

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2008.01.11**

(30) Prioridade(s): **2007.01.12 US 884710 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.12.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.01.07**
060/2015

(73) Titular(es):

GLAXOSMITHKLINE LLC
CORP. SERV. COMP., 2711 CENTERVILLE
ROAD, SUITE 400, WILMINGTON DELAWARE
19808 **US**

(72) Inventor(es):

KEVIN J. DUFFY **US**
ANTONY N. SHAW **US**
WILLIAM HENRY MILLER **US**
ANDREA K. MYERS **US**
MICHAEL N. ZIMMERMAN **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

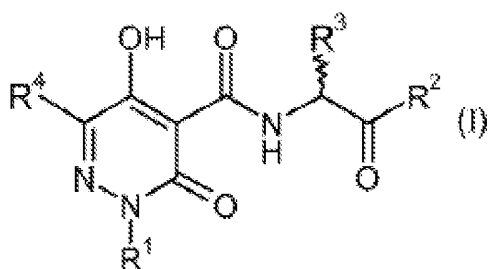
(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE GLICINA N-SUBSTITUÍDA: INIBIDORES DE HIDROXILASES**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO AQUI DESCRITA REFERE-SE A CERTOS DERIVADOS DE GLICINA N-SUBSTITUÍDA COM PIRIDAZINODIONA DE FÓRMULA (I) QUE SÃO ANTAGONISTAS DE HIF PROLIL HIDROXILASES E SÃO ÚTEIS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS QUE BENEFICIAM DA INIBIÇÃO DESTA ENZIMA, SENDO A ANEMIA UM EXEMPLO.

RESUMO**"DERIVADOS DE GLICINA N-SUBSTITUÍDA: INIBIDORES DE
HIDROXILASES"**

A invenção aqui descrita refere-se a certos derivados de glicina N-substituída com piridazinodiona de fórmula (I) que são antagonistas de HIF prolil hidroxilases e são úteis para o tratamento de doenças que beneficiam da inibição desta enzima, sendo a anemia um exemplo.



DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DE GLICINA N-SUBSTITUÍDA: INIBIDORES DE HIDROXILASES"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a um derivado hetero-aromático de glicina N-substituída que é um inibidor de HIF prolil hidroxilases e, assim, tem utilização no tratamento de doenças que beneficiam da inibição desta enzima, sendo um exemplo a anemia.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Ocorre anemia quando há um decréscimo ou anormalidade nas células vermelhas do sangue, o que leva a níveis reduzidos de oxigénio no sangue. A anemia ocorre frequentemente em doentes com cancro, particularmente nos que receberam quimioterapia. A anemia é frequentemente observada na população idosa, doentes com doença renal e numa grande variedade de condições associadas a doença crónica.

Frequentemente, a causa da anemia é a produção de

eritropoietina (Epo) reduzida, resultando na prevenção da eritropoiese (maturação das células vermelhas do sangue). A produção de Epo pode ser aumentada por inibição de prolil hidroxilases que regulam o fator indutível por hipoxia (HIF).

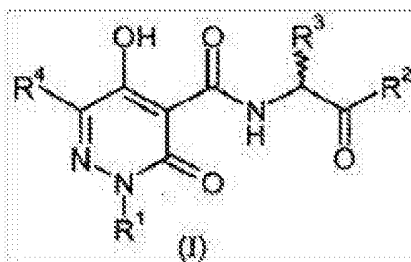
Uma estratégia para aumentar a produção de eritropoietina (Epo) é estabilizar e assim aumentar a actividade de transcrição do HIF. As subunidades alfa de HIF (HIF-1 alfa, HIF-2alfa e HIF-3alfa) são rapidamente degradadas por proteossoma em condições normóxicas por hidroxilação de resíduos de prolina por prolil hidroxilases (EGLN1, 2, 3). A hidroxilação de prolina permite a interacção com a proteína de von Hippel Lindau (VHL), um componente de uma ubiquitina ligase E3. Isto leva à ubiquitinação de HIF-alfa e subsequente degradação. Em condições hipóxicas, a actividade inibidora das prolil hidroxilases é suprimida, as subunidades HIF-alfa são portanto estabilizadas e os genes que respondem a HIF, incluindo Epo, são transcritos. Assim, a inibição da prolil hidroxilases resultada em níveis aumentados de HIF-alfa e portanto em produção de Epo aumentada.

Os compostos desta invenção proporcionam um meio para inibir estas hidroxilases, aumentando a produção de Epo e tratando assim a anemia. Isquémia, acidente vascular e citoprotecção também podem beneficiar da administração

destes compostos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Descreve-se composos de fórmula (I):



em que:

R¹ é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio, -NR⁵R⁶, C₁-C₁₀alquilo, C₂-C₁₀alcenilo, C₂-C₁₀alcinilo, C₃-C₈cicloalquilo, C₁-C₁₀alquil-C₃-C₈cicloalquilo, C₅-C₈cicloalcenilo, C₁-C₁₀alquil-C₅-C₈cicloalcenilo, C₃-C₈ heterocicloalquilo, C₁-C₁₀alquil-C₃-C₈ heterocicloalquilo, arilo, C₁-C₁₀alquil-arilo, heteroarilo e C₁-C₁₀alquil-heteroarilo;

R⁴ é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio, COOR⁹, CONR⁷R⁸, -NR⁵R⁶, C₁-C₁₀alquilo, C₂-C₁₀alcenilo, C₂-C₁₀alcinilo, C₃-C₈cicloalquilo, C₁-C₁₀alquil-C₃-C₈cicloalquilo, C₅-C₈cicloalcenilo, C₁-C₁₀alquil-C₅-C₈ cicloalcenilo, C₃-C₈ heterocicloalquilo, C₁-C₁₀alquil-C₃-C₈ heterocicloalquilo, arilo, C₁-C₁₀alquil-arilo, heteroarilo e C₁-C₁₀alquil-heteroarilo;

R² é -NR⁷R⁸ ou -OR⁹;

R³ é H ou C₁-C₄alquilo;

R⁵ e R⁶ são cada um independentemente seleccionados do grupo que consiste em hidrogénio, C₁-C₁₀ alquilo, C₃-C₈cicloalquilo, C₁-C₁₀ alquil-C₃-C₈cicloalquilo, C₃-C₈heterocicloalquilo, C₁-C₁₀ alquil-C₃-C₈heterocicloalquilo, arilo, C₁-C₁₀alquil-arilo, heteroarilo, C₁-C₁₀alquil-heteroarilo, -CO(C₁-C₄ alquilo), -CO(C₃-C₆ cicloalquilo), -CO(C₃-C₆ heterocicloalquilo), -CO(arilo), -CO(heteroarilo) e -SO₂(C₁-C₄-alquilo); ou R⁵ e R⁶ tomados em conjunto com o azoto ao qual estão ligados formam um anel saturado com 5 ou 6 ou 7 membros contendo opcionalmente um outro heteroátomo seleccionado do grupo que consiste em oxigénio, azoto e enxofre;

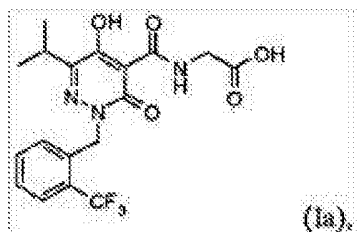
R⁷ e R⁸ são cada um independentemente seleccionados do grupo que consiste em hidrogénio, C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀alcenilo, C₂-C₁₀alcinilo, C₃-C₈ cicloalquilo, C₃-C₈ heterocicloalquilo, arilo e heteroarilo;

R⁹ é H ou um catião, ou C₁-C₁₀alquilo que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente do grupo que consiste em C₃-C₆ cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo e heteroarilo; e

em que qualquer carbono ou heteroátomo de R¹, R², R³, R⁴,

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 está não substituído ou, quando possível, está substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente do grupo que consiste num grupo C_1 - C_6 alquilo, arilo, heteroarilo, halogéneo, $-OR^{10}$, $-NR^5R^6$, ciano, nitro, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-SR^{10}$, $-S(O)R^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-NR^5R^6$, $-CONR^5R^6$, $-N(R^5)C(O)R^{10}$, $-N(R^5)C(O)OR^{10}$, $-OC(O)NR^5R^6$, $-N(R^5)C(O)NR^5R^6$, $-SO_2NR^5R^6$, $-N(R^5)SO_2R^{10}$, C_1 - C_{10} alcenilo, C_1 - C_{10} alcinilo, C_3 - C_{60} cicloalquilo, C_3 - C_6 heterocicloalquilo, arilo e heteroarilo; em que R^5 e R^6 são os mesmos que os definidos acima e R^{10} é hidrogénio, C_1 - C_{10} alquilo, C_2 - C_{10} alcenilo, C_2 - C_{10} alcinilo, $-CO(C_1$ - C_4 alquilo), $-CO$ (arilo), $-CO$ (heteroarilo), $-CO(C_3$ - C_6 cicloalquilo), $-CO(C_3$ - C_6 heterocicloalquilo), $-SO_2(C_1$ - C_4 alquilo), C_3 - C_8 cicloalquilo, C_3 - C_8 heterocicloalquilo, C_6 - C_{14} arilo, C_1 - C_{10} alquil-arilo, heteroarilo ou C_1 - C_{10} alquil-heteroarilo; ou um seu sal ou solvato farmacêuticamente aceitável.

Num primeiro aspecto da presente invenção, é proporcionado um composto que é *N*-[(5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2-{[2-(trifluorometil)fenil]metil}-2,3-dihidro-4-piridazinil)carbonil]glicina, de fórmula (Ia)



ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Num segundo aspecto da presente invenção, é proporcionado um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, para utilização em terapêutica de mamíferos, por exemplo, tratamento de anemia.

Um exemplo desta abordagem terapêutica é o de um método para o tratamento de anemia provocada por aumento da produção de eritropoietina (Epo) por inibição de HIF prolin hidroxilases compreendendo a administração de um composto de fórmula (Ia) a um doente dele necessitado, puro ou em mistura íntima com um excipiente farmaceuticamente aceitável, numa quantidade suficiente para aumentar a produção de Epo.

Num terceiro aspecto da presente invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, e um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Num quarto aspecto, é proporcionada a utilização de um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmaceuticamente aceitável na preparação de um medicamento para utilização no tratamento de anemia.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Para evitar dúvidas, salvo indicação em con-

trário, o termo "substituído" significa substituído por um ou mais grupos definidos. No caso em que os grupos podem ser seleccionados de entre uma série de grupos alternativos, os grupos seleccionados podem ser iguais ou diferentes.

O termo "independentemente" significa que quando mais do que um substituinte é seleccionado de vários substituintes possíveis, esses substituintes podem ser iguais ou diferentes.

Uma "quantidade eficaz" significa a quantidade de um fármaco ou agente farmacêutico que vai eliciar a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou humano que está a ser procurada, por exemplo, por um investigador ou médico. Além disso, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa qualquer quantidade que, quando comparada com um correspondente indivíduo que não recebeu essa quantidade, resulta num tratamento melhorado, cura, prevenção ou melhoramento de uma doença, patologia ou efeito secundário, ou num ecrécimo da velocidade de progressão de uma doença ou patologia. O termo também inclui no seu âmbito as quantidades eficazes para melhorar a função fisiológica normal.

Tal como aqui utilizado, o termo "alquilo" refere-se a um radical de hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada tendo o número especificado de átomos de

carbono, assim, por exemplo, tal como aqui utilizados, os termos "C₁-C₄ alquilo" e "C₁-C₁₀ alquilo" referem-se a um grupo alquilo que tem pelo menos 1 e até 4 ou 10 átomos de carbono, respectivamente. Exemplos desses grupos alquilo de cadeia ramificada ou linear incluem, mas não estão limitados a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo e n-decilo, e os análogos ramificados destes últimos 5 alcanos normais.

Quando o termo "alcenilo" (ou "alcenileno") é utilizado, refere-se a cadeias de hidrocarboneto lineares ou ramificadas contendo o número especificado de átomos de carbono e pelo menos 1 e até 5 ligações duplas carbono-carbono. Exemplos incluem etenilo (ou etenileno) e propenilo (ou propenileno).

Quando o termo "alcinilo" (ou "alcinileno") é utilizado, refere-se a cadeias de hidrocarboneto lineares ou ramificadas contendo o número especificado de átomos de carbono e pelo menos 1 e até 5 ligações triplas carbono-carbono. Exemplos incluem etinilo (ou etinileno) e propinilo (ou propinileno).

Quando "cicloalquilo" é utilizado, refere-se a um anel de hidrocarboneto não aromático, saturado, cíclico contendo um número especificado de átomos de carbono. Assim, por exemplo, o termo "C₃-C₈ cicloalquilo" refere-se a

um anel de hidrocarboneto cíclico não aromático tendo de três a oito átomos de carbono. Exemplos de grupos "C₃-C₈ cicloalquilo" incluem, mas não estão limitados a, ciclo-propilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo e ciclo-octilo.

O termo "C₅-C₈cicloalcenilo" refere-se a um anel carbocíclico não aromático monocíclico tendo o número especificado de átomos de carbono e até 3 ligações duplas carbono-carbono. "Cicloalcenilo" inclui, a título de exemplo, ciclopentenilo e ciclo-hexenilo.

Quando é utilizado "C₃-C₈ heterocicloalquilo", significa um anel heterocíclico não aromático contendo o número especificado de átomos no anel sendo saturado ou tendo um ou mais graus de insaturação e contendo uma ou mais substituições por heteroátomos seleccionados de O, S e/ou N. Esse anel pode estar opcionalmente condensado com um ou mais outros anéis "heterocíclicos" ou anéis cicloalquilo. Exemplos de unidades "heterocíclicas" incluem, mas não estão limitadas a, aziridina, tiirano, oxirano, azetidina, oxetano, tietano, tetra-hidrofurano, pirano, 1,4-dioxano, 1,3-dioxano, piperidina, piperazina, 2,4-piperazinodiona, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, morfolina, tiomorfolina, tetra-hidrotiopirano, tetra-hidrotiofeno e outras semelhantes.

"Arilo" refere-se a grupos monocíclicos e

policarbocíclicos não condensados ou condensados, opcionalmente substituídos tendo 6 a 14 átomos de carbono e tendo pelo menos um anel aromático que está de acordo com a regra de Hückel. Exemplos de grupos arilo são fenilo, bifenilo, naftilo, antracenilo, fenantrenilo e outros semelhantes.

"Heteroarilo" significa um anel monocíclico aromático opcionalmente substituído ou um sistema policarbocíclico de anéis condensados em que pelo menos um anel está de acordo com a regra de Hückel, tem o número especificado de átomos no anel, e esse anel contém pelo menos um heteroátomo seleccionado de N, O e/ou S. Exemplos de grupos "heteroarilo" incluem furanilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxopiridilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo e indazolilo.

O termo "opcionalmente" significa que o ou os eventos descritos subsequentemente podem ou não ocorrer, e inclui tanto os eventos que ocorrem como os eventos que não ocorrem.

O termo "solvato" refere-se a um complexo de estequiometria variável formado por um soluto e solvente. Esses solventes para efeitos da invenção não podem

interferir com a actividade biológica do soluto. Exemplos de solventes adequados incluem, mas não estão limitados a, água, metanol, etanol e ácido acético. Preferencialmente o solvente utilizado é um solvente farmacêuticamente aceitável. Exemplos de solventes farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, sem limitação, água, etanol e ácido acético. Mais preferencialmente o solvente utilizado é água.

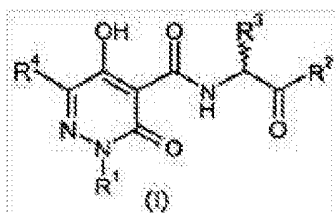
Aqui, o termo "sais farmacêuticamente aceitáveis" refere-se a sais que retêm a actividade biológica desejada do composto em causa e apresentam efeitos toxicológicos indesejados mínimos. Estes sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser preparados *in situ* durante o isolamento e a purificação final do composto, ou por separadamente fazer reagir o composto purificado na sua forma de ácido livre ou de base livre com uma base ou ácido apropriado, respectivamente.

Determinados compostos de acordo com a Fórmula (I) podem conter um grupo funcional ácido, um suficientemente ácido para formar sais. Os sais representativos incluem os sais de metais farmacêuticamente aceitáveis, como sais de sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, alumínio e zinco; carbonatos e bicarbonatos de um catião de um metal farmacêuticamente aceitável, como sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, alumínio e zinco; aminas orgânicas primárias, secundárias e terciárias farmacêuticamente

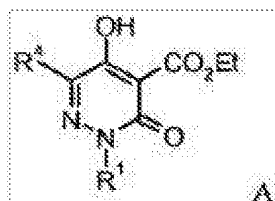
aceitáveis, incluindo aminas alifáticas, aminas aromáticas, diaminas alifáticas e hidroxilalquilaminas como metilamina, etilamina, 2-hidroxietilamina, dietilamina, trietilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina e ciclohexilamina.

Certos compostos de acordo com a Fórmula (I) podem conter um grupo funcional básico e são portanto capazes de formar sais de adição de ácidos farmacêuticamente aceitáveis por tratamento com um ácido adequado. Os ácidos adequados incluem ácidos inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis e ácidos orgânicos farmacêuticamente aceitáveis. Sais de adição de ácido farmacêuticamente aceitáveis representativos incluem cloridrato, bromidrato, nitrato, metilnitrato, sulfato, bissulfato, sulfamato, fosfato, acetato, hidroxiacetato, fenilacetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, maleato, hidroximaleato, acrilato, fumarato, malato, tartarato, citrato, salicilato, *p*-aminossalicilato, glicolato, lactato, heptanoato, ftalato, oxalato, succinato, benzoato, *o*-acetoxibenzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, mandelato, tanato, formato, estearato, ascorbato, palmitato, oleato, piruvato, pamoato, malonato, laurato, glutarato, glutamato, estolato, metanossulfonato (mesilato), etanossulfonato (esilato), 2-hidroxietanossulfonato, benzenossulfonato (besilato), *p*-aminobenzenossulfonato, *p*-toluenossulfonato (tosilato) e naftaleno-2-sulfonato.

Também se descreve processos para a preparação do composto de fórmula (I). Para ilustrar, um processo para a preparação de um composto de fórmula (I)

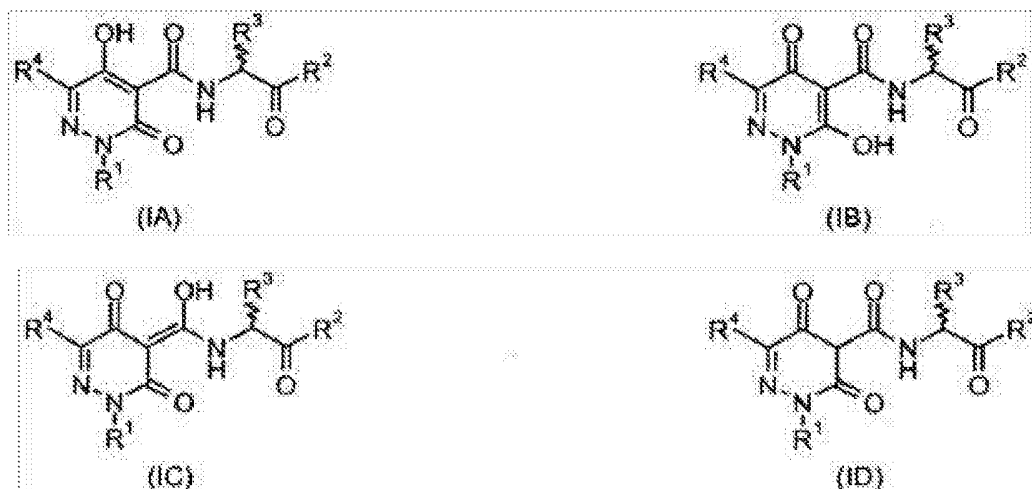


em que R¹, R², R³ e R⁴ são os mesmos que os definidos acima para a fórmula (I), compreendendo o processo o tratamento de um composto de fórmula A:



em que R¹ e R⁴ são os mesmos que para os grupos da fórmula (I) com um sal de sódio de um α -aminoácido num solvente apropriado, como 2-metoxietanol, ou em condições térmicas convencionais ou por irradiação com microondas, para formar um composto de fórmula (I) em que R² é -OH;

Será entendido pelos peritos na técnica que os compostos de fórmula (I) podem existir em uma ou mais formas tautoméricas, como:



Todas as formas tautoméricas dos compostos aqui descritos, incluindo as suas misturas, destinam-se a ser englobados no âmbito da invenção. Geralmente, aos compostos exemplificados aqui foram atribuídos nomes com base na estrutura do tautómero de fórmula (IA). Deve entender-se que qualquer referência a compostos designados desta invenção pretende abranger todos os tautómeros dos compostos designados e quaisquer misturas de tautómeros dos compostos designados.

Os compostos de fórmula (I) podem ser preparados em forma cristalina ou não cristalina e, se cristalina, pode opcionalmente estar solvatada, *e.g.* como o hidrato. Esta invenção inclui no seu âmbito solvatos estequiométricos (*e.g.* hidratos) bem como compostos contendo quantidades variáveis de solvente (*e.g.* água).

Alguns dos compostos aqui descritos podem conter um ou mais átomos quirais, ou podem de outro modo ser

capazes de existir como dois enantiómeros. Os compostos descritos incluem misturas de enantiómeros bem como enantiómeros purificados ou misturas enantiomericamente enriquecidas. Também estão incluídos no âmbito da invenção os isómeros individuais dos compostos representados pela fórmula (I), ou reivindicados adiante, bem como quaisquer misturas suas completamente ou parcialmente equilibradas. Também são descritos os isómeros individuais dos compostos de fórmula (I) como misturas com os seus isómeros em que um ou mais centros quirais estão invertidos. Além disso, entende-se que quaisquer tautómeros e misturas de tautómeros dos compostos reivindicados estão incluídos dentro do âmbito do composto de fórmula (Ia) tal como aqui descrito acima.

Quando existem diferentes formas isoméricas podem ser separadas ou resolvidas uma da outra por métodos convencionais, ou qualquer dado isómero pode ser obtido por métodos sintéticos convencionais ou por sínteses estereoespecíficas ou assimétricas.

Embora seja possível, para utilização em terapia, que um composto de fórmula (Ia), bem como um seu sal farmacologicamente aceitável, possa ser administrado como uma preparação pura, *i.e.* sem nenhum veículo adicional, a prática mais usual é a de apresentar o ingrediente activo confeccionado com um veículo ou diluente. Por conseguinte, a invenção proporciona ainda uma composição farmacêutica,

compreendendo um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável e um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Os compostos de fórmula (Ia) e sais são como descrito acima. O ou os veículos, diluentes ou excipientes têm de ser aceitáveis no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não nocivos para quem a recebe. Também é proporcionado um processo para a preparação de uma formulação farmacêutica incluindo a mistura íntima de um composto de fórmula (I), ou os seus sais, solvatos, etc., com um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Será apreciado pelos peritos na técnica que certos derivados protegidos de compostos de fórmula (I), que podem ser feitos antes de uma fase de desprotecção final, podem não ter actividade farmacológica como tal, mas podem, em certos casos, ser administrados oralmente ou parentericamente e subsequentemente metabolizados no organismo para formar compostos de fórmula (I) que são farmacologicamente activos. Esses derivados podem portanto ser descritos como "pró-fármacos". Exemplos de pró-fármacos adequados para os compostos de fórmula (I) estão descritos em *Drugs of Today*, Volume 19, Number 9, 1983, páginas 499-538 e em *Topics in Chemistry*, Chapter 31, páginas 306-3016 e em "Design of Prodrugs" por H. Bundgaard, Elsevier, 1985, Chapter 1. Será ainda apreciado pelos peritos na técnica que certas unidades, conhecidas pelos especialistas na

técnica como "pró-unidades", por exemplo como descrito por H. Bundgaard em "Design of Prodrugs" (cuja descrição é aqui dado como incorporado por citação) podem ser colocadas em funcionalidades adequadas quando essas funcionalidades estão presentes em compostos de fórmula (I). Os pró-fármacos preferidos para compostos de fórmula (I) incluem: ésteres, ésteres de carbonato, hemi-ésteres, ésteres de fosfato, nitro ésteres, ésteres de sulfato, sulfóxidos, amidas, carbamatos, compostos azo, fosfamidas, glicosidos, éteres, acetais e cetais.

As composições farmacêuticas podem ser apresentadas em formas de dose unitária contendo uma quantidade predeterminada de ingrediente activo por dose unitária. Essa unidade pode conter, por exemplo, 0,5 mg a 1 g, preferencialmente 1 mg a 700 mg, mais preferencialmente 5 mg a 100 mg de um composto da fórmula (I), dependendo da patologia a ser tratada, a via de administração e a idade, peso e estado do doente, ou as composições farmacêuticas podem ser apresentadas em formas de dose unitária contendo uma quantidade predeterminada de ingrediente activo por dose unitária. As composições de dosagem unitária preferidas são as que contêm uma dose ou uma sub-dose diária, como aqui descrito acima, ou uma sua fracção apropriada, de um ingrediente activo. Além disso, essas composições farmacêuticas podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica da farmácia.

As composições farmacêuticas podem ser adaptadas para administração por qualquer via apropriada, por exemplo pela via oral (incluindo bucal ou sublingual), rectal, nasal, tópica (incluindo bucal, sublingual ou transdérmica), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intradérmica). Essas composições podem ser preparadas por qualquer método conhecido na técnica da farmácia, por exemplo por associação de um composto de fórmula (I) com o ou os veículos ou excipientes.

As composições farmacêuticas adaptadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas como cápsulas ou comprimidos; pós ou granulados; soluções ou suspensões em líquidos aquosos ou não aquosos; espumas ou cremes comestíveis; ou emulsões líquidas de óleo-em-água ou emulsões líquidas de água-em-óleo.

As cápsulas são feitas por preparação de uma mistura em pó, como descrito acima, e enchendo bainhas de gelatina formadas. Os deslizantes e lubrificantes, como sílica coloidal, talco, estearato de magnésio, estearato de cálcio ou de polietileno glicol sólido podem ser adicionados à mistura em pó antes da operação de enchimento. Um agente desintegrante ou solubilizante como agar-agar, carbonato de cálcio ou carbonato de sódio também pode ser adicionado para melhorar a disponibilidade do medicamento quando a cápsula é ingerida.

Além disso, quando desejado ou necessário, aglutinantes, lubrificantes, agentes desintegrantes e agentes corantes adequados também podem ser incorporados na mistura. Os aglutinantes adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais como glucose ou beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas como acácia, tragacanta ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras e outros semelhantes. Os lubrificantes utilizados nestas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e outros semelhantes. Os desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metilcelulose, agar, bentonite, goma de xantano e outros semelhantes. Os comprimidos são formulados, por exemplo, por preparação de uma mistura de pó, granulação ou fluidização agregativa, adicionando um lubrificante e desintegrante e prensando em comprimidos. Uma mistura em pó é preparada misturando o composto, adequadamente triturado, com um diluente ou base como descrito acima, e opcionalmente com um aglutinante como carboximetilcelulose, um alginato, gelatina ou polivinilpirrolidona, um retardador de solução como parafina, um acelerador da reabsorção como um sal quaternário e/ou um agente de absorção como bentonite, caulino ou fosfato dicálcico. A mistura em pó pode ser granulada por matrizes de formação de comprimidos por meio da adição de ácido esteárico, um sal estearato, talco ou óleo mineral. A

mistura lubrificada é então prensada em comprimidos. Os compostos da presente invenção também podem ser combinados com um veículo inerte fluido e prensados em comprimidos directamente sem passar pelos passos de granulação ou fluidização agregativa. Pode ser proporcionado um revestimento protector transparente ou opaco consistindo num revestimento de selagem de goma-laca, um revestimento de açúcar ou material polimérico e um revestimento de cera de polimento. Podem ser adicionados corantes a estes revestimentos para distinguir diferentes dosagens unitárias.

Fluidos orais como soluções, xaropes e elixires podem ser preparados na forma de unidade de dosagem de modo a que uma dada quantidade contenha uma quantidade predeterminada de um composto de fórmula (I). Os xaropes podem ser preparados por dissolução do composto numa solução aquosa adequadamente aromatizada, enquanto os elixires são preparados através da utilização de um veículo alcoólico não tóxico. As suspensões podem ser formuladas por dispersão do composto num veículo não tóxico. Solubilizantes e emulsionantes como álcoois isoestearílicos etoxilados e éteres de polioxietileno-sorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes como óleo de hortelã-pimenta ou edulcorantes naturais ou sacarina ou outros edulcorantes artificiais, e outros semelhantes também podem ser adicionados.

Onde apropriado, as composições farmacêuticas de

unidades de dosagem para administração oral podem ser microencapsuladas. A formulação também pode ser preparada para prolongar ou sustentar a libertação como, por exemplo, por revestimento ou incorporação de material em partículas em polímeros, ceras ou outros semelhantes.

As composições farmacêuticas adaptadas para administração rectal podem ser apresentadas como supositórios ou como enemas.

As composições farmacêuticas adaptadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, geles, pastas, espumas ou formulações para pulverização.

As formulações farmacêuticas adaptadas para administração parentérica incluem soluções para injeccção estéreis aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a composição isotónica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As composições farmacêuticas podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multi-dose, por exemplo ampolas seladas e frascos, e podem ser armazenadas num estado seco por congelação (liofilizado) requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo água para injeccções, imediatamente antes da utilização. Soluções e suspensões

para injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós estéreis, granulados e comprimidos.

Deve entender-se que para além dos ingredientes particularmente mencionados acima, as composições farmacêuticas podem incluir outros agentes convencionais na técnica tendo em conta o tipo de formulação em questão, por exemplo as adequadas para administração oral podem incluir agentes aromatizantes.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção vai depender de vários factores incluindo, por exemplo, a idade e peso do receptor pretendido, a patologia exacta que requer tratamento e a sua gravidade, a natureza da formulação, e a via de administração, e vai em última análise ficar ao critério do médico assistente que receita a medicação. No entanto, uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (Ia) para o tratamento da anemia vai geralmente estar na gama de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal do receptor por dia e mais usualmente na gama de 1 a 10 mg/kg de peso corporal por dia. Assim, para um mamífero adulto de 70 kg, a quantidade real por dia seria normalmente de 70 a 700 mg e esta quantidade pode ser administrada numa dose única por dia ou mais usualmente em diversas subdoses (como duas, três, quatro, cinco ou seis) por dia de tal modo que a dose diária total é a mesma. Uma quantidade eficaz de um sal ou solvato, etc., pode ser determinada como uma proporção da

quantidade eficaz do composto de fórmula (Ia) *per se*.
Prevê-se que dosagens semelhantes seriam apropriadas para o tratamento das patologias referidas acima.

Definições

t.a. - temperatura ambiente

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

DCM - diclorometano

DMF - dimetilformamida

DMSO - sulfóxido de dimetilo

KHMDS - hexametildissilazida de potássio

LCMS - cromatografia líquida/espectrometria de massa

MTBE - éter t-butil metílico

NMR - ressonância magnética nuclear

ODS - octadecil sililo

PTFE - politetrafluoroetileno

RP-HPLC - cromatografia líquida de alto desempenho de fase inversa

TFA - ácido trifluoroacético

THF - tetra-hidrofurano

Fundamentos químicos:

O composto desta invenção pode ser preparado por uma variedade de métodos, incluindo química corrente. Qualquer variável definida anteriormente vai continuar a ter o significado definido previamente salvo indicação em

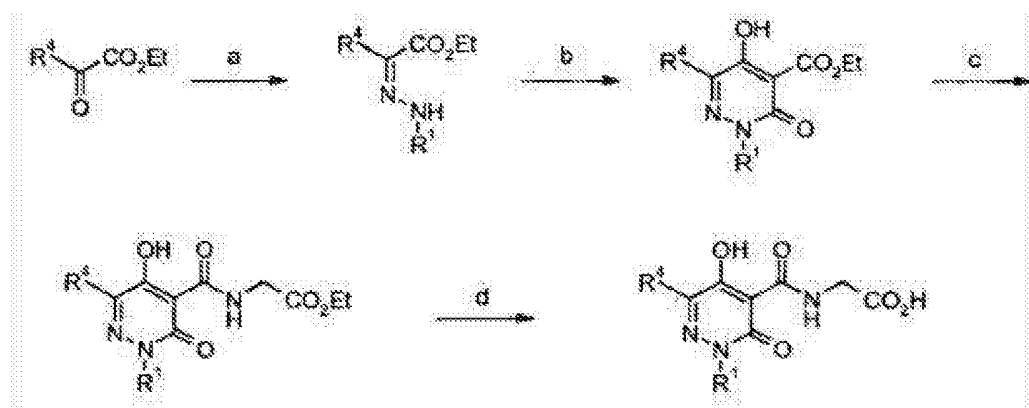
contrário. Métodos sintéticos gerais ilustrativos são apresentados adiante e depois o composto específico da invenção é apresentado nos exemplos.

Os compostos de fórmula geral (I) podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica da síntese orgânica tal como apresentado em parte pelos esquemas de síntese seguintes. Em todos os esquemas descritos adiante, compreende-se bem que os grupos protectores de grupos sensíveis ou reactivos são utilizados quando necessário de acordo com princípios gerais de química. Os grupos protectores são manipulados de acordo com métodos convencionais de síntese orgânica (T. W. Green e P. G. M. Wuts (1991) *Protecting Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons). Estes grupos são removidos numa fase conveniente da síntese do composto utilizando métodos que são facilmente evidentes para os peritos na técnica. A selecção de processos bem como as condições reaccionais e a ordem da sua execução devem ser consistentes com a preparação de compostos de fórmula (I). Os peritos na técnica vão reconhecer se existe um estereocentro em compostos de fórmula (I). Por conseguinte, são descritos ambos os estereoisómeros possíveis e não só compostos racémicos mas também os enantiómeros individuais. Quando um composto é desejado como um enantiómero individual, pode ser obtido por síntese estereoespecífica ou por resolução do produto final ou de qualquer intermediário conveniente.

A resolução do produto final, um intermediário ou um material de partida pode ser realizada por qualquer método adequado conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Stereochemistry of Organic Compounds por E. L. Eliel, S. H. Wilen e L. N. Mander (Wiley-Interscience, 1994).

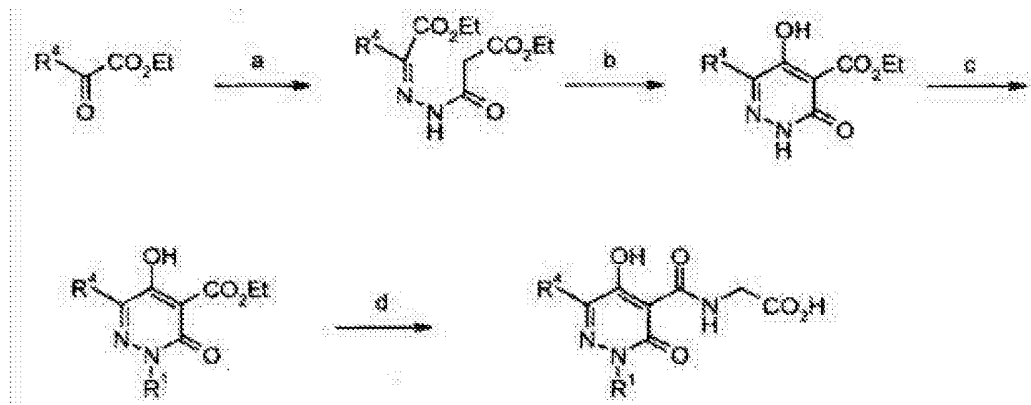
Métodos de preparação ilustrados

Esquema 1



- $R^1NHNH_2 \cdot HCl$, $EtNPr^i_2$ ou $NaOAc$, CH_2Cl_2 ou $R^1NHNH_2 \cdot 2HCl$, DBU, EtOH, microondas, $150^\circ C$;
- $ClOCCH_2CO_2Et$, NaH ou DBU, THF, t.a. ou $60^\circ C$;
- DBU, THF ou dioxano, refluxo ou microondas, $130^\circ C$;
- $NaO_2CCH_2NH_2$, $MeOCH_2CH_2OH$, refluxo.

Esquema 2



- a) $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, $AcOH$, CH_2Cl_2 ou $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, $TsOH$, $PhMe$, refluxo ou $EtO_2CCH_2CONHNH_2$, $AcOH$, $EtOH$ (com ou sem $MgSO_4$), refluxo ou micro-ondas, a $150^\circ C$;
- b) $KHMDS$, $KOBu^t$ ou DBU , $PhMe$, Bu^tOH ou dioxano, refluxo ou microondas, $150^\circ C$ ou $KOBu^t$, Bu^tOH , microondas, $150^\circ C$;
- c) NaH , R^1Br , DMF , $0^\circ C$ a t.a.;
- d) $NaO_2CCH_2NH_2$, $MeOCH_2CH_2OH$ ou $EtOH$, refluxo ou microondas, $150^\circ C$.

Esquema 3



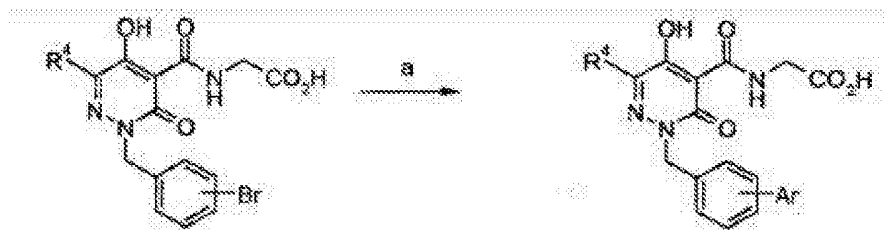
- a) R^4MgBr ou R^4Li , THF ou Et_2O , $-78^\circ C$ a $0^\circ C$.

Esquema 4



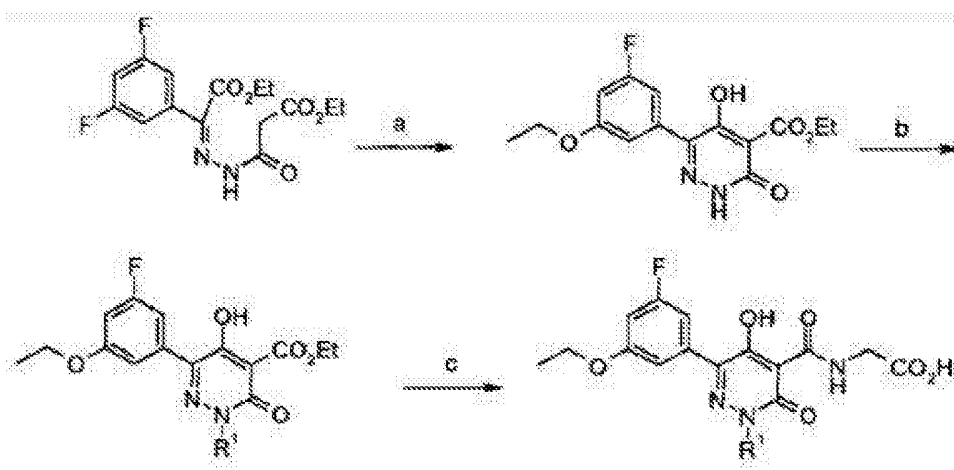
- a) $48\% HBr$ aq, $AcOH$, refluxo

Esquema 5



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

Esquema 6



- a) KHMDS, dioxano, refluxo;
 b) NaH, R^1Br , DMF, 0°C a temperatura ambiente;
 c) $\text{NaO}_2\text{CCH}_2\text{NH}_2$, $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, refluxo ou microondas, 150°C

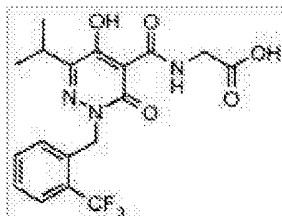
Parte experimental

Intermediário 1. 5-hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2,3-di-hidro-4-piridazinocarboxilato de etilo.

A 3 tubos de microondas separados adicionou-se 3-metil-2-oxobutirato de etilo (5 g, 34,7 mmol) e etil-

malonil hidrazida (6,08 g, 41,6 mmol) em etanol (10 mL) e ácido acético (0,5 mL). As reacções foram irradiadas a 150°C durante 20 minutos. A mistura reaccional em bruto foi evaporada para dar um óleo amarelo. Os 3 óleos em bruto foram ressuspensos separadamente em 1,4-dioxano (12 mL) e adicionou-se DBU (7,84 mL, 52,0 mmol). A solução foi dividida em dois tubos de microondas e as reacções foram irradiadas a 150°C durante 20 minutos. As fracções foram combinadas, diluídas com água (80 mL) e acidificadas lentamente (durante 15 minutos) com HCl 6 N para produzir um precipitado. O precipitado foi recolhido por filtração e seco para dar o produto como um sólido esbranquiçado (11,12 g, 46,7 mmol, 44,9% de rendimento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,64 (s, 1H), 12,31 (s, 1H), 4,28 (q, *J* = 7,16 Hz, 2H), 3,13 (sept, *J* = 6,82 Hz, 1H), 1,27 (t, *J* = 7,07 Hz, 3H), 1,14 (d, *J* = 6,82 Hz, 6H). MS (ES+) *m/e* 227 [M+H]⁺.

Exemplo 1



N-[(5-Hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2-{[2-(trifluorometil-fenil)]metil}-2,3-di-hidro-4-piridazinil)carbonil]glicina

1a) 5-Hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2-{[2-(trifluorometil)fenil]metil}-2,3-di-hidro-4-piridazinocarboxilato de etilo. Adicionou-se hidreto de sódio (53 mg, 1,33 mmol) a uma solução do composto do Intermediário 1 (120 mg, 0,53 mmol) em *N,N*-dimetilformamida (DMF) (2,5 mL) a 0°C. A reacção foi levada até à temperatura ambiente e agitada durante 30 minutos. A temperatura foi então reduzida para 0°C e adicionou-se brometo de 2-(trifluorometil)-benzilo (127 mg, 0,53 mmol). A reacção foi levada até à temperatura ambiente e agitada durante 3 h seguida pela adição de HCl 1 N. A solução foi diluída com EtOAc e H₂O e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi reextraída várias vezes com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio, secas (MgSO₄), filtradas e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO₂, 20-50% de EtOAc/hexanos) para dar o composto em epígrafe (144 mg, 71%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,40 (s, 1H) 7,77 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H) 7,64 (t, *J* = 7,58 Hz, 1H) 7,51 (t, *J* = 7,71 Hz, 1H) 7,10 (d, *J* = 7,58 Hz, 1H) 5,34 (s, 2H) 4,28 (q, *J* = 7,07 Hz, 2H), 3,16 (sept, *J* = 6,78 Hz, 1H) 1,26 (t, *J* = 7,07 Hz, 3H) 1,10 (d, *J* = 6,82 Hz, 6H).

1b) N-[(5-Hidroxi-6-(1-metiletil)-3-oxo-2-{[2-(trifluorometil)fenil]metil}-2,3-di-hidro-4-piridazinil)-carbonil]glicina. Adicionou-se glicina, sal de sódio (69 mg, 0,71 mmol) a uma solução do composto do Exemplo 1a) (137 mg, 0,36 mmol) em 2-metoxietanol (1,5 mL) à

temperatura ambiente. A reacção foi aquecida a refluxo e agitada durante 2 h. A reacção foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionou-se H₂O. A solução foi filtrada e adicionou-se HCl 1 N para precipitar o produto. O produto foi filtrado e lavado com H₂O e hexanos para dar o composto em epígrafe (136 mg, 91%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,19 ppm (t, J = 3,92 Hz, 1H) 7,78 (d, J = 7,83 Hz, 1H) 7,62 (t, J = 7,33 Hz, 1H) 7,51 (t, J = 7,58 Hz, 1H) 7,13 (d, J = 7,83 Hz, 1H) 5,42 (s, 2H) 4,04 (d, J = 5,56 Hz, 2H) 3,19 (septeto, J = 7,07 Hz, 1H) 1,13 (d, J = 6,82 Hz, 6H).

Fundamentos biológicos:

As seguintes referências apresentam informações sobre as enzimas alvo, HIF prolil hidroxilases, e métodos e materiais para a medição da sua inibição por moléculas pequenas.

M. Hirsilä, P. Koivunen, V. Günzler, K. I. Kivirikko e 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

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 e K.-U. Eckardt "Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α 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 (HIF α) stabilizers for enhancing erythropoiesis" PCT Int. Appl. (2004), WO 2004108121 A1

C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener e K.-U. Eckardt "Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-I) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells" FASEB J., 2004, 18, 1462-1464.

Para a expressão de EGLN3 ver:

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

Para a expressão de HIF2 α CODD ver:

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.

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 a expressão de VHL, elongina b e elongina c ver:

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.

Ensaaios Biológicos

Doseamento de EGLN3

Materiais:

His-MBP-EGLN3 (6HisMBPAttB1EGLN3(1-239)) foi expressa em *E. coli* e purificada a partir de uma coluna de afinidade de amilase. Biotina-VBC [6HisSumoCysVHL(2-213), 6HisSumoElonginB (1-118) e 6HisSumoElonginC (1-112)] e His-GB1-HIF2 α -CDD (6HisGB1tevHIF2A(467-572)) foram expressas a partir de *E. coli*.

Método:

Utilizou-se HIF2 α CDD marcada com Cy5, e um complexo de VBC marcado com biotina para determinar a inibição de EGLN3. A hidroxilação por EGLN3 do substrato Cy5CDD resulta no seu reconhecimento pela biotina-VBC. A adição de um quelato de európio/estreptavidina (Eu/SA) resulta na proximidade de Eu a Cy5 no produto, permitindo a detecção por transferência de energia. Uma razão de Cy5 para emissão de Eu (razão LANCE) é a leitura final, uma vez que este parâmetro normalizado tem significativamente menos variância do que a emissão de Cy5 só.

Então 50 nL de inibidores em DMSO (ou controles de DMSO) foram colocados numa placa Corning NBS de 384 poços de baixo volume, seguindo-se a adição de 2,5 μ L de enzima [50 mL de tampão (HEPES 50 mM/KCl 50 mM) + 1 mL de BSA a 10 mg/mL em tampão + 6,25 μ L de solução de FeCl₂ mL em água a 10 mg/mL + 100 μ L de uma solução 200 mM de ácido

ascórbico em água + 15,63 µL de EGLN3] ou controlo [50 mL de tampão + 1 mL de BSA em tampão a 10 mg/mL + 6,25 µL de uma solução de FeCl₂ em água a 10 mg/mL + 100 µL de uma solução 200 mM de ácido ascórbico em água]. Após uma incubação de 3 minutos, adicionou-se 2,5 µL de substrato [50 mL de Tampão + 68,6 µL de biotina-VBC + 70,4 µL de Eu (a 710 µg/mL de solução-mãe) + 91,6 µL de Cy5CDD + 50 µL de uma solução 20 mM de ácido 2-oxoglutarico em água + 0,3 mM de CHAPS] e incubou-se durante 30 minutos. A placa foi carregada num Viewlux da PerkinElmer para imagiologia. Para as experiências de resposta à dose, os dados normalizados foram ajustados por ABASE/XC50 usando a equação $y = a + (b - a) / (1 + (10^x / 10^c)^d)$, em que a é a actividade mínima %, b é a actividade máxima %, c é a pIC₅₀ e d é o declive de Hill.

A IC₅₀ para os compostos exemplificados no doseamento de EGLN3 variou de aproximadamente 1-3200 nanomolar. Esta gama representa os dados acumulados desde a data de apresentação deste pedido inicial. Ensaio posteriores podem mostrar variações dos dados da IC₅₀ devidas a variações nos reagentes, condições e variações do ou dos métodos utilizados em relação aos aqui apresentados acima. Por isso esta gama é para ser considerada como ilustrativa, e não um conjunto de números absolutos.

Determinação da proteína Epo produzida pela linha de células Hep3B utilizando o método de ELISA.

Células Hep3B obtidas de American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas a 2×10^4 células/poço em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% de FBS em placas de 96 poços. As células são incubadas a 37°C/5% de CO₂/90% de humidade (condições correntes de incubação de culturas de células). Após aderência de um dia para o outro, o meio é removido e substituído por DMEM sem soro contendo o composto de teste ou controlo negativo de DMSO. Após 48 horas de incubação, o meio de cultura de células é recolhido e doseado por ELISA para quantificar a proteína Epo.

Determinação da proteína Epo produzida pela linha celular Hep3B utilizando o método AlphaLISA.

Células Hep3B obtidas de American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas a 2×10^4 células/poço em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + 10% de FBS em placas de 96 poços. As células são incubadas a 37°C/5% de CO₂/90% de humidade (condições correntes de incubação de culturas de células). Após aderência de um dia para o outro, o meio é removido e substituído por DMEM com 2% de soro contendo composto de teste ou controlo negativo de DMSO. Após 48 horas de incubação, o meio de cultura de células é recolhido e ou congelado para doseamento posterior ou doseado imediatamente por AlphaLISA para quantificar a proteína Epo.

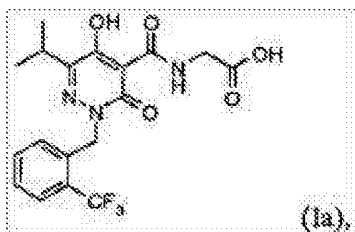
A EC_{50} para compostos de fórmula (I) no ensaio de Hep3B por ELISA e no ensaio por AlphaLISA variou de aproximadamente 0,4-100 micromolar utilizando os reagentes e nas condições aqui descritas acima. Esta gama representa os dados acumulados desde a data da apresentação deste pedido inicial. Ensaio posteriores podem mostrar variações dos dados da EC_{50} devido a variações em reagentes, condições e variações dos métodos utilizados em relação aos aqui apresentados acima. Por isso esta gama é para ser considerada como ilustrativa e não como um conjunto de números absolutos.

Crê-se que estes compostos são úteis em terapêutica como definido acima e não têm efeitos inaceitáveis ou indesejáveis quando utilizado em conformidade com um regime terapêutico permitido.

Lisboa, 16 de março de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Composto que é *N*-[(5-hidroxi-6-(1-metil-etil)-3-oxo-2-{[2-(trifluorometil)fenil]metil}-2,3-dihidro-4-piridazinil)carbonil]glicina, de fórmula (Ia)



ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

2. Composto de fórmula (Ia), ou um seu sal farmacologicamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1 para utilização em terapêutica de mamíferos.

3. Composto de fórmula (Ia), ou um seu sal farmacologicamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento de anemia.

4. Utilização de um composto de fórmula (Ia), ou um seu sal farmacologicamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1, na preparação de um medicamento para utilização no tratamento de anemia.

5. Composto para utilização como reivindicado

na reivindicação 3 ou a utilização como reivindicada na reivindicação 4, em que a anemia está associada a quimioterapia do cancro.

6. Composto para utilização como reivindicado na reivindicação 3 ou a utilização como reivindicada na reivindicação 4, em que a anemia está associada a doença renal.

7. Utilização de um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1, na preparação de um medicamento para utilização no tratamento de isquémia.

8. Composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, para utilização no tratamento de isquémia.

9. Composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (Ia) ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, como reivindicado na reivindicação 1, e um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa, 16 de março de 2015

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2004108121A1 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- *Drugs of Today*, 1983, vol. 19 (9), 499-538 [0034]
- *Topics in Chemistry*, 308-316
- H. BUNDGAARD, *Design of Prodrugs*, Elsevier, 1985
- T. W. GREEN ; P. G. M. WUTS, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 1991
- E. L. ELIEL ; S. H. WILEN ; L. N. MANDER, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley-Interscience, 1994
- M. HIRSILÄ ; P. KOIVUNEN ; V. GÜNZLER ; K. I. KIVIRIKKO ; J. MYLLYHARJU, Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-inducible Factor, *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 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, vol. 44, 75-92
- 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, Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs, *FASEB J.*, 2003, vol. 17, 271-273
- C. WARNECKE ; Z. ZABOROWSKA ; J. KURRECK ; V. A. ERDMANN ; U. FREI ; M. WIESENER ; K.-U. ECKARDT, Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells, *FASEB J.*, 2004, vol. 18, 1462-1464
- R. K. BRUICK ; S. L. MCKNIGHT, A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF, *Science*, 2001, vol. 294, 1337-1340
- 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, Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation, *Science*, 2001, vol. 292, 468-472
- M. IVÁN ; K. KONDO ; H. YANG ; W. KIM ; J. VALIANDO ; M. OHN ; A. SALIC ; J. M. ASARA ; W. S. LANE ; W. G. KÄELIN JR., HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing, *Science*, 2001, vol. 292, 464-468
- 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, vol. 94, 2156-2161