



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102802628 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201080028776. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 21

*A61K 31/50* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 31/4965* (2006. 01)

61/221, 838 2009. 06. 30 US

*A61K 31/515* (2006. 01)

61/237, 467 2009. 08. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/039292 2010. 06. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/002624 EN 2011. 01. 06

(71) 申请人 默沙东公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M. J. 克莱门茨 J. S. 德本汉

J. J. 黑尔 C. 梅森 - 杜根

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 熊玉兰 刘健

权利要求书 1 页 说明书 14 页

序列表 1 页

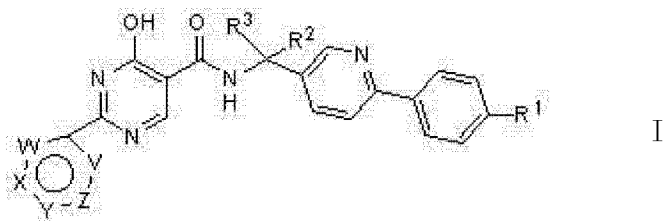
(54) 发明名称

取代的 4- 羟基嘧啶 -5- 甲酰胺

(57) 摘要

本发明涉及取代的 4- 羟基嘧啶 -5- 甲酰胺, 其用作 HIF 脯氨酰羟化酶抑制剂以治疗贫血和类似状况。

1. 式 I 化合物或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐：



$R^1$  选自  $-C_{1-10}$  烷基、 $-C_{2-10}$  烯基、 $-C_{2-10}$  炔基和  $-C_{1-6}$  烷氧基, 其中, 在  $R^1$  中所述烷基、烯基、炔基和烷氧基各自任选地被 1、2 或 3 个  $R^8$  取代基取代；

$R^2$  和  $R^3$  各自独立地选自氢和任选地被 1、2 或 3 个取代基取代的  $-C_{1-10}$  烷基, 所述取代基选自卤代、羟基和  $-OC_{1-10}$  烷基；

V、W、X、Y 和 Z 各自独立地选自 N 和 CH, 其中 V、W、X、Y 或 Z 被 1 或 2 个氮替代, 并且 V 或 W 中至少一个必须是 N；和

$R^8$  选自卤素、羟基、 $-C_{1-10}$  烷基、 $-C_{1-10}$  烯基、 $-C_{1-10}$  炔基、氰基、氧代、 $C_{2-6}$  二氟甲氧基、三氟甲氧基和 2, 2, 2- 三氟乙氧基。

2. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^1$  选自  $-C_{1-10}$  烷基和  $-C_{1-6}$  烷氧基, 所述烷基和烷氧基各自任选地被 1、2、或 3 个  $R^8$  取代基取代。

3. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^1$  是  $-C_{1-6}$  烷氧基。

4. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^2$  和  $R^3$  各自独立地选自任选地被 1、2 或 3 个取代基取代的  $-C_{1-10}$  烷基, 所述取代基选自卤代、羟基和  $-OC_{1-10}$  烷基。

5. 权利要求 4 所述的化合物, 其中  $R^2$  和  $R^3$  各自是甲基。

6. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 W 和 X 各自是 N, 并且 V、Y 和 Z 各自是 CH。

7. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 V 和 W 各自是 N, 并且 X、Y 和 Z 各自是 CH。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其选自 4- 羟基 -N- {1- [6- (4- 甲氧基苯基) 吡啶 -3- 基] -1- 甲基乙基} -2- 哒嗪 -3- 基嘧啶 -5- 甲酰胺或其药学可接受的盐。

9. 根据权利要求 8 所述的化合物, 其选自 4- 羟基 -N- {1- [6- (4- 甲氧基苯基) 吡啶 -3- 基] -1- 甲基乙基} -2- 哒嗪 -3- 基嘧啶 -5- 甲酰胺的药学可接受的盐。

10. 药物组合物, 其包含: 权利要求 1 所述的化合物、或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐, 以及药学可接受的载体。

11. 增强哺乳动物中促红细胞生成素的内源生产的方法, 其包括给所述哺乳动物施用对于增强促红细胞生成素的内源生产有效的量的权利要求 1 所述的化合物、或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐。

12. 用于预防或治疗哺乳动物中的贫血的方法, 其包括给所述哺乳动物施用有效量的权利要求 1 所述的化合物、或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐。

13. 权利要求 1 所述的化合物、或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐在制备用于治疗由 HIF 脯氨酰羟化酶介导的状况的药物中的应用。

## 取代的 4- 羟基嘧啶 -5- 甲酰胺

### [0001] 发明背景

氧对细胞和组织的不足递送与贫血和缺血相关,所述贫血定义为血液的携氧能力中的缺陷,在所述缺血中血液供应中的限制由血管收缩或阻塞引起。贫血可以由红细胞丧失(出血)、过度红细胞破坏(溶血)或红细胞生成(来自骨髓中发现的前体的红细胞生产)中的缺陷引起。贫血的症状可以包括虚弱、头晕、疲劳、苍白、认知功能受损和生活质量的全面下降。慢性和/或严重贫血可以导致心肌、脑或外周缺血的加剧且导致心力衰竭。缺血定义为氧对组织或器官的绝对或相对短缺,并且可以起因于病症例如动脉粥样硬化、糖尿病、血栓栓塞、低血压等。心脏、脑和肾对于由低血液供应引起的缺血应激特别敏感。

[0002] 用于贫血的主要药理学治疗是重组人促红细胞生成素(EPO)的某些变体的施用。对于与肾疾病相关的贫血、化学疗法诱导的贫血、来自HIV治疗的贫血或由于失血的贫血,施用重组EPO以增强激素的供应,校正红细胞的短缺且增加血液的携氧能力。EPO替代不总是足以刺激最佳红细胞生成(例如在具有铁加工缺陷的患者中)且具有相关危险。

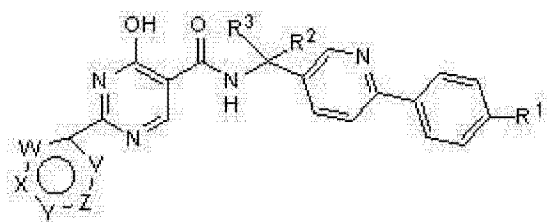
[0003] 低氧诱导因子(HIF)已鉴定为对低氧的细胞应答的主要调节物。HIF是由高度调节的 $\alpha$ -亚单位(HIF- $\alpha$ )和组成性表达的 $\beta$ -亚单位(HIF- $\beta$ ,也称为ARNT或芳烃受体核转运蛋白)组成的异二聚基因转录因子。据报道HIF靶基因与红细胞生成(例如促红细胞生成素(EPO)和EPO受体)、糖酵解和血管发生(例如血管内皮生长因子(VEGF))的各个方面相关。关于涉及铁吸收、转运和利用以及血红素合成的蛋白质的基因也是HIF的靶。

[0004] 在正常氧合下,HIF- $\alpha$ 是在与分子氧反应中的底物,这通过称为PHD-1(EGLN2,或产蛋异常9同系物2 PHD2(EGLN1)和PHD3(EGLN3)的铁(II)-2-酮戊二酸和抗坏血酸盐依赖性双加氧酶家族催化。HIF- $\alpha$ 的脯氨酸残基是羟基化的(例如HIF-1 $\alpha$ 的Pro-402和Pro-564),并且所得到的产物是肿瘤抑制蛋白von-Hippel Lindau的靶,其为涉及蛋白质泛素化的E3泛素连接酶多蛋白复合物的组分。在低氧合下,HIF- $\alpha$ 羟化反应有效性较差,并且HIF- $\alpha$ 可用于与HIF- $\beta$ 二聚化。HIF二聚体易位至细胞核,在其中它们与HIF靶基因的低氧应答性增强子元件结合。

[0005] 已知HIF的细胞水平在低氧条件下和暴露于低氧模拟试剂后增加。后者包括但不限于特定金属离子(例如钴、镍、锰)、铁螯合剂(例如去铁胺)和2-酮戊二酸盐(2-ketoglurate)类似物(例如N-草酰甘氨酸)。本发明的化合物抑制HIF脯氨酸羟化酶(PHD-1、PHD-2、PHD-3),并且还可以作用于调节HIF水平。这些化合物因此具有用于治疗 and / 或预防在其中需要HIF调节的病症或状况例如贫血和缺血的效用。作为重组促红细胞生成素治疗的替代方案,本发明的化合物提供用于贫血管理的更简单和更广泛方法。

### [0006] 发明概述

本发明涉及抑制HIF脯氨酸羟化酶的式I化合物:

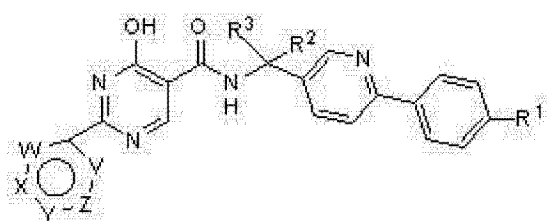


I

,其在增强促红细胞生成素的内源产生和在治疗与促红细胞生成素的内源产生减少相关的状况例如贫血和类似状况中的用途,以及包含此类化合物和药学载体的药物组合物。

#### [0007] 发明详述

本发明提供了式 I 的化合物或其药学可接受的盐、或其立体异构体、或其立体异构体的药学可接受的盐:



I

$R^1$  选自  $-C_{1-10}$  烷基、 $-C_{2-10}$  烯基、 $-C_{2-10}$  炔基和  $-C_{1-6}$  烷氧基,其中,在  $R^1$  中所述烷基、烯基、炔基和烷氧基各自任选地被 1、2 或 3 个  $R^8$  取代基取代;

$R^2$  和  $R^3$  各自独立地选自氢和任选地被 1、2 或 3 个取代基取代的  $-C_{1-10}$  烷基,该取代基选自卤代、羟基和  $-OC_{1-10}$  烷基;

V、W、X、Y 和 Z 各自独立地选自 N 和 CH,其中 V、W、X、Y 或 Z 被 1 或 2 个氮替代,并且 V 或 W 中至少一个必须是 N;和

$R^8$  选自卤素、羟基、 $-C_{1-10}$  烷基、 $-C_{1-10}$  烯基、 $-C_{1-10}$  炔基、氰基、氧代、二氟甲氧基、三氟甲氧基和 2,2,2-三氟乙氧基。

[0008] 本发明化合物的示例而非限制性实例是 4-羟基-N-{1-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基]-1-甲基乙基}-2-吡嗪-3-基嘧啶-5-甲酰胺;或其药学可接受的盐。

[0009] 在本发明的一个实施方案中, $R^1$  选自  $-C_{1-10}$  烷基、 $-C_{2-10}$  烯基和  $-C_{2-10}$  炔基,其中  $R^1$  中所述烷基、烯基和炔基各自任选地被 1、2、或 3 个  $R^8$  取代基取代。

[0010] 在本发明的另一个实施方案中, $R^1$  选自  $-C_{1-10}$  烷基和  $-C_{1-6}$  烷氧基,所述烷基和烷氧基各自任选地被 1、2、或 3 个  $R^8$  取代基取代。

[0011] 在本发明的另一个实施方案中, $R^1$  选自任选地被 1、2 或 3 个  $R^8$  取代基取代的  $-C_{1-6}$  烷氧基。在该实施方案的一个变体中, $R^1$  是甲氧基。

[0012] 在本发明的一个实施方案中, $R^2$  和  $R^3$  各自独立地是任选地被 1、2 或 3 个取代基取代的  $C_{1-10}$  烷基,该取代基选自卤代、羟基和  $-OC_{1-10}$  烷基。在该实施方案的一个变体中, $R^2$  和  $R^3$  各自独立地是  $C_{1-10}$  烷基。在另一个变体中, $R^2$  和  $R^3$  各自是甲基。

[0013] 在本发明的一个实施方案中,W 是 N,并且 V、X、Y 和 Z 各自是 CH。在一个实施方案中,W 和 X 是 N。在本发明的另一个实施方案中,W 和 Y 是 N。在本发明的又一个实施方案中,W 和 Z 是 N。

[0014] 在本发明的一个实施方案中, V 是 N, 并且 W、X、Y 和 Z 各自是 CH。在本发明的另一个实施方案中, V 和 Z 是 N。在本发明的另一个实施方案中, V 和 Y 是 N。在本发明的又一个实施方案中, W 和 X 是 N。

[0015] 在本发明的另一个实施方案中, W 和 V 是 N, 并且 X、Y 和 Z 各自是 CH。

[0016] 本发明的化合物, 特别是实施例 1 的化合物——其中  $R^1$  是甲氧基、 $R^2=R^3$  是甲基、 $W=X=N$  且 V、Y 和 Z 各自是 CH 或  $V=Z=N$  且 W、X 和 Y 各自是 CH, 提供了相对于 2009 年 3 月 9 日提交的国际 PCT 申请 PCT/US09/036501 所公开的实施例 187 出乎意料更加期望的药代动力学和脱靶活性特征(off target activity profile)。

[0017] 如本文使用的, 除了注明之处, “烷基” 意欲包括具有指定数目碳原子的支链和直链饱和脂肪族烃基, 包括所有异构体。关于烷基的通常使用的缩写说明书自始至终使用, 例如甲基可以由 “Me” 或  $CH_3$  表示, 乙基可以由 “Et” 或  $CH_2CH_3$  表示, 丙基可以由 “Pr” 或  $CH_2CH_2CH_3$  表示, 丁基可以由 “Bu” 或  $CH_2CH_2CH_2CH_3$  表示, 等。例如, “ $C_{1-6}$  烷基” (或 “ $C_1-C_6$  烷基”) 意指具有指定数目碳原子的线性或支链烷基, 包括所有异构体。 $C_{1-6}$  烷基包括所有己基烷基和戊基烷基异构体, 以及正、异、仲和叔丁基, 正和异丙基, 乙基和甲基。“ $C_{1-4}$  烷基” 意指正、异、仲和叔丁基, 正和异丙基, 乙基和甲基。术语 “亚烷基” 指具有指定数目碳原子且具有 2 个末端链连接的支链和直链饱和脂肪族烃基, 包括所有异构体。为了举例说明, 术语 “未取代的 A- $C_4$  亚烷基 -B” 表示  $A-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-B$ 。术语 “烷氧基” 表示通过氧桥连接的所示数目碳原子的线性或支链烷基。

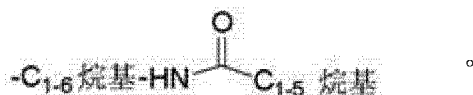
[0018] 术语 “卤素” (或 “卤代”) 指氟、氯、溴和碘 (可替代地称为氟代 (F)、氯代 (Cl)、溴代 (Br) 和碘代 (I))。

[0019] 当任何变量在任何取代基或描绘且描述本发明的化合物的任何式中出现超过一次时, 它在每次出现时的定义不依赖于它在每一次其他出现时的定义。此外, 取代基和 / 或变量的组合仅在此类组合导致稳定化合物时是容许的。

[0020] 术语 “取代的” (例如在 “任选由一个或多个取代基……取代的芳基” 中) 包括通过命名取代基至此类单个和多个取代 (包括在相同位点上的多个取代) 是化学上允许的程度单和多取代。

[0021] 术语 “氧基” 意指氧 (O) 原子。术语 “硫 (thio)” 意指硫 (S) 原子。术语 “氧代” 意指 “=O”。术语 “羰基” 意指 “C=O”。

[0022] 在本公开内容自始至终使用的标准命名法下, 首先描述指定侧链的末端部分, 随后为朝着连接点的邻近官能度。例如,  $C_{1-5}$  烷基羰基氨基  $C_{1-6}$  烷基取代基等价于




[0023] 在选择本发明的化合物中, 本领域技术人员应认识到各种取代基即  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  等遵照化学结构连接性的众所周知原则进行选择。

[0024] 从取代基划到环系统内的线指示所示键可以与可取代的环原子中的任何连接。如果环系统是多环的, 那么它意指键可以与仅在近端环上合适的碳原子中的任何连接。

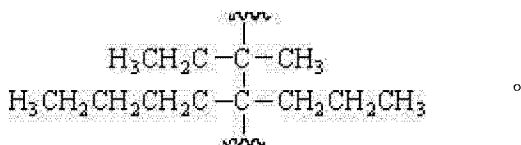
[0025] 应当理解在本发明的化合物上的取代基和取代模式可以由本领域普通技术人员进行选择, 以提供在化学上稳定且可以通过本领域已知的技术以及下文所示的方法从容易获得的原料容易地合成的化合物。如果取代基自身由超过一个基团取代, 那么应当理解

这些多个基团可以在相同碳或不同碳上,只要稳定结构产生。短语“任选由一个或多个取代基取代的”应视为等价于短语“任选由至少一个取代基取代的”,并且在此类情况下,一个实施方案将具有 0 - 3 个取代基。

[0026] 具有由甲基基团封端的取代基的化合物的结构表示可以使用符号“CH<sub>3</sub>”例如“-CH<sub>3</sub>”或使用代表甲基基团存在的直线例如“”展示末端甲基基团,即,

“”和“”具有等价含义。

[0027] 对于含有具有重复项的术语的变量定义,例如 (CR<sup>i</sup>R<sup>j</sup>)<sub>r</sub>, 其中 r 是整数 2, R<sup>i</sup> 是限定变量,并且 R<sup>j</sup> 是限定变量, R<sup>i</sup> 的值可以在它在其中出现的每种情况下不同,并且 R<sup>j</sup> 的值可以在它在其中出现的每种情况下不同。例如,如果 R<sup>i</sup> 和 R<sup>j</sup> 独立地选自甲基、乙基、丙基和丁基,那么 (CR<sup>i</sup>R<sup>j</sup>)<sub>2</sub> 可以是



[0028] 光学异构体 - 非对映体 - 几何异构体 - 互变异构体

本文描述的化合物可以含有不对称中心,并且可因此作为对映异构体存在。当根据本发明的化合物具有 2 个或更多个不对称中心时,它们可以另外作为非对映异构体存在。本发明包括作为基本上纯的拆分对映异构体、其外消旋混合物以及非对映异构体的混合物的所有此类可能立体异构体。上式 I 不含在某些位置的确定立体化学显示。本发明包括式 I 的所有立体异构体及其药学可接受的盐和溶剂合物。除非另有特别说明,对一个异构体的提及应用于可能的异构体中的任何。当未指定异构体组成时,所有可能的异构体包含在内。对映异构体的非对映异构体对可以例如通过来自合适溶剂的分级结晶分离,并且因此获得的对映异构体对可通过常规方法分离成个别立体异构体,例如通过使用光学活性的酸或碱作为拆分剂或在手性 HPLC 柱上。进一步地,通式 I 的化合物的任何对映异构体或非对映异构体可以通过立体特异性合成使用已知构型的光学纯的原料或试剂获得。

[0029] 当本文描述的化合物含有烯属双键时,除非另有说明,此类双键意欲包括 E 和 Z 几何异构体。

[0030] 本文描述的某些化合物可以具有氢的不同连接点而存在,称为互变异构体。例如,包括羰基 -CH<sub>2</sub>C(O)- 基团(酮形式)的化合物可以经历互变异构现象,以形成羟基 1-CH=C(OH)- 基团(烯醇形式)。酮和烯醇形式(个别地以及其混合物)包括在本发明的范围内。

[0031] 盐

药学可接受的盐包括金属(无机)盐和有机盐;其列表在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 17 版,第 1418 页(1985)中给出。本领域技术人员众所周知合适的盐形式基于物理和化学稳定性、流动性、吸水性和可溶性进行选择。术语“药学可接受的盐”指由药学可接受的无毒碱或酸制备的盐。当本发明的化合物是酸性的时,它的相应盐可以由无机碱或有机碱方便地制备。衍生自此类无机碱的盐包括铝、铵、钙、铜(高价和低价)、铁、亚铁、锂、镁、锰(高价和低价)、钾、钠、锌等盐。优选的是铵、钙、镁、钾和钠盐。由有机碱制备的盐包括衍生自天然存在和合成来源的伯、仲和叔胺的盐。由其可以形成盐

的药学可接受的有机无毒碱包括例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N' - 二苄基乙二胺、二乙胺、2- 二乙氨基乙醇、2- 二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N- 乙基吗啉、N- 乙基哌啶、葡糖胺、氨基葡糖、组氨酸、海巴明 (hydrabamine)、异丙胺、二环己胺、赖氨酸、甲基葡糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨基丁三醇等。

[0032] 当本发明的化合物是碱性的时, 它的相应盐可以由无机或有机酸方便地制备。此类酸包括例如乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、延胡索酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸等。优选的是柠檬酸、氢溴酸、盐酸、马来酸、磷酸、硫酸和酒石酸。

#### [0033] 溶剂合物

本发明在其范围内包括式 I 的化合物的溶剂合物。如本文使用的, 术语“溶剂合物”指通过溶质 (即式 I 的化合物) 或其药学可接受的盐和不干扰溶质的生物学活性的溶剂形成的可变化学计量学的复合物。溶剂的例子包括但不限于水、乙醇和乙酸。当溶剂是水时, 溶剂合物称为水合物; 水合物包括但不限于半、一、一倍半、二和三水合物。

#### [0034] 药物前体

本发明在其范围内包括本发明的化合物的药物前体的使用。一般而言, 此类药物前体将是本发明的化合物的功能衍生物, 其在体内可容易转换成所需化合物。因此, 在本发明的治疗方法中, 术语“施用”应涵盖用式 I 的化合物或下列化合物治疗所述各种状况: 所述化合物可能不是式 I 的化合物, 但在施用于患者后在体内转换为式 I 的化合物。用于选择和制备合适药物前体衍生物的常规程序例如在“Design of Prodrugs,” 编辑 H. Bundgaard, Elsevier, 1985 中描述。

#### [0035] 效用

本发明的化合物是低氧诱导因子 (HIF) 脯氨酰羟化酶的抑制剂, 并且像这样在其中需要 HIF 调节的疾病和状况例如贫血和缺血的治疗和预防中是有用的。本发明的化合物可以以选择和控制性方式使用, 以诱导低氧诱导因子稳定作用, 且快速和可逆地刺激促红细胞生成素生产和分泌。相应地, 本发明的另一个方面提供了治疗或预防哺乳动物中的疾病或状况的方法, 所述疾病或状况的治疗或预防通过 HIF 脯氨酰羟化酶抑制实现或促进, 所述方法包括施用对于抑制 HIF 脯氨酰羟化酶有效的量的式 I 的化合物。本发明的这个方面进一步包括式 I 的化合物在制备用于治疗或预防由 HIF 脯氨酰羟化酶调节的疾病或状况的药物中的用途。

[0036] 在一个实施方案中是增强哺乳动物中促红细胞生成素的内源生产的方法, 其包括给所述哺乳动物施用对于增强促红细胞生成素的内源生产有效的量的式 I 的化合物。

[0037] 另一个实施方案是治疗哺乳动物中的贫血的方法, 其包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的式 I 的化合物。“贫血”包括但不限于慢性肾疾病贫血, 化学疗法诱导的贫血 (例如起因于用于感染病的抗病毒药物方案的贫血, 所述感染病例如 HIV 和丙型肝炎病毒), 慢性病的贫血, 与癌症状况相关的贫血, 起因于用于癌症的放射治疗的贫血, 慢性免疫病症例如类风湿性关节炎、炎性肠病和狼疮的贫血, 和由于月经或衰老或具有铁加工缺陷的其他个体中的贫血, 所述其他个体例如铁充足但不能适当地利用铁的那些。

[0038] 另一个实施方案是治疗哺乳动物中的缺血性疾病的方法, 其包括给所述哺乳动物

施用治疗有效量的式 I 的化合物。

#### [0039] 联合治疗

式 I 的化合物可以与在式 I 的化合物对于其有用的疾病或状况的治疗 / 预防 / 抑制或改善中使用的其他药物组合使用。此类其他药物可以通过通常用于其的途径和量, 与式 I 的化合物同时或顺次施用。当式 I 的化合物与一种或多种其他药物同时使用时, 含有此类其他药物加上式 I 的化合物的药物组合是优选的。相应地, 本发明的药物组合包括还含有一种或多种其他活性成分加上式 I 的化合物的那些。

#### [0040] 施用途径 / 剂量

本发明的化合物可以根据本发明通过实现活性成分化合物与温血动物体内的作用部位的接触的任何方法施用, 用于治疗或预防痛苦、疾病和病。例如, 施用可以是经口、局部包括经皮、眼、颊、鼻内、吸入、阴道内、直肠、脑池内和肠胃外的。如本文使用的, 术语“肠胃外的”指施用方式, 这包括皮下、静脉内、肌内、关节内注射或输注、胸骨内和腹膜内。为了本公开内容的目的, 温血动物是拥有稳态机制的动物界的成员且包括哺乳动物和鸟类。

[0041] 化合物可以作为个别治疗剂或与治疗剂的组合通过可用于与药物结合使用的任何常规方法施用。它们可以单独施用, 但一般与基于选择的施用途径和标准药学实践选择的药学载体一起施用。

[0042] 施用的剂量将取决于接受者的年龄、健康和重量, 疾病程度, 同时治疗的种类 (如果存在的话), 治疗频率和需要的作用的性质。通常地, 活性成分化合物的每日剂量将是约 0.1-2000 毫克 / 天。一般地, 在一个或多个应用中 10 - 500 毫克 / 天对于获得所需结果是有效的。这些剂量是用于治疗 and 预防上述痛苦、疾病和病例如贫血的有效量。

#### [0043] 药物组合物

本发明的另一个方面提供了包含式 I 的化合物和药学可接受的载体的药物组合物。如药物组合物中的术语“组合物”意欲涵盖包含一种或多种活性成分和构成载体的一种或多种惰性成分 (药学可接受的赋形剂) 的产品, 以及直接或间接起因于任何 2 种或更多种成分的组合、复合或聚集, 一种或多种成分的解离, 或一种或多种成分的其他类型反应或相互作用的任何产品。相应地, 本发明的药物组合物涵盖通过使式 I 的化合物、一种或多种另外活性成分和药学可接受的赋形剂混合制备的任何组合物。

[0044] 本发明的药物组合物包含作为活性成分的由式 I 表示的化合物 (或其药学可接受的盐或溶剂合物)、药学可接受的载体和任选地其他治疗成分或佐剂。组合物包括适合于经口、直肠、局部和肠胃外 (包括皮下、肌内和静脉内) 施用的组合物, 尽管在任何给定情况下最合适的途径将取决于特定宿主、以及活性成分待施用于其的状况的性质和严重性。药物组合物可以以单位剂型方便地呈现, 并且通过药学领域众所周知的任何方法制备。

[0045] 活性成分可以以固体剂型或以液体剂型经口施用, 所述固体剂型例如胶囊、片剂、糖锭、糖衣丸、颗粒和粉末, 所述液体剂型例如酞剂、糖浆剂、乳剂、分散体和悬液。活性成分还可以以无菌液体剂型例如分散体、悬液或溶液肠胃外施用。其他剂型也可以用于施用活性成分, 作为用于局部施用的软膏、乳膏、滴剂、经皮贴剂或粉末, 作为用于眼施用的眼用溶液或悬液制剂, 即滴眼剂, 作为用于吸入或鼻内施用的气溶胶喷雾剂或粉末组合物, 或作为用于直肠或阴道施用的乳膏、软膏、喷雾剂或栓剂。

[0046] 明胶胶囊含有活性成分和粉末载体例如乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬



脂酸等。相似稀释剂可以用于制备压缩片剂。片剂和胶囊可以制备为持续释放产品,以提供药物经过数小时时间段的持续释放。压缩片剂可以是包有糖衣或薄膜衣的,以掩蔽任何不愉快的味道且保护片剂免于大气,或包有肠包衣的用于在胃肠道中选择性崩解。

[0047] 用于经口施用的液体剂型可以含有着色剂和矫味剂,以增加患者接受性。

[0048] 一般而言,水、合适的油、盐水、水性右旋糖(葡萄糖)和相关糖溶液和二醇例如丙二醇或聚乙二醇是用于肠胃外溶液的合适载体。用于肠胃外施用的溶液优选含有活性成分的水溶性盐,合适的稳定剂和需要时缓冲物质。单独或组合的抗氧化剂例如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸是合适的稳定剂。还使用的是柠檬酸及其盐和 EDTA 钠。此外,肠胃外溶液可以含有防腐剂,例如苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲或丙酯和氯代丁醇。

[0049] 合适的药学载体在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol, 本领域的标准参考教科书中描述。

[0050] 对于通过吸入的施用,本发明的化合物可以以气溶胶喷雾呈现的形式从增压包或雾化器中方便地递送。化合物还可以作为可以配制的粉末递送,并且粉末组合物可以借助于吹入粉末吸入装置吸入。用于吸入的优选递送系统是定量吸入(MDI)气溶胶,这可以在合适推进剂例如氟碳化合物或烃中配制为式 I 的化合物的悬液或溶液。

[0051] 对于眼施用,眼制剂可以在合适眼载体中用式 I 的化合物的合适重量百分比溶液或悬液配制,从而使得化合物维持与眼表面接触足够时间段,以允许化合物穿透眼的角膜和内部区域。

[0052] 用于施用本发明的化合物的有用药学剂型包括但不限于硬和软明胶胶囊、片剂、肠胃外注射剂和经口悬液。

[0053] 大量单位胶囊通过各用 100 毫克粉末活性成分、150 毫克乳糖、50 毫克纤维素和 6 毫克硬脂酸镁填充标准 2 片硬明胶胶囊进行制备。

[0054] 制备在可消化油例如大豆油、棉籽油或橄榄油中的活性成分的混合物,且借助于正位移泵注入明胶内,以形成含有 100 毫克活性成分的软明胶胶囊。该胶囊进行洗涤且干燥。

[0055] 通过常规程序制备大量片剂,从而使得剂量单位是 100 毫克活性成分、0.2 毫克二氧化硅胶体、5 毫克硬脂酸镁、275 毫克微晶纤维素、11 毫克淀粉和 98.8 毫克乳糖。可以应用合适包衣以增加适口性或延迟吸收。

[0056] 通过在按体积计 10% 的丙二醇中搅拌按重量计 1.5% 的活性成分,制备适合于通过注射施用的肠胃外组合物。该溶液用注射用水达到体积且灭菌。

[0057] 制备用于经口施用的水悬液,从而使得每 5 毫升含有 100 毫克精细分开的活性成分、100 毫克羧甲基纤维素钠、5 毫克苯甲酸钠、1.0 克山梨糖醇溶液、U. S. P. 和 0.025 毫升香草醛。

[0058] 当本发明的化合物分步或与另一种治疗剂结合施用时,一般可以使用相同剂型。当药物以物理组合施用时,剂型和施用途径应取决于组合药物的相容性加以选择。因此,术语共施用应理解为包括 2 种试剂的同时或顺次施用,或可替代地作为 2 种活性组分的固定剂量组合。

[0059] 本发明的化合物可以作为单独的活性成分或与第二种活性成分组合施用,包括已知对于改善患者中的促红细胞生成素水平有用的其他活性成分。

[0060] 本发明化合物的制备说明中所用的缩写：

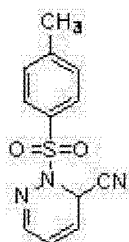
AcOH	乙酸
aq	水性的（水溶液）
盐水	饱和氯化钠水溶液
CDI	1,1'-羰基二咪唑
CO	一氧化碳
DCM	二氯甲烷
Dppf	1,1'-双(二苯基膦)二茂铁
DBU	1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯
DIEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
DMAP	4- <i>N,N</i> -二甲基氨基吡啶
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
EtOAc	乙酸乙酯
Et (et)	乙基
EtOH	乙醇
Et <sub>2</sub> O 或乙醚	乙醚
g	克
h 或 hr	小时
HATU	<i>O</i> -(7-氮杂苯并三唑-1-基)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脒六氟磷酸酯
HCl	盐酸
HPLC	高效液相色谱
<i>i</i> -PrOH 或 IPA	异丙醇
<i>m</i> -CPBA	3-氯过苯甲酸
mg	毫克
mL	毫升
mmol	毫摩
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
min	分钟
ms 或 MS	质谱
MTBE	甲基叔丁基醚
μg	微克
μL	微升
NaHSO <sub>4</sub>	硫酸氢钠
NaOEt	乙醇钠
NaOMe	甲醇钠
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	硫酸钠
NH <sub>4</sub> Cl	氯化铵
NH <sub>4</sub> OH	氢氧化铵
PPTS	对甲苯磺酸吡啶
R <sub>t</sub>	保留时间
rt	室温
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃

[0061] 一般方法

对水分或空气敏感的反应在氮气下利用无水溶剂和试剂进行。通过以 E. Merck 预

涂 TLC 板、硅胶 60F-254、层厚度 0.25 mm 进行的分析型薄层色谱 (TLC) 或液相色谱 - 质谱 (LC-MS), 测定反应进程。分析型 HPLC/MS - 标准方法: 质量分析在具有正离子检测模式的电喷雾电离的 Waters Micromass<sup>®</sup> ZQ<sup>™</sup> 上进行。高效液相色谱 (HPLC) 如下进行: 在 Agilent 1100 系列 HPLC、Waters C18 XTerra 3.5  $\mu$ m 3.0  $\times$  50 mm 柱上, 梯度 10:90-100 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.05 % TFA, 经过 3.75 min, 然后保持在 100 CH<sub>3</sub>CN + v 0.05 % TFA 下 1.75 min; 流速 1.0 mL/min, UV 波长 254 nm (除非另外说明, 所有 HPLC/MS 数据以本方法生成)。分析型 HPLC/MS - 基本方法: 质量分析在具有正离子检测模式的电喷雾电离的 Waters Micromass<sup>®</sup> ZQ<sup>™</sup> 上进行。高效液相色谱 (HPLC) 如下进行: 在 Agilent 1100 系列 HPLC、在 Waters C18 XBridge 3.5  $\mu$ m 3.0  $\times$  50 mm 柱上, 梯度 10:90-98:2 v/v CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O + v 0.025 % NH<sub>4</sub>OH, 经过 3.25 min, 然后保持在 98:2 CH<sub>3</sub>CN + v 0.025 % NH<sub>4</sub>OH 下 2.25 min; 流速 1.0 mL/min, UV 波长 254 nm。溶液的浓缩在减压下于旋转蒸发器上进行。快速色谱在预填柱体 (pre-packed cartridge) 中的硅胶 (32-63  $\mu$ m 粒度, KP-Sil 60 Å 填料类型) 上利用 Biotage Horizon 或 SP1 快速色谱设备 (Dyax Corp.) 进行, 或在预填柱体中的硅胶 (32-63  $\mu$ m, 60 Å) 上利用 ISCO CombiFlash<sup>™</sup> Sq 16x 或 CombiFlash<sup>®</sup> Companion<sup>™</sup> 设备进行。微波反应在 Biotage Initiator<sup>™</sup> 2.0 或 CEM Discover<sup>™</sup> 系统上进行。

[0062] 中间体 1



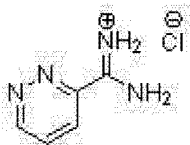
2-[(4-甲基苯基)磺酰基]-2,3-二氢咪嗪-3-甲腈。在氮气气氛下在 0°C 下将咪嗪 (1.807 mL, 24.98 mmol)、氯化铝 (0.010 g, 0.075 mmol) 和氰化三甲基甲硅烷 (6.03 mL, 45.0 mmol) 的 DCM (30 mL) 溶液搅拌 20 min。将对甲苯磺酰氯 (8.19 g, 43.0 mmol) 的 DCM (60 mL) 溶液在 1 h 期间滴加。将反应加温至室温, 搅拌另外 65 h 并浓缩。用 EtOH (50 mL) 处理残渣, 并过滤所产生的固体, 以获得标题化合物。HPLC/MS: 262.1 (M+1); R<sub>t</sub> = 2.51 min。

[0063] 中间体 2



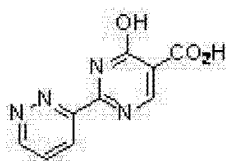
咪嗪-3-甲腈。向中间体 1 产物 (4.98 g, 19.06 mmol) 的 THF (50 mL) 溶液中加入 DBU (3.59 mL, 23.82 mmol)。在氮气气氛下在室温下搅拌反应 1 h。加入饱和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液 (50 mL), 并将反应倒入水 (50 mL) 中。将水介质用 EtOAc 萃取, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并浓缩。通过快速色谱在以 0-50% EtOAc/己烷梯度洗脱的硅胶上纯化残渣, 以获得标题化合物。HPLC/MS: 106.2 (M+1); R<sub>t</sub> = 0.38 min。

[0064] 中间体 3



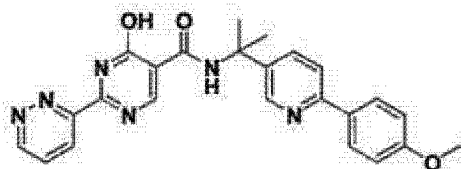
氨基(哒嗪-3-基)甲亚胺盐酸盐(Amino(pyridazin-3-yl)methaniminium chloride)。向中间体 2 产物 (1.7 g, 16.18 mmol) 的 MeOH (10 mL) 溶液中加入甲醇钠 (0.370 mL, 1.618 mmol, 25 wt%, 在 MeOH 中)。在室温下搅拌反应过夜,同时加入氯化铵 (0.952 g, 17.79 mmol)。将反应回流 2.5 h,冷却至室温,用 MeOH 稀释并浓缩,以获得标题化合物。HPLC/MS :123.1 (M+1) ; $R_t = 0.34$  min。

[0065] 中间体 4



4-羟基-2-哒嗪-3-基吡啶-5-羧酸。向中间体 3 产物 (0.500 g, 3.15 mmol) 的 EtOH (8.0 mL) 溶液中加入二乙基乙氧基亚甲基丙二酸酯 (0.637 mL, 3.15 mmol) 和甲醇钠 (0.793 mL, 3.47 mmol, 25 wt%, 在 MeOH 中)。在 120°C 下在微波中加热反应 10 min。加入另外的二乙基乙氧基亚甲基丙二酸酯 (0.319 mL, 1.576 mmol),并在 120°C 下在微波中加热反应 10 min。加入氢氧化钾 (4.73 mL, 9.46 mmol, 2.0 M),并在 120°C 下在微波中加热反应 10 min。用水稀释反应,并浓缩反应。将残渣溶于最少量的水,并用 EtOAc 萃取。用浓 HCl 水溶液调节水层至 pH = 2,并将其搅拌 15 min。将固体过滤并用水和己烷洗涤,以获得标题化合物。HPLC/MS :219.0 (M+1) ; $R_t = 0.28$  min (基本方法)。

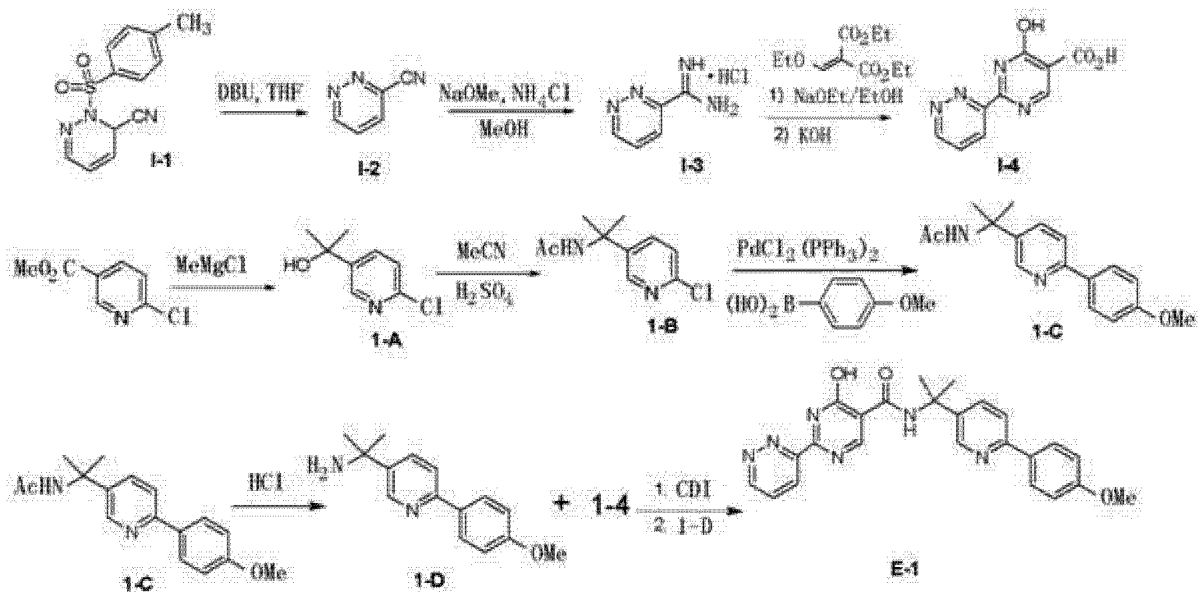
[0066] 实施例 1



E-1

4-羟基-N-((1-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基]-1-甲基乙基)-2-哒嗪-3-基吡啶-5-甲酰胺 (E-1)

方案 1



#### 步骤 A : 2-(6-氯吡啶-3-基)丙-2-醇 (1-A)

将6-氯烟酸乙酯 (37.2 g, 200 mmol) (或等摩尔量的6-氯烟酸甲酯) 溶于 THF (315 mL) 中, 并置于冰水浴 (反应器 A) 中。将单独的反应容器置于冰水浴中, 然后装入 THF (335 mL) 和甲基氯化镁 (200 mL, 601 mmol) (反应器 B)。将反应器 A 的内容物在搅拌下缓慢加入反应器 B, 同时保持 15-25°C 的核心温度范围。加入后, 用冰水浴将反应混合物再冷却至 0°C, 并用 2.5 M HCl 水溶液 (240 mL, 600 mmol) 处理。用 MTBE 分配水介质, 并将水层用 MTBE 再萃取。将合并的有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在减压下浓缩。用 CH<sub>3</sub>CN 稀释残渣, 并将其浓缩。将该步骤重复一次。在高度真空下干燥产物。HPLC/MS : 172.0 (M+1); R<sub>t</sub> = 1.71 min。

#### [0067] 步骤 B : N-[1-(6-氯吡啶-3-基)-1-甲基乙基]乙酰胺 (1-B)

用冰水浴将步骤 A 的产物 1-A (33.42 g, 195 mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (250 mL) 溶液冷却至 0°C。缓慢加入硫酸 (72.7 mL, 1363 mmol), 并将反应混合物加温至 rt 并搅拌 48-72 h。将反应混合物用冰水浴冷却至 0°C, 用 H<sub>2</sub>O (100 mL) 稀释, 并且然后用 29% NH<sub>4</sub>OH 水溶液 (203 mL) 缓慢地处理。用 MTBE 萃取猝灭的混合物, 并分离有机层。用 MTBE 萃取水层, 并在减压下浓缩合并的有机层, 直到固体出现。将固体用己烷处理, 通过真空过滤收集, 并在高度真空下干燥。HPLC/MS : 213.0 (M+1); R<sub>t</sub> = 1.71 min。

#### [0068] 步骤 C : N-{1-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基]-1-甲基乙基}乙酰胺 (1-C)

将步骤 B 的产物 1-B (37.11 g, 174 mmol)、4-甲氧基苯基硼酸 (47.7 g, 314 mmol) 和双(三苯基膦)氯化钯(II) (6.12 g, 8.72 mmol) 悬浮于 DMA (325 mL) 和 2.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液 (288 mL, 576 mmol) 中。用 N<sub>2</sub> (3×) 排空/吹扫反应容器的气氛, 并在 90°C 下在 3h 期间加热反应混合物。将反应混合物冷却至 rt, 并在 EtOAc 和 H<sub>2</sub>O 之间分配。将有机层分离, 用 H<sub>2</sub>O、饱和 NaCl 水溶液洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并在减压下浓缩。将残渣悬浮于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中, 并将固体通过真空过滤分离, 并在高度真空下干燥。可选的操作: 将反应混合物冷却至 rt, 并用 H<sub>2</sub>O (1.85 L) 稀释。将固体在用己烷冲洗下通过真空过滤收集, 并在高度真空下干燥。HPLC/MS : 285.0 (M+1); R<sub>t</sub> = 1.53 min。

#### [0069] 步骤 D : 2-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基]丙-2-胺苯磺酸酯 (1-D)

将步骤 C 的产物 1-C, (23.34 g, 82 mmol) 悬浮于 H<sub>2</sub>O (66 mL) 和浓 HCl (58.1 mL, 708 mmol) 中。在 100°C 下将反应混合物加热 24 h。将反应混合物冷却至 rt, 并用 MTBE 分配。弃去有机层。将水层用 5.0 M NaOH 水溶液 (160 mL, 800 mmol) 处理, 并用 EtOAc (2 × ~700 mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并在减压下浓缩至原体积的约 1/4。以固体加入苯磺酸 (12.98 g, 82 mmol), 并搅动混合物, 并使其在 rt 静置 10 min。将固体通过真空过滤分离, 用己烷冲洗, 并在高度真空下干燥。HPLC/MS :243.0 (M+1); R<sub>t</sub> = 1.49 min。

**[0070] 步骤 E: 4-羟基-N-[1-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基]-1-甲基乙基]-2-吡嗪-3-基嘧啶-5-甲酰胺 (E-1)**

向中间体 4 (4-羟基-2-吡嗪-3-基嘧啶-5-羧酸) (12.12 g, 55.6 mmol) 的 NMP (97 mL) 溶液加入三乙胺 (23.10 mL, 167 mmol) 和 CDI (9.01 g, 55.6 mmol)。在 70°C 下在 1h 期间加热反应混合物。向热溶液以固体加入步骤 D 的产物 (26.7 g, 66.7 mmol)。使反应混合物在 70°C 下在 1 h 期间老化 (aged), 然后冷却至 rt。将反应混合物用 H<sub>2</sub>O (300 mL) 稀释, 并转移至分液漏斗。用 EtOAc (2 × 175 mL) 洗涤水介质 (弃去有机洗涤液)。将水层分离, 并用 290 mL pH = 7 的缓冲溶液 (Fisher Scientific 部件号 SB108-1) 处理, 然后用 6.0 M HCl 水溶液 (18.52 mL, 111 mmol) 处理。搅动所产生的悬浮液, 并使其静置约 20 min。将固体通过真空过滤分离, 用 H<sub>2</sub>O (3×) 冲洗, 然后用 EtOAc (3×) 冲洗, 并在高度真空下干燥。HPLC/MS :443.1 (M+1); R<sub>t</sub> = 2.04 min。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.49 (dd, J = 5.06, 1.60 Hz, 1 H); 8.64 (d, J = 2.11 Hz, 1 H); 8.52 (dd, J = 8.42, 1.72 Hz, 2 H); 8.02-7.97 (m, 3 H); 7.83-7.76 (m, 2 H); 7.02 (d, J = 8.70 Hz, 2 H); 3.80 (s, 3 H); 1.75 (s, 6 H)。

**[0071] 比较实施例**

对实施例 1 (E-1) 的药代动力学和细胞色素 P450 活性进行评价, 并与 2009 年 3 月 9 日提交的国际 PCT 申请 PCT/US09/036501 所公开的实施例 187 比较。将化合物在 PEG200:水的 1:1 溶液 (按体积计) 中配制, 并以每 kg 体重 0.5 mg 给予。将制剂在 2 只狗 (猎兔犬) 中静脉内给予, 并在下列时间点抽血: 0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、8、24 (小时)。下表所示的血浆浓度是通过蛋白质沉淀、然后通过液相色谱 - 串联质谱分析测定的。

时间 (小时)	实施例 1 (E-1) 平均浓度 ( $\mu\text{M}$ )	实施例 187 PCT/US09/036501 平均浓度 ( $\mu\text{M}$ )
0.08	1.495	6.284
0.25	1.151	4.125
0.50	1.110	2.412
1.00	0.944	2.273
2.00	0.754	2.291
4.00	0.581	2.782
6.00	0.374	3.829
8.00	0.475	3.350
24.00	0.023	0.762
Cl (mL/min/kg)	2.49	0.342
MRT (h)	6.57	13.3
T <sub>1/2</sub> (h)	4.09	7.75

[0072] 本发明的实施例——其中 R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 是甲基, 并且 R<sup>1</sup> 是甲氧基——显示如下出乎意料的益处: 具有相对于 PCT/US09/036501 的类似实施例 (实施例 187) 为 7 倍快的固有清除, 同时平均停留时间 (MRT) 和半衰期 (t<sub>1/2</sub>) 减少。药代动力学特性的改善如呈现更快的清除通过减少将药物从患者将经历不良事件的循环中清除所耗费的时间而有利于化合物的安全性特性。

[0073] 对实施例 1 和 PCT/US09/036501 的实施例 187 的化合物均检测其在细胞色素 P450 酶 CYP3A4 和 CYP2C8 处的活性。利用与 Walasky 等及其中的参考文献所述类似的程序, 测定下列人 IC<sub>50</sub> 值 (Walasky, R. L.; Obach, R. S. *Drug Metab. Dispos.* 2004, 32, 647 - 660.)。

细胞色素 P450 酶	实施例 1 (E-1) 人 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	实施例 187 PCT/US09/036501 人 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
CYP3A4	> 50	0.79
CYP2C8	49.5	1.82

[0074] 如上表所示, 本发明的实施例对于抑制 PHD2 及其与 HIF 肽的相互作用呈现出乎意料的改善的选择性、和抑制 CYP3A4 和 CYP2C8 中的较低活性。因此, 本发明的化合物——其中 R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 是甲基, 并且 R<sup>1</sup> 是甲氧基——出乎意料地显示超越 PCT/US09/036501 实施例 187 的关于在细胞色素 P450 酶 CYP3A4 和 CYP2C8 处的最小化脱靶活性的改善。这些改善可减少药物-药物相互作用 (一种药物的给予可改变另一种药物的作用并造成不良事件的情况) 的可能性。

#### [0075] 生物分析

已发现本发明实施例 1 中的示例化合物抑制 PHD2 和 HIF 肽之间的相互作用, 并且显示

范围为 0.1 纳摩尔到 10 微摩尔的  $IC_{50}$  值。可以用于检测有利活性的测定的非限制性例子公开于下述公开物中: Oehme, F., 等人, Anal. Biochem. 330:74-80 (2004); Hirsilä, M., 等人, J. Bio. Chem. 278(33):30772-30780 (2005); Hyunju, C., 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 330 (2005), 75-280; 和 Hewitson, K. S., 等人, Methods in Enzymology, (Oxygen Biology and Hypoxia); Elsevier Publisher (2007), 第 25-42 页 (ISSN:0076-6879)。

[0076] 本发明化合物的生物学活性可以使用本文下文描述的测定进行评估。

[0077] 向 96 孔板的每个孔中加入 1  $\mu$ L 测试化合物的 DMSO 溶液和含有 0.15  $\mu$ g/ml FLAG 标记的全长 PHD2 的 20  $\mu$ L 测定缓冲液 (50 mM Tris pH 7.4/0.01% Tween-20/0.1 mg/ml 牛血清清蛋白/10  $\mu$ M 硫酸亚铁/1 mM 抗坏血酸钠/20  $\mu$ g/ml 过氧化氢酶), 所述 FLAG 标记的全长 PHD2 在杆状病毒感染的 Sf9 细胞中表达且从杆状病毒感染的 Sf9 细胞中纯化。在室温 30 分钟预温育后, 通过添加 4  $\mu$ L 底物 (2  $\mu$ M 2-氧代戊二酸和 0.5  $\mu$ M HIF-1 $\alpha$  肽生物素基 -DLLEMLAPYIPMDDDFQL 的终浓度) 起始酶促反应。在室温 2 小时后, 将反应终止, 并且通过添加 25  $\mu$ L 猝灭/检测混合物至 1 mM 邻菲咯啉、0.1 mM EDTA、0.5 nM 抗 (His)<sub>6</sub> LANCE 试剂 (Perkin-Elmer Life Sciences)、100 nM AF647 标记的链霉抗生物素蛋白 (Invitrogen) 和 2  $\mu$ g/ml (His)<sub>6</sub>-VHL 复合物 (S. Tan (2001) Protein Expr. Purif. 21, 224-234) 的终浓度显影 (develop) 信号。测定在 665 和 620 nm 时间分辨的荧光信号的比, 并且相对于平行运行的未抑制对照样品计算抑制百分比。

[0078] HIF-PHD1 和 HIF-PHD3 的催化活性的抑制可以类似地测定。

[0079] 发现以  $IC_{50}$  (nM) 表示的实施例 1 公开的本发明化合物的 PHD2 结合活性  $\leq$  10 nM。



## 序列表

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.  
 Matthew J. Clements  
 John S. Debenham  
 Christina Madsen-Duggan  
 Jeffrey J. Hale

<120> 取代的 4- 羟基嘧啶 -5- 甲酰胺

<130> MRL-BRE-00017

<150> 61/221, 838

<151> 2009-06-30

<150> 61/237, 467

<151> 2009-08-27

<160> 1

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PHD2 底物

<400> 1

Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp

1

5

10

15

Phe Gln Leu