Chapter 1. Los expertos en la técnica apreciarán además que ciertos restos, conocidos por los expertos en la técnica como "pro-restos", por ejemplo como ha sido descrito por H. Bundgaard en *"Design of Prodrugs"* (la descripción de cuyo documento se incorpora aquí como referencia) pueden ser colocados en funcionalidades apropiadas cuando dichas funcionalidades están presentes dentro de los compuestos de fórmula (I). Los profármacos preferidos para los compuestos de fórmula (I)

incluyen: ésteres, ésteres carbonatos, hemi-ésteres, ésteres fosfatos, ésteres nitrados, ésteres sulfatos, sulfóxidos, amidas, carbamatos, compuestos azoicos, fosfamidas, glicósidos, éteres, acetales y cetales.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contengan una cantidad predeterminada de ingrediente activo por dosis unitaria. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, de 0,5 mg a 1 g, preferiblemente de 1 mg a 700 mg, más preferiblemente de 5 mg a 100 mg de un compuesto de la fórmula (I), dependiendo de la afección que se ha de tratar, la vía de administración y la edad, peso y estado del paciente, o las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contengan una cantidad predeterminada de ingrediente activo por dosis unitaria. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis o sub-dosis diaria, como se ha indicado anteriormente, o una de sus fracciones apropiadas, de un ingrediente activo. Además, dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar por cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo, asociando un compuesto de fórmula (I) con el o los vehículos o excipientes.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas del tipo aceite-en-agua o emulsiones líquidas del tipo agua-en-aceite.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente, y rellenando vainas de gelatina conformadas. Se pueden añadir a la mezcla en polvo antes de la operación de llenado agentes deslizantes y lubricantes, tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido. También se puede añadir un agente disgregante o solubilizante, tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiera la cápsula.

Por otra parte, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar-agar, bentonita, goma xantán y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulando o formando tarugos, añadiendo un lubricante y disgregante y prensando para formar comprimidos. Una mezcla en polvo se prepara mezclando el compuesto, convenientemente triturado, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante, tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un retardante en solución, tal como parafina, un acelerador de la resorción, tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción, tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular por troqueles formadores de comprimidos mediante la adición de ácido esteárico, una sal estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada se comprime después en forma de comprimidos. Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar con un vehículo inerte que fluya libremente y comprimirse directamente en forma de comprimidos sin pasar a través de las etapas de granulación o formación de tarugos. Se puede proporcionar un recubrimiento protector transparente u opaco que consiste en un recubrimiento sellante de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polímero y un recubrimiento de pulido de cera. A estos recubrimientos se pueden añadir colorantes para distinguir las diferentes dosificaciones unitarias.

Los fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria de manera que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada de un compuesto de fórmula (I). Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa convenientemente aromatizada, mientras que los elixires se preparan usando un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes, tal como aceite de menta, o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas en dosificaciones unitarias para administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación, como por ejemplo, recubriendo o insertando material en partículas en polímeros, cera o similares.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal se pueden presentar en forma de supositorios o enemas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal se pueden presentar en forma de óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de puesta en suspensión y agentes espesantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (líoфильizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las composiciones farmacéuticas pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo las adecuadas para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, la edad y el peso del receptor previsto, la afección concreta que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración, y finalmente será a discreción del médico que prescribe la medicación. Sin embargo, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id) para el tratamiento de la anemia estará generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso del receptor al día y más usualmente en el intervalo de 1 a 10 mg/kg de peso al día. Por lo tanto, para un mamífero adulto de 70 kg, la cantidad real al día sería generalmente de 70 a 700 mg y esta cantidad se puede administrar en una sola dosis al día o más generalmente en un número (tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis) de subdosis al día, de tal manera que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad eficaz de una sal o solvato, etc., se puede determinar como una proporción de la cantidad eficaz del compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id) *per se*. Se considera que serían apropiadas dosificaciones similares para el tratamiento de las otras afecciones mencionadas anteriormente.

Definiciones

ta - temperatura ambiente

DBU - 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCM - diclorometano

DMF - dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

KHMDS - hexametildisilazida potásica

LCMS – cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

MTBE – metil-t-butil-éter

NMR – resonancia magnética nuclear

ODS - octadecilsililo

PTFE - politetrafluoroetileno

RP-HPLC – cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa

TFA – ácido trifluoroacético

THF - tetrahidrofurano

Antecedentes químicos:

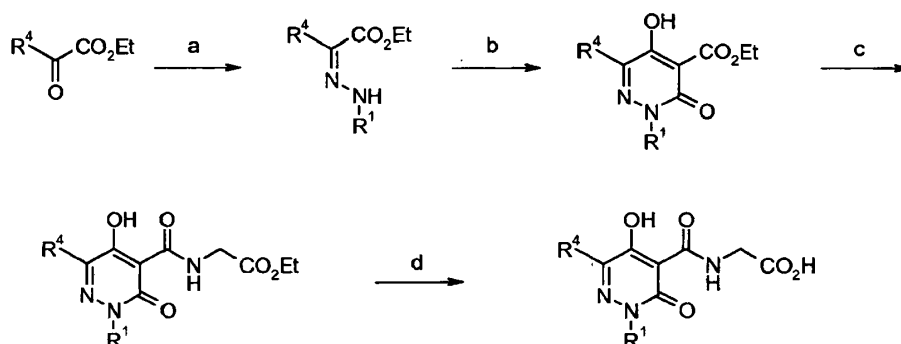
Los compuestos de esta invención se puede preparar por una variedad de métodos, incluyendo los clásicos de química. Cualquier variable definida previamente continuará teniendo el significado previamente definido salvo que se indique lo contrario. A continuación se detallan métodos de síntesis generales ilustrativos y después se da en los ejemplos los compuestos específicos de la invención que se ha preparado.

Los compuestos de fórmula general (I) se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica de síntesis orgánicas como exponen en parte los siguientes esquemas de síntesis. En todos los esquemas descritos a continuación se entiende bien que los grupos protectores para los grupos sensibles o reactivos se emplean cuando es necesario de acuerdo con los principios generales de la química. Los grupos protectores se manipulan de acuerdo con métodos estándares de síntesis orgánica (*T. W. Green and P. G. M. Wuts (1991) Protecting Groups in*

Organic Synthesis, John Wiley & Sons). Estos grupos se eliminan en una etapa conveniente de la síntesis del compuesto usando métodos que son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. La selección de los procesos, así como las condiciones de reacción y el orden de su ejecución deberán ser coherentes con la preparación de los compuestos de fórmula (I). Los expertos en la técnica reconocerán si existe un estereocentro en los compuestos de fórmula (I). En consecuencia, se describen ambos estereoisómeros posibles y no sólo los compuestos racémicos sino también los enantiómeros individuales. Cuando se desea un compuesto como un solo enantiómero, se puede obtener por síntesis estereoespecífica o por resolución del producto final o cualquier compuesto intermedio conveniente. La resolución del producto final, un compuesto intermedio o un material de partida se puede efectuar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, *Stereochemistry of Organic Compounds* de E. L. Eliel, S. H. Wilen, and L. N. Mander (Wiley-Interscience, 1994).

Métodos de preparación descritos

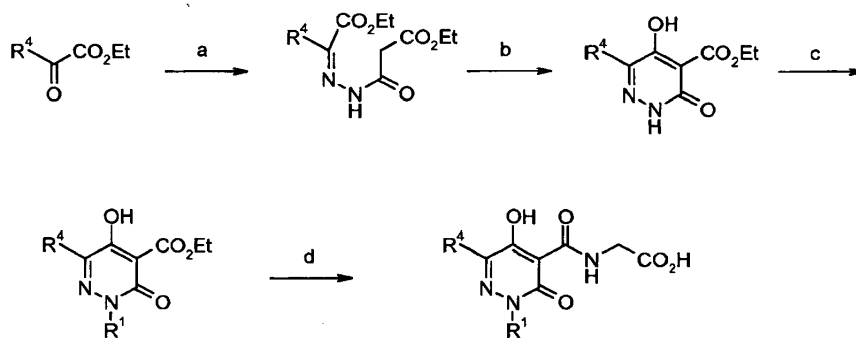
Esquema 1



a) $R^1NHNH_2 \cdot 2HCl$, $EtNPr_2$ o $NaOAc$, CH_2Cl_2 o $R^1NHNH_2 \cdot 2HCl$, DBU, EtOH, microondas, 150°C; b) $ClOCC(=O)CO_2Et$, NaH o DBU, THF, temperatura ambiente (ta) o 60°C;

c) DBU, THF o dioxano, reflujo o microondas, 130°C; d) $NaO_2CCH_2NH_2$, $MeOCH_2CH_2OH$, reflujo.

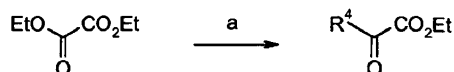
Esquema 2



a) $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, AcOH, CH_2Cl_2 o $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, TsOH, PhMe, reflujo o $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, AcOH, EtOH, (con o sin $MgSO_4$), reflujo o microondas, 150°C; b) KHMDS, $KOBu^t$ o DBU, PhMe, Bu^tOH o dioxano, reflujo o microondas, 150°C o $KOBu^t$, Bu^tOH , microondas, 150°C;

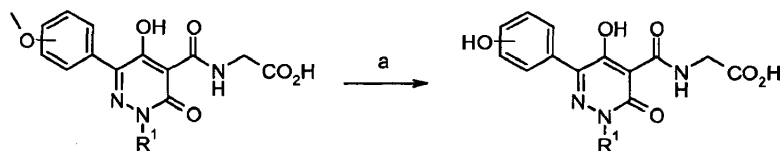
c) NaH, R^1Br , DMF, 0°C hasta la ta; d) $NaO_2CCH_2NH_2$, $MeOCH_2CH_2OH$ o EtOH, reflujo o microondas, 150°C.

Esquema 3



a) R^4MgBr o R^4Li , THF o Et_2O , $-78^\circ C$ hasta $0^\circ C$

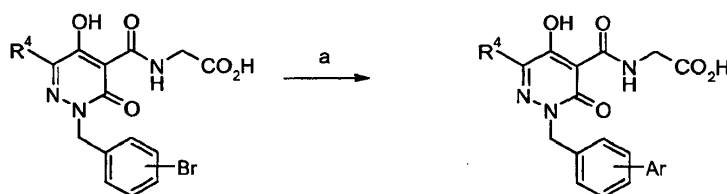
Esquema 4



a) HBr acuoso al 48%, AcOH, reflujo

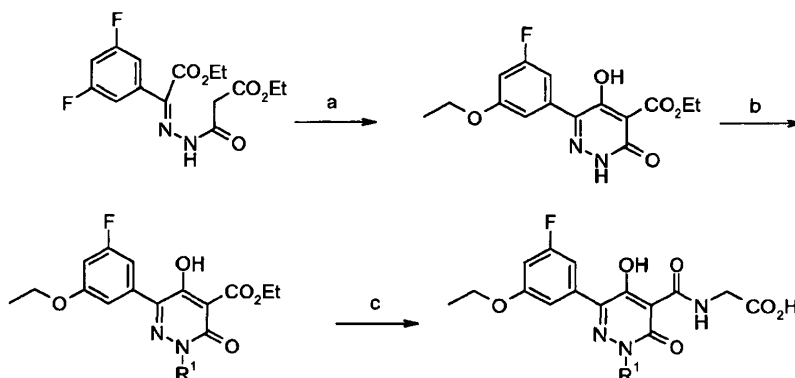
5

Esquema 5



a) $\text{ArB}(\text{OH})_2$ o $\text{ArB}(\text{OR})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 acuoso, dioxano, microondas, 100°C

Esquema 6



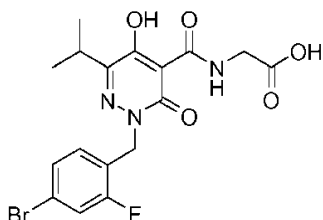
10 a) KHMDS, dioxano, reflujo; b) NaH, R¹Br, DMF, 0°C hasta la temperatura ambiente (ta); c) NaO₂CCH₂NH₂, MeOCH₂CH₂OH, reflujo o microondas, 150°C.

Parte experimental

Compuesto intermedio 1

En 3 tubos separados para microondas se añadieron etil-3-metil-2-oxobutirato (5 g, 34,7 mmol) y etilmalonilhidrazida (6,08 g, 41,6 mmol) en etanol (10 mL) y ácido acético (0,5 mL). Las mezclas de reacción se irradiaron a 150°C durante 20 minutos. Las mezclas de reacción en bruto se evaporaron hasta obtener un aceite amarillo. Los 3 aceites en bruto se volvieron a poner en suspensión por separado en 1,4-dioxano (12 mL) y se añadió DBU (7,84 mL, 52,0 mmol). Cada solución se dividió en 2 tubos de microondas y las mezclas de reacción se irradiaron a 150°C durante 20 minutos. Se reunieron las fracciones, se diluyó con agua (80 mL) y se acidificó lentamente (durante 15 minutos) con HCl 6N para obtener un precipitado. El precipitado se recogió por filtración y se secó obteniéndose el producto en forma de un sólido blancuzco (11,12 g, 46,7 mmol, rendimiento 44,9%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 12,64 (s, 1 H), 12,31 (s, 1 H), 4,28 (q, J = 7,16 Hz, 2 H), 3,13 (sept, J = 6,82 Hz, 1 H), 1,27 (t, J = 7,07 Hz, 3 H), 1,14 (d, J = 6,82 Hz, 6 H). MS (ES +) m/e 227 [M + H]⁺.

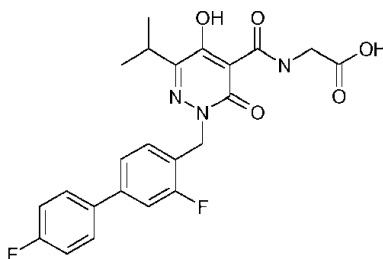
Ejemplo 1



N-([2-[(4-Bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina

- 5 1a) 2-[(4-Bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo. A una solución de 5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo (Intermedio 1, 9,5 g, 42,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF) (250 ml) a 0 °C se añadió hidruro de sodio (60% en aceite, 2,52 g, 63,0 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y después se volvió a enfriar a 0 °C y se añadió bromuro de 4-bromo-2-fluorobencilo (12,38 g, 46,2 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas y después se paró la reacción con HCl 1N (10 ml) y se diluyó con agua (30 ml). La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x100 ml), las capas orgánicas se combinaron y lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y los disolventes se separaron por evaporación rotatoria. El aceite bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (10-100% de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar el producto bruto (8 g, ~75% puro, 35% de rendimiento) como un sólido amarillo pálido. El producto bruto se purificó por HPLC rp (C18, 75-90% de acetonitrilo/formiato de amonio acuoso 0,3 M) para dar el compuesto del título como un polvo blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,13 (d, *J*=6,82 Hz, 6 H) 1,26 (t, *J*=7,20 Hz, 3 H) 3,09 - 3,17 (m, 1 H) 4,26 (q, *J*=7,07 Hz, 2 H) 5,16 (s, 2 H) 7,21 (t, *J*=8,08 Hz, 1 H) 7,40 (dd, *J*=8,34,1,77 Hz, 1 H) 7,57 (dd, *J*=9,73, 1,89 Hz, 1 H) 12,31 (s, 1 H). MS(ES+) *m/e* 413 [M+H]⁺.
- 20 1b) N-([2-[(4-Bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil] glicina. A un matraz de fondo redondo de 500 mL se añadieron 2-[(4-bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo (9 g, 21,78 mmol) y sal sódica de glicina (5,28 g, 54,4 mmol) en 2-metoxietanol (150 ml) y la mezcla se mantuvo a reflujo a 135 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (50 ml) y se aciduló con HCl 1N para dar un precipitado blanquecino que se recogió por filtración y se lavó con agua, hexanos y éter para dar N-([2-[(4-bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina (7,20 g, 16,20 mmol, 74,4 % de rendimiento). El producto 98% puro se recrystalizó en etanol para dar 7,0 g de polvo cristalino blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 15,91 (s, 1 H), 12,97 (s, 1 H), 10,11 (t, *J*=5,56 Hz, 1 H), 7,58 (dd, *J*=9,60, 2,02 Hz, 1 H), 7,40 (dd, *J*=8,21, 1,64 Hz, 1 H), 7,25 (t, *J*=8,21 Hz, 1 H), 5,26 (s, 2 H), 4,10 (d, *J*=5,56 Hz, 2 H), 3,16 (sept, *J*=6,85, 6,69 Hz, 1 H), 1,16 (d, *J*=6,82 Hz, 6 H). MS(ES+) *m/e* 444 [M+H]⁺.
- 30

Ejemplo 2

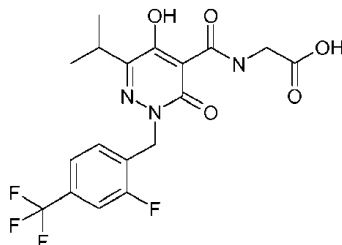


N-([2-[(3,4'-Difluoro-4-bifenilil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina

- 35 A un tubo apto para microondas de 5 ml se añadieron N-([2-[(4-bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina (Ejemplo 1(b), 40 mg, 0,09 mmol), ácido 4-fluorobenzoico (15,2 mg, 0,11 mmol), carbonato de potasio (38 mg, 0,272 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (3 mg, 2,7 μmol), 1,4-dioxano (1,5 ml) y agua (0,500 ml). La mezcla se irradió a 100 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua (5 ml), se aciduló con HCl 1N (2 ml), y se extrajo con acetato de etilo (20 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y los disolventes se separaron a presión reducida. El residuo bruto se purificó por cromatografía HPLC (sílice ODS, gradiente 25-95% acetonitrilo/agua (0,1% de TFA)) para dar el compuesto del título (23,5 mg, 0,051 mmol, 57 % de rendimiento) como un polvo blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 15,91 (s, 1 H), 12,96 (s, 1 H), 10,15 (t, *J*=5,31 Hz, 1 H), 7,69 - 7,80 (m, 2 H), 7,55 (dd, *J*=11,62, 1,77 Hz, 1 H), 7,48 (dd, *J*=8,08, 1,77 Hz, 1
- 40

H), 7,23 - 7,38 (m, 3 H), 5,34 (s, 2 H), 4,10 (d, $J=5,56$ Hz, 2 H), 3,19 (m, 1 H), 1,19 (d, $J=6,82$ Hz, 6 H). MS(ES+) m/e 458 [M+H]⁺.

Ejemplo 3



5 N-([2-([2-Fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina

- 3a) 2-([2-Fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo. A una solución de 5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo (Intermedio 1, 0,5 g, 2,210 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF) (50 ml) a 0 °C se añadió hidruro de sodio (0,133 g, 3,32 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos y después se volvió a enfriar a 0 °C y se añadió 1-(bromometil)-2-fluoro-4-(trifluorometil)benceno (0,568 g, 2,210 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas y después se paró la reacción con HCl 1N (2 ml) y se diluyó con agua (10 ml). La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml), las capas orgánicas se combinaron y lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y los disolventes se separaron por evaporación rotatoria. El aceite bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (5-100% de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar el compuesto del título (2-([2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo (335 mg, 0,749 mmol, 33,9 % de rendimiento) como un aceite claro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,36 (s, 1 H), 7,67 - 7,73 (m, 1 H), 7,58 (d, $J=8,84$ Hz, 1 H), 7,45 (t, $J=7,58$ Hz, 1 H), 5,27 (s, 2 H), 4,27 (q, $J=7,07$ Hz, 2 H), 3,15 (sept, $J=6,78$ Hz, 1 H), 1,26 (t, $J=7,07$ Hz, 3 H), 1,13 (d, $J=6,82$ Hz, 6 H). MS(ES+) m/e 403 [M+H]⁺.
- 3b) N-([2-([2-Fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil] glicina. A un tubo apto para microondas de 5 mL se añadió 2-([2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazincarboxilato de etilo (275mg, 0,684 mmol) y sal sódica de glicina (166 mg, 1,709 mmol) en 2-metoxietanol (2 ml) y la mezcla se irradió a 150 °C durante 20 minutos. La mezcla de reacción bruta cambió a color azul violeta. La mezcla se diluyó con agua (10 ml) y se aciduló con HCl 1N. La solución acuosa se extrajo después con acetato de etilo (40 mL), la materia orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se separó por evaporación. El aceite azul bruto se purificó por cromatografía HPLC (sílice ODS, gradiente 25-95% de acetonitrilo/agua (0,1% de TFA)) para dar el compuesto del título, N-([2-([2-fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil)-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil]glicina (45 mg, 0,103 mmol, 15,11 % de rendimiento), como un sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 15,94 (s, 1 H), 12,97 (s ancho, 1 H), 10,09 (t, $J=5,18$ Hz, 1 H), 7,72 (d, $J=10,11$ Hz, 1 H), 7,54 - 7,62 (m, 1 H), 7,49 (t, $J=7,45$ Hz, 1 H), 5,38 (s, 2 H), 4,09 (d, $J=5,56$ Hz, 2 H), 3,17 (sept, $J=6,82$ Hz, 1 H), 1,17 (d, $J=6,82$ Hz, 6 H). MS(ES+) m/e 432 [M+H]⁺.

Antecedentes biológicos:

Las siguientes referencias dan información sobre las enzimas diana, HIF prolin-hidroxilasas, y los métodos y materiales para medir su inhibición por moléculas pequeñas.

- 35 M. Hirsilä, P. Koivunen, V. Günzler, K. I. Kivirikko, y J. Myllyharju "Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-inducible Factor" J. Biol. Chem., 2003, 278, 30772-30780.
- C. Willam, L. G. Nicholls, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh, P. H. Maxwell "The prolyl hydroxylase enzymes that act as oxygen sensors regulating destruction of hypoxia-inducible factor α" Advan. Enzyme Regul., 2004, 44, 75-92
- 40 M. S. Wiesener, J. S. Jürgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Hörstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell, y K.-U. Eckardt "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2α in distinct cell populations of different organs" FASEB J., 2003, 17, 271-273.
- S. J. Klaus, C. J. Molineaux, T. B. Neff, V. Guenzler-Pukall, I. Lansetmo Parobok, T. W. Seeley, R. C. Stephenson "Use of hypoxia-inducible factor α (HIFα) stabilizers for enhancing erythropoiesis" PCT Int. Appl. (2004), WO 2004/108121 A1
- 45 C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener, y K.-U. Eckardt "Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and HIF-2α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2α target gene in Hep3B and Kelly cells" FASEB J., 2004, 18, 1462-1464.

Para la expresión de EGLN3 véase:

R. K. Bruick y S. L. McKnight "A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF" *Science*, 2001, 294, 1337-1340.

Para la expresión de HIF2 α -CDD véase:

5 a) P. Jaakkola, D. R. Mole, Y.-M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe "Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation" *Science*, 2001, 292, 468-472.

10 b) M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, W. G. Kaelin Jr. "HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing" *Science*, 2001, 292, 464-468.

Para la expresión de VHL, elongina b y elongina c, véase:

A. Pause, S. Lee, R. A. Worrell, D. Y. T. Chen, W. H. Burgess, W. M. Linehan, R. D. Klausner "The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 2156-2161.

15 Ensayos biológicos

Ensayo de EGLN3

Materiales:

20 His-MBP-EGLN3 (6HisMBPAttB1EGLN3(1-239)) se expresó en *E. coli* y se purificó en una columna de afinidad para amilasa. Biotin-VBC [6HisSumoCysVHL(2-213), 6HisSumoElonginaB(1-118) y 6HisSumoElonginaC(1-112)] y His-GB1-HIF2 α -CDD (6HisGB1teVHIF2A(467-572)) se expresaron en *E. coli*.

Método:

25 HIF2 α CDD marcado con Cy5 y un complejo de VBC marcado con biotina se utilizaron para determinar la inhibición de EGLN3. La hidroxilación de EGLN3 del sustrato Cy5CDD da como resultado su reconocimiento por biotina-VBC. La adición de un quelato de europio/estreptavidina (Eu/SA) da como resultado la proximidad de Eu a Cy5 en el producto, lo que permite la detección por transferencia de energía. Una relación de la emisión de Cy5 a Eu (relación LANCE) es la lectura final, ya que este parámetro normalizado tiene significativamente menos varianza que la emisión de Cy5 solo.

30 A continuación se sellaron 50 nL de inhibidores en DMSO (o controles de DMSO) en una placa Corning NBS de 384 pocillos de bajo volumen, seguido por adición de 2,5 μ L de enzima [50 mL de tampón (HEPES 50 mM/KCl 50 mM) + 1 mL de una solución de 10 mg/mL de BSA en tampón + 6,25 μ L de una solución de 10 mg/mL de FeCl₂ en agua + 100 μ L de una solución 200 mM de ácido ascórbico en agua + 15,63 μ L de EGLN3] o de control [50 mL de tampón + 1 mL de una solución de 10 mg/mL de BSA en tampón + 6,25 μ L de una solución de 10 mg/mL de FeCl₂ en agua + 100 μ L de una solución 200 mM de ácido ascórbico en agua]. Después de una incubación de 3 minutos, se añadieron 2,5 μ L de sustrato [50 mL de tampón + 68,6 μ L de biotina-VBC + 70,4 μ L de Eu (a una disolución madre de 710 μ g/mL) + 91,6 μ L de Cy5CDD + 50 μ L de una solución 20 mM de ácido 2-oxoglutarico en agua + CHAPS 0,3 mM] y se incubaron durante 30 minutos. La placa se cargó en un Perkin Elmer Viewlux para formación de imágenes. Para los experimentos de respuesta a la dosis, los datos normalizados fueron ajustados por ABASE/XC50 usando la ecuación $y = a + (b-a)/(1 + (10^x/10^c)^d)$, donde a es el porcentaje de actividad mínima, b es el porcentaje de actividad máxima, c es la pCl₅₀ y d es la pendiente de Hill.

40 La Cl₅₀ para los compuestos de fórmula (I) en el ensayo de EGLN3 varió desde aproximadamente 1 a 3200 nanomolar. Este intervalo representa los datos acumulados hasta el momento de la presentación de esta solicitud inicial. Ensayos posteriores puede mostrar variaciones de los datos de Cl₅₀ debido a las variaciones de los reactivos, las condiciones y variaciones en el o los métodos utilizados entre las enumeradas anteriormente en la presente memoria. Así que este intervalo ha de ser considerado como ilustrativo y no un conjunto absoluto de números.

45 Medición de la proteína Epo producida por la línea de células Hep3B usando el método ELISA

50 Se sembraron células Hep3B obtenidas en American Type Culture Collection (ATCC) a 2x10⁴ células/pocillo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + FBS al 10% en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron a 37°C/CO₂ al 5%/90% de humedad (condiciones estándares de incubación de cultivos celulares). Después de adherencia durante la noche, se separó el medio y se reemplazó por DMEM sin suero que contenía el compuesto de ensayo o por control negativo de DMSO. Después de 48 horas de incubación, se recogió el medio de cultivo celular y se analizó por ELISA para cuantificar la proteína Epo.

Medición de la proteína Epo producida por la línea de células Hep3B usando el método AlphaLISA

Se sembraron células Hep3B obtenidas en American Type Culture Collection (ATCC) a 2×10^4 células/pocillo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + FBS al 10% en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5%/90% de humedad (condiciones estándares de incubación de cultivos celulares). Después de adherencia durante la noche, se separó el medio y se reemplazó por DMEM con 2% de suero que contenía el compuesto de ensayo o por control negativo de DMSO. Después de 48 horas de incubación, se recogió el medio de cultivo celular y se congeló para el ensayo posterior o se analizó inmediatamente por AlphaLISA para cuantificar la proteína Epo.

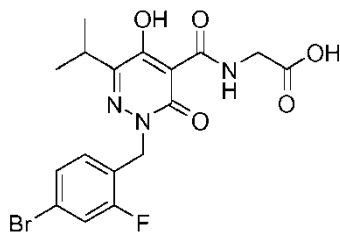
La CE_{50} para los compuestos de fórmula (I) en los ensayos ELISA y AlphaLISA de Hep3B varió desde aproximadamente 0,4 hasta 100 micromolar usando los reactivos y en las condiciones descritas anteriormente en la presente memoria. Este intervalo representa los datos acumulados hasta el momento de la presentación de esta solicitud inicial. Ensayos posteriores pueden mostrar variaciones de los datos de CI_{50} debido a las variaciones de los reactivos, las condiciones y variaciones en el o los métodos utilizados entre las enumeradas anteriormente en la presente memoria. Así que este intervalo ha de ser considerado como ilustrativo y no un conjunto absoluto de números.

Se cree que estos compuestos son útiles en terapia como se ha definido anteriormente y que no tienen efectos inadecuados o inaceptables cuando se utilizan en el cumplimiento de un régimen terapéutico permitido.

REIVINDICACIONES

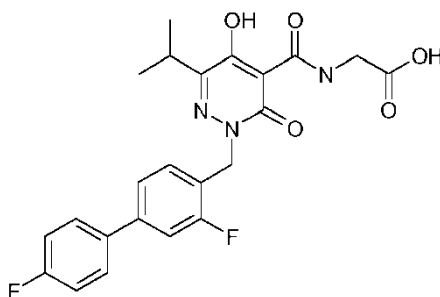
1. Un compuesto seleccionado de:

N-{[2-[(4-Bromo-2-fluorofenil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Ib)



(Ib);

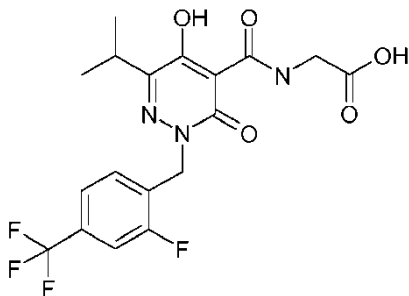
N-{[2-[(3,4'-Difluoro-4-bifenilil)metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Ic)



(Ic);

y

N-{[2-[[2-Fluoro-4-(trifluorometil)fenil]metil]-5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-dihidro-4-piridazinil]carbonil}glicina, de fórmula (Id)



(Id);

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en terapia de mamíferos.

3. Un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la anemia.

4. Uso de un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de la anemia.

5. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3 o para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la anemia está asociada a quimioterapia del cáncer.

6. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 3 o para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la anemia está asociada a una enfermedad renal.

7. Uso del compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de la isquemia.

8. Un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la isquemia.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ib), (Ic), o (Id), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la reivindicación 1, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5