

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6473519号
(P6473519)

(45) 発行日 平成31年2月20日(2019.2.20)

(24) 登録日 平成31年2月1日(2019.2.1)

(51) Int. Cl.		F I	
C07D 213/81	(2006.01)	C07D 213/81	CSP
C07D 405/12	(2006.01)	C07D 405/12	
A61K 31/44	(2006.01)	A61K 31/44	
A61K 31/4433	(2006.01)	A61K 31/4433	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111

請求項の数 25 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-551703 (P2017-551703)	(73) 特許権者	517340035
(86) (22) 出願日	平成27年12月14日 (2015.12.14)		瀋陽三生製薬有限責任公司
(65) 公表番号	特表2018-510201 (P2018-510201A)		SHENYANG SUNSHINE P HARMACEUTICAL CO., LTD.
(43) 公表日	平成30年4月12日 (2018.4.12)		中国遼寧省瀋陽市瀋陽経済技術開発区十号 路1甲3号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/097246		No. 3, A1, Road 10, She nyang Economy & Tec hnology Development Zone, Shenyang, Liao ning, 110027 China
(87) 国際公開番号	W02016/155359		
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016.10.6)	(74) 代理人	100103894
審査請求日	平成29年11月22日 (2017.11.22)		弁理士 家入 健
(31) 優先権主張番号	201510141553.3		
(32) 優先日	平成27年3月27日 (2015.3.27)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

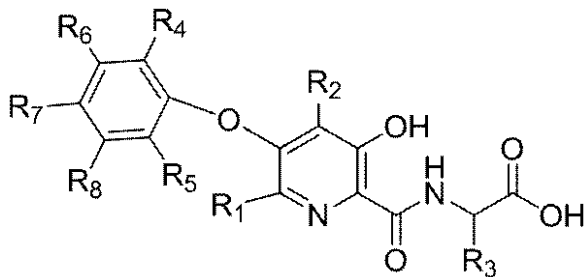
(54) 【発明の名称】 3-ヒドロキシピリジン化合物、その製造方法及び医薬品製造における使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学式 (I) で表される構造を有する化合物又はその薬学的に許容可能な塩であって、

【化1】



(I)

そのうち、R1、R2はそれぞれ独立した水素であり、

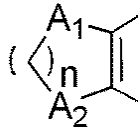
R3は水素、C1～C7の直鎖状、分岐鎖状又は環状アルキルであり、

R4、R5、R6、R7及びR8はそれぞれ独立したC1～C7アルキル、ハロゲン置換のC1～C7アルキル、C1～C3アルコキシ、ハロゲン置換のC1～C3アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、水素、アミノ、ニトロ、シアノ、置換若しくは非置換の芳香環

、又は置換若しくは非置換のヘテロ芳香環であり、

又は、R 4、R 5、R 6、R 7 及び R 8 が互いにオキソブリッジを介して結合することで下記官能基を形成することができ、

【化 2】



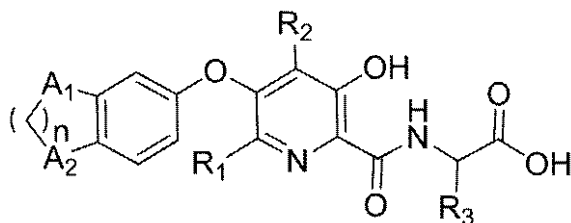
そのうち、n は 1、2、3 又は 4 の整数であり、A 1 及び A 2 は、酸素、炭素又は窒素原子からそれぞれ独立に選択される、化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

10

【請求項 2】

下記化学式 (I I) で表される構造を有する化合物又はその薬学的に許容可能な塩であって、

【化 3】



(I I)

20

そのうち、n は 1、2、3 又は 4 の整数であり、A 1 及び A 2 は、酸素、炭素又は窒素原子からそれぞれ独立に選択される、化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 3】

前記薬学的に許容可能な塩は、前記化合物と薬学的に許容可能な塩基が反応して得られる塩である、請求項 1 に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4】

下記化合物 1 ~ 化合物 3 5 から選択される化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【表 1】

化合物番号	構造	化合物番号	構造
1		12	
2		13	
3		14	
4		15	
5		16	
6		17	
7		18	
8		19	
9		20	

10

20

30

【表 2】

10		21	
11		22	
23		30	
24		31	
25		32	
26		33	
27		34	
28		35	
29			

10

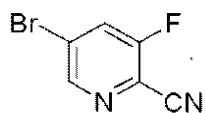
20

【請求項 5】

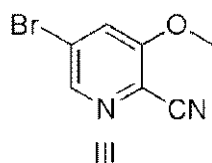
請求項 1 に記載の化合物の製造方法であって、下記ステップ1～ステップ5を含み、

ステップ 1：メタノールの存在下において、下記式の 5 - プロモ - 3 - フロオロピリジン - 2 - ホルモニトリルとナトリウムメトキシを反応させ、5 - プロモ - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリル（中間体 III）を生成し、

【化 4】



【化 5】



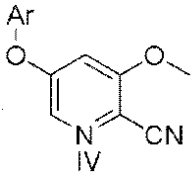
(III)

ステップ 2：ステップ 1 で得られた中間体（III）、ArOH 及びリガンドを溶媒に混合して加熱し、触媒の作用下で下ウルマン反応を経てエーテル系中間体（IV）を生成し、

30

40

【化 6】

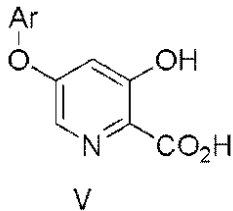


(I V)

ステップ 3 : ステップ 2 で得られた中間体 (I V) を、 H B r / 氷酢酸において加熱還流しながら加水分解させ、 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ギ酸誘導体 (V) を生成し、

10

【化 7】

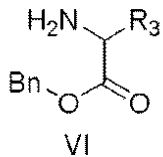


(V)

ステップ 4 : ステップ 3 で得られた中間体 (V) と $-R_3$ 置換のアミノ酸ベンジルエステル (V I) を、縮合剤の存在下で反応させてアミド化することにより、 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸ベンジルエステル中間体 (V I I) を生成し、

20

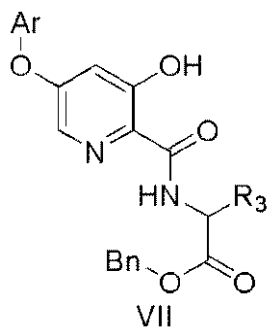
【化 8】



(V I)

30

【化 9】



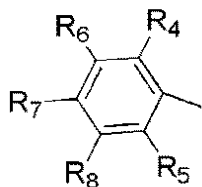
(V I I)

40

ステップ 5 : ステップ 4 で得られた中間体 (V I I) を水素化分解の条件、溶媒及び触媒の存在下、室温条件で水素化分解することでベンジルエステル保護基を除去し、上記化学式 (I) 又は化学式 (I I) で評される化合物を生成し、

そのうち、 A r は下記式で表される官能基であり、

【化 10】



式中、R 1、R 3 及び R 4 ~ R 8 は、請求項 1 と同じである、製造方法。

【請求項 6】

前記ステップ 2 において、触媒はヨウ化第一銅 (I) であり、金属リガンドは N , N - ジメチルグリシン、N - メチルプロリン及び N , N - テトラメチルエチレンジアミンからなる群より選択され、反応溶媒は 1 , 4 - ジオキサン、トルエン、テトラヒドロフランからなる群より選択され、反応は 70 ~ 120 の範囲に加熱することで行われ、

前記ステップ 3 において、臭化水素酸と氷酢酸の比は 2 : 1 ~ 1 : 3 の範囲であり、反応温度は 90 ~ 140 の範囲であり、加熱反応時間は 6 ~ 12 時間の範囲であり、

前記ステップ 4 において、前記 - R₃ 置換のアミノ酸ベンジルエステル (VI) は、グリシンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -) アラニンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -) バリンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -) ロイシンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -) イソロイシンベンジルエステル塩酸塩からなる群より選択され、前記溶媒はジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、1 , 4 - ジオキサン、N , N - ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドンからなる群より選択され、前記アミド化反応で使用する触媒は 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、ジシクロヘキシルカルボジイミドからなる群より選択され、

前記ステップ 5 において、触媒はパラジウム (0) / 炭素、水酸化パラジウム (II) 、水酸化パラジウム (II) / 炭素、二酸化白金 (IV) からなる群より選択され、水素化分解反応で使用する溶媒はメタノール、エタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、酢酸エチルからなる群より選択される、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 8】

H I F プロリルヒドロキシラーゼを阻害するための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【請求項 9】

内因性 E P O の生成を促進するための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【請求項 10】

低酸素誘導因子 を安定させるための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【請求項 11】

慢性疾患に伴う貧血を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【請求項 12】

前記慢性疾患に伴う貧血は、リウマチ性関節炎、リウマチ熱又は炎症性腸疾患である、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

炎症性サイトカインの生成を促進するための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子、インターロイキン又はインターフェロンである、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

貧血対象に対して外部からエリスロポエチンを投与する際の抵抗性を改善する医薬品の製造における、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、

前記化合物の投与によって造血前駆細胞のエリスロポエチンに対する応答を改善する、使用。

【請求項 16】

鉄摂取、鉄輸送及び鉄利用率向上に必須な因子の生成を促進するための医薬品の製造における、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、

前記因子は、赤芽細胞アミノレブリン酸シンターゼ、トランスフェリン、トランスフェリン受容体及びセルロプラスミンからなる群より選択される、使用。

【請求項 17】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、HIF プロリルヒドロキシラーゼを阻害する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 18】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、内因性 EPO の生成を促進する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 19】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、低酸素誘導因子 を安定させるための方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 20】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、慢性疾患に伴う貧血を治療するための方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 21】

前記慢性疾患に伴う貧血は、リウマチ性関節炎、リウマチ熱又は炎症性腸疾患である、請求項 20 に記載の方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 22】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、炎症性サイトカインの生成を促進する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 23】

前記炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子、インターロイキン又はインターフェロンである、請求項 22 に記載の方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 24】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、

前記投与によって造血前駆細胞のエリスロポエチンに対する応答を改善する、貧血対象に対して外部からエリスロポエチンを投与する際の抵抗性を改善する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【請求項 25】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、

前記投与によって鉄摂取、鉄輸送及び鉄利用率向上に必須な因子の生成を促進し、

10

20

30

40

50

前記因子は、赤芽細胞アミノレブリン酸シンターゼ、トランスフェリン、トランスフェリン受容体及びセルロプラスミンからなる群より選択される、鉄摂取、鉄輸送及び鉄利用率向上に必須な因子の生成を促進する方法（但し、ヒトに対する医療行為を除く）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医薬品の分野に関し、具体的には、3-ヒドロキシピリジン化合物とその製造方法、及び該化合物のHIFプロリルヒドロキシラーゼを阻害するための医薬品の製造における用途に関する。

【背景技術】

【0002】

低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor, HIF)は塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(basic helix-loop-helix, bHLH)及びPAS(Per/Arnt/Sim)を含む活性化転写因子であり、生物細胞内において一連の遺伝子調節を経て細胞の低酸素状態に適応するものである(Chowdhury, R., Hardy, A及びSchofield, C.J., 人体酸素感知装置及びその操作(The human oxygen sensing machinery and its manipulation), Chem. Soc. Rev., 2008, 37, 1308~1319頁; Kaelin, W.G., Jr., 及びRatcliffe, P.J., 後生動物による酸素センサー:HIFヒドロキシラーゼ経路における中心的役割(Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway) Mol. Cell, 2008, 30, 393~402頁; Schofield, C.J., 及びRatcliffe, P.J., HIFヒドロキシラーゼを利用する酸素センサー(Oxygen sensing by HIF hydroxylases) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2004, 5, 343~354頁)。

【0003】

1992年、Wangらがエリスロポエチン(erythropoietin, EPO)を研究する際に、低酸素状態となった細胞においてEPO生成を促進する活性化転写因子を発見し、後に該因子を低酸素誘導因子(以下、「HIF」とも略称する)と名づけた。HIFは細胞の低酸素状態における適応性と生存率に極めて重要であり、細胞の酸素量が通常の20%から1%に低下した場合であってもHIFの作用下では細胞が生き残ることが、後の研究により実証されている。

【0004】

HIFはHIF-1とHIF-2の2つの単位で構成され、HIF-1は酸素依存性の分解ドメイン(oxygen-dependent degradation domain, ODDD)を含み、該ドメインは細胞の酸素量を特定するために必要な構成単位である。HIF-1はHIF-2と安定なダイマーを形成することができ、該ダイマーが細胞の核内に移行して糖代謝関連酵素、GLUT-1、エリスロポエチン及び血管内皮細胞増殖因子(VEGF)等といった重要な酵素又は酵素系の発現を促し、細胞が低酸素状態に適応できるようにする。HIF-1は芳香族炭化水素受容体核内輸送体(aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT)の一種であり、HIF-2と結合してヘテロダイマーを形成し、下流遺伝子の転写を促進する。

【0005】

現在、HIF-1、HIF-2、HIF-3の3種類のHIF-1サブタイプが発見されている。HIF-1は1995年にWangらによって同定されたサブタイプであり、ヒトとマウスの複数箇所で発現する。HIF-2は1997年に単離、同定され、タンパク質配列がHIF-1と48%の類似性を示すと共に、HIF-1と似た機能を果たし、肺、内皮細胞及び頸動脈のみに発現する。HIF-3は最近になって新

10

20

30

40

50

たに発見されたHIF- α サブタイプであり、該サブタイプに関する研究は未だ不十分である。

【0006】

細胞内におけるHIF- α の発現は酸素含有量の影響を受けないが、通常酸素量である場合であっても、細胞内におけるHIF- α の半減期は5分程度であり、安定に存在することができない。HIF- α は低酸素状態に限って安定に存在し、下流の転写因子を活性化する役割を果たすことができる。一方、通常酸素量の細胞内において、HIF- α のODD領域内における402番目と564番目の2つのプロリン残基が、プロリルヒドロキシラーゼによって4-ヒドロキシプロリンに酸化されることによってHIF- α とHIF- β とのダイマー形成を阻害すると同時に、pVHLタンパク質と結合して速やかに分解され、低酸素環境に抵抗する機能を失ってしまう。HIF- α の分解過程で重要な役割を果たすプロリルヒドロキシラーゼ(Prolyl hydroxylase、以下、「PHD」又は「EGLN」とも略称する)は、2-ケトグルタル酸(2-oxoglutarate, 2-OG)依存性の酸素添加酵素である。PHDは2-OGと二価鉄イオンを補因子とし、1個の酸素原子をプロリン分子の4位に結合させてヒドロキシプロリンを形成し、同時に2-OGを1分子の二酸化炭素とコハク酸に変換する。2-OG類似体又は二価ニッケル、コバルト、マンガンイオンは、PHDによるHIF- α プロリン残基の酸化過程に拮抗してHIF- α の分解を抑制することができるため、HIF- α とHIF- β とのダイマー形成を促して下流の転写因子を活性化させ、結果として低酸素環境に抵抗する機能を果たすことができる。PHDは3種のサブタイプに分けられ、それぞれPHD1、PHD2及びPHD3である。更に、研究によってPHD1の抑制が骨格筋細胞の衰退の治療に有用であり、虚血状態において筋線維芽細胞を温存することにより炎症性腸疾患と大腸炎を治療することができ、並びに、心臓病及び腎臓病患者の心不全と虚血を治療できることが実証されている。一方、他の2種類のPHDサブタイプについては、その機能において区分があるかどうかは未だ不明である。

【0007】

HIFの1つの重要な役割は、生体内においてエリスロポエチン(EPO)の発現を促進することである。EPOは糖タンパク質ホルモンであり、赤血球の増殖、分化及び成熟を刺激することができる。更に、EPOは、骨髄の造血機能を刺激して、赤血球数を適時且つ効果的に増加させ、血液の酸素運搬能を向上させることができ、同時に、生体の酸素に対する結合、輸送と供給能力を高めて低酸素状態を改善することができる。正常な生理状況においては、EPOは主に腎臓組織で合成されて放出されるため、腎不全患者は体内でEPOを普通に合成できず、常に虚血症状に苦しめられる。EPOは、20世紀の1980年代末にAmgen社によって初めて製品化され、その後、慢性腎不全、エイズ、癌及び化学療法に起因する貧血の治療に利用されるようになっていく。現在、EPOの製造と応用面で大きな進展を成し遂げているが、外因性EPOの供給応用は依然として幾つかの問題を抱えている。かかる問題として、例えば、1)EPOの使用費用が高く、長期使用の患者にとっては相当重い負担を強いられ、2)EPOは大分子量の糖タンパク質であるため生体利用度が低く、さらに生体内における半減期が短く、消化管内の酵素系によって分解されやすいといった特徴があり、EPO注射によって頻繁に投与せざるを得ず、患者自らが適宜決めうる服用形態が制限され、患者に不便を感じさせ、3)産業規模で合成したEPOは免疫原性の問題を回避できず、薬品使用に一定のリスクがある等が挙げられる。

【0008】

外因性大分子量のEPOは使用面において上記の多くの問題を抱えているため、低分子量のHIFプロリルヒドロキシラーゼ阻害剤の開発が急務となっている。よって、外因性EPOの使用の代わりにHIF- α の分解の抑制と、更に、生体内における内因性EPOの生成の促進により、患者により多くの選択肢をもたらすことが期待されている。

【0009】

現在、Akebia社のAKB-6548、Fibrogen社のFG-4592の2

10

20

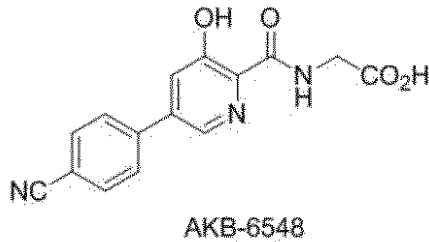
30

40

50

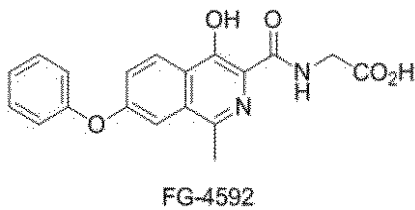
種類のHIFプロリルヒドロキシラーゼが既に第II段階の試験段階に入っている(WO 2012170377A1, US2010331374A1, US2010305097A1, P&GUS2007299086A1, US2004254215A1, US2007298104A1, US2009082357A1, US2010113444A1, WO2013134660, WO2010059552A1)。

【化1】



10

【化2】



20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明の目的は、新規構造を有する3-ヒドロキシピリジン化合物又はその薬学的に許容可能な塩を提供することである。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、上記化合物を製造する方法を提供することである。また、本発明のもう一つの目的は、上記化合物を含んでなる医薬組成物を提供することである。

【0012】

更に、本発明のもう一つの目的は、上記化合物又はその薬学的に許容可能な塩の医薬品製造における用途を提供することである。

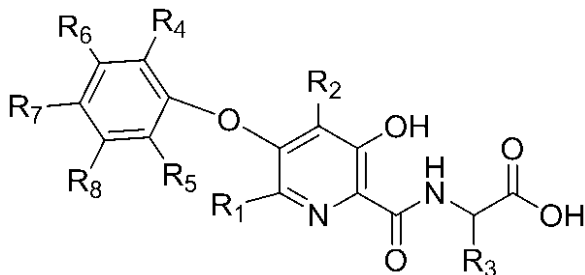
30

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の目的は、下記の技術思想によって実現される。つまり、下記化学式(I)で表される構造を有する化合物又はその薬学的に許容可能な塩であって、

【化3】



40

(I)

そのうち、R1、R2はそれぞれ独立した水素であり、

R3は水素、C1~C7の直鎖状、分岐鎖状又は環状アルキルであり、

R4、R5、R6、R7及びR8はそれぞれ独立したC1~C7アルキル、ハロゲン置

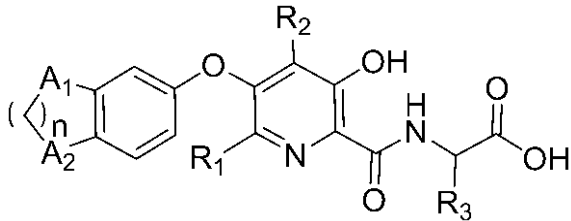
50

換の C 1 ~ C 7 アルキル、C 1 ~ C 3 アルコキシ、ハロゲン置換の C 1 ~ C 3 アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、水素、アミノ、ニトロ、シアノ置換又は非置換の芳香環又はヘテロ芳香環である。

【 0 0 1 4 】

また、R 4、R 5、R 6、R 7 及び R 8 が互いにオキソブリッジを介して結合することで、下記化学式 (I I) で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩を形成することができ、

【 化 4 】



(I I)

10

式 (I I) において、n は 1、2、3 又は 4 の整数であり、A 1 及び A 2 はそれぞれ独立した酸素、炭素又は窒素原子から選択される。

【 0 0 1 5 】

上記式 (I) 及び式 (I I) で表される化合物の薬学的に許容可能な塩として、好ましくは、前記化合物と薬学的に許容可能な塩基が反応して得られる塩であり、前記薬学的に許容可能な塩基としては水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、水酸化マグネシウム、酸化マグネシウム、水酸化カルシウム、酸化カルシウム等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 1 6 】

本発明において、特に好ましい化合物は下記の表に示される化合物である。

【 0 0 1 7 】

【表 1】

番号	化合物の構造	番号	化合物の構造
1		12	
2		13	
3		14	
4		15	
5		16	
6		17	
7		18	
8		19	
9		20	

10

20

30

【表 2】

10		21	
11		22	
23		30	
24		31	
25		32	
26		33	
27		34	
28		35	
29			

10

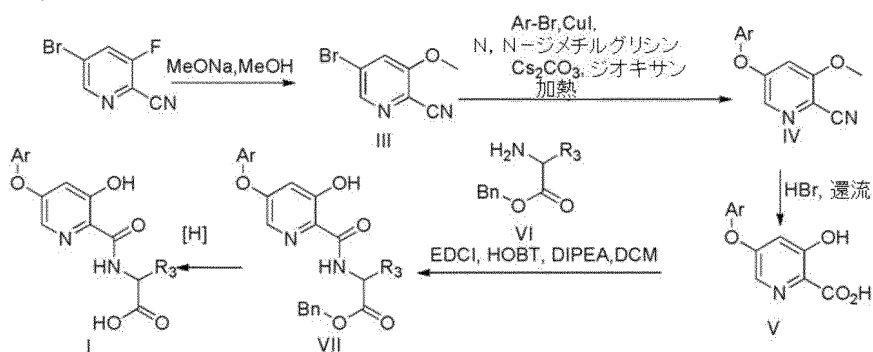
20

30

【0018】

上記式 (I) の化合物は、以下の反応経路を経て合成される。

【化 5】



40

【0019】

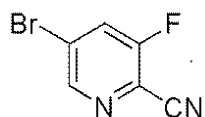
本発明の1つの側面において、本発明に係る化合物の製造方法は、以下のステップを含む。

【0020】

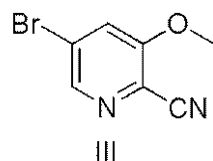
50

ステップ 1 : メタノールの存在下において、下記式の - ブロモ - 3 - フロオロピリジル - 2 - ホルモニトリルとナトリウムメトキシドを反応させ、5 - ブロモ - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリル (中間体 I I I) を生成する。

【化 6】



【化 7】

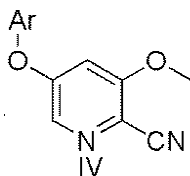


(I I I)

【 0 0 2 1】

ステップ 2 : ステップ 1 で得られた中間体 (I I I)、ArOH 及びリガンドを溶媒に混合して加熱し、触媒の作用下で下ウルマン反応を経てエーテル系中間体 (I V) を生成する。

【化 8】

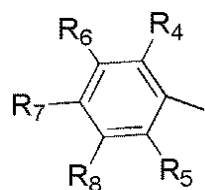


(I V)

【 0 0 2 2】

そのうち、Ar は下記式で表される官能基であり、式中、R4、R5、R6、R7 及び R8 はそれぞれ独立して C1 ~ C7 アルキル、ハロゲン置換の C1 ~ C7 アルキル、C1 ~ C3 アルコキシ、ハロゲン置換の C1 ~ C3 アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、水素、アミノ、ニトロ、シアノ置換又は非置換の芳香環又はヘテロ芳香環から選択される。

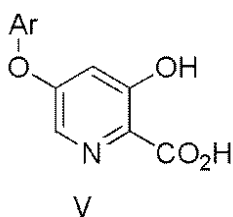
【化 9】



【 0 0 2 3】

ステップ 3 : ステップ 2 で得られた中間体 (I V) と HBr を加熱還流しながら反応させ、加水分解して 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ギ酸誘導体 (V) を生成する。

【化 10】



(V)

【 0 0 2 4】

10

20

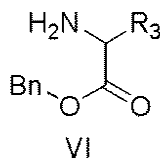
30

40

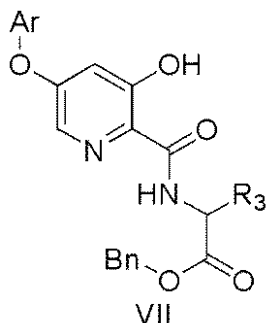
50

ステップ4：ステップ3で得られた中間体(V)と $-R_3$ 置換のアミノ酸ベンジルエステル(VI)を、縮合剤の存在下で反応させてアミド化することにより、3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸ベンジルエステル中間体(VII)を生成する。

【化11】



【化12】



(VII)

【0025】

ステップ5：ステップ4で得られた中間体(VII)を水素化分解の条件、溶媒及び触媒の存在、室温条件下で水素化分解することでベンジルエステル保護基を除去し、上記化学式(I)の化合物を生成する。

【0026】

上記ステップ1において使用する原料としての5-ブromo-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリルは、市販ルートで購入可能であり、例えば、Sigma社製又はJ&K社製のものを使用することができ、前記反応は室温で行われる。

【0027】

上記ステップ2において、触媒としてヨウ化第一銅(I)が好ましく、金属リガンドとしてN,N-ジメチルグリシン、N-メチルプロリン、N,N-テトラメチルエチレンジアミン等が好ましく、反応溶媒として1,4-ジオキサン、トルエン、テトラヒドロフランが好ましい。また、70 ~ 120 の温度で反応を行うことが好ましい。

【0028】

本発明の一実施形態において、前記ステップ3は、更に臭化水素酸・氷酢酸において中間体(IV)の保護基を除去し、同時に加水分解させて3-ヒドロキシピリジン-2-ギ酸中間体(V)を生成することを含む。このとき、臭化水素酸と氷酢酸の比としては2:1 ~ 1:3が好ましく、反応温度としては90 ~ 140 の範囲が好ましく、加熱反応時間としては6 ~ 12時間が好ましい。

【0029】

ステップ4において、上記 $-R_3$ アミノ酸ベンジルエステル(VI)をその塩酸塩の形で得ることができ、上記アミノ酸 $-R_3$ ベンジルエステル塩酸塩としてはグリシンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -)アラニンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -)バリンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -)ロイシンベンジルエステル塩酸塩、(- 又は -)イソロイシンベンジルエステル塩酸塩等が挙げられ、溶媒としてはジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン等が好ましく、アミド化反応で使用する触媒としては1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDCI)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)等が挙げられ、塩基としてはトリエチルアミン、N,N-ジイソプロピル

10

20

30

40

50

エチルアミンが好ましい。本発明の一実施形態において、中間体(V)とアミノ酸ベンジルエステル塩酸塩(VI)と縮合剤を混合して、室温で10時間以上かけて攪拌しながら反応させることで該ステップの反応を遂行する。

【0030】

ステップ5において、触媒としてはパラジウム(0)/炭素、水酸化パラジウム(II)、水酸化パラジウム(II)/炭素、二酸化白金(IV)等が好ましく、水素化分解反応で使用する溶媒としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、酢酸エチル等が好ましい。

【0031】

本発明は、更に、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩のHIFプロリルヒドロキシラーゼを阻害するための医薬品、並びに内因性EPOの生成を促進するための医薬品の製造における用途を提供する。また、本発明は、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩の低酸素誘導因子を安定させるための医薬品、並びに慢性疾患に伴う貧血を治療するための医薬品の製造における用途を提供し、そのうち、前記慢性疾患に伴う貧血とはリウマチ性関節炎、リウマチ熱又は炎症性腸疾患を指す。また、本発明は、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩の炎症性サイトカイン生成を促進するための医薬品の製造における用途を提供し、そのうち、前記炎症性サイトカインとは腫瘍壊死因子、インターロイキン又はインターフェロンを指すものである。また、本発明は、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩の化合物の貧血の対象に対して、外部からエリスロポエチンを投与する際の抵抗性を改善する医薬品の製造における用途を提供し、そのうち、前記化合物の投与によって、造血前駆細胞の前記エリスロポエチンに対する反応を改善することができる。また、本発明は、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩の鉄摂取、鉄輸送及び鉄利用率向上に必須な因子の生成を促進するための医薬品の製造における用途を提供し、そのうち、前記因子としては、赤芽細胞アミノレブリン酸シンターゼ、トランスフェリン、トランスフェリン受容体及びセルロプラスミンが挙げられる。

【0032】

本発明は、更に、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することによりHIFプロリルヒドロキシラーゼを阻害する方法、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与して内因性EPOの生成を促進する方法、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することにより低酸素誘導因子を安定させる方法、並びに、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することにより慢性疾患に伴う貧血を治療する方法を提供し、そのうち、前記慢性疾患に伴う貧血とは、リウマチ性関節炎、リウマチ熱又は炎症性腸疾患を指すものである。

【0033】

本発明は、更に、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することにより炎症性サイトカイン生成を促進する方法を提供し、そのうち、前記炎症性サイトカインとは、腫瘍壊死因子、インターロイキン又はインターフェロンを指すものである。

【0034】

本発明のもう1つの側面において、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することにより、貧血対象に対して外部からエリスロポエチンを投与する際の抵抗性を改善する方法を提供し、そのうち、前記化合物の投与によって造血前駆細胞の前記エリスロポエチンに対する反応を改善することができる。

【0035】

本発明は、更に、本発明に係る化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することにより鉄摂取、鉄輸送及び鉄利用率の向上に必須な因子の生成を促進する方法を提供し、そのうち、前記因子としては赤芽細胞アミノレブリン酸シンターゼ、トランスフェリン、トランスフェリン受容体及びセルロプラスミンが挙げられる。

【発明を実施するための形態】

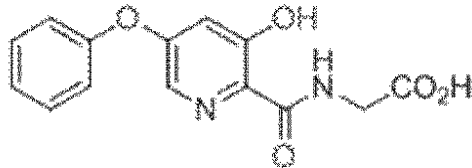
【0036】

以下、実施例に基づき本発明を詳述するが、これらの実施例は本発明を例示したに過ぎず、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨と範囲から逸脱しない前提でこれらの実施例について適宜変更を加えることができることは言うまでもない。

【0037】

実施例1：2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシ-2-ピリジンホルミルアミノ)酢酸の合成

【化13】



10

ステップ1：5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

室温においてナトリウムメトキシド9.7g(0.18mol)を含むメタノール溶液50mLを、5-ブロモ-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリル30g(0.15mol)を含むメタノール懸濁液150mLに滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で2時間反応させた。反応液に少量の氷酢酸を加えてpHを7~8に調整し、氷水300mLを加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して2時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥して5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの白色固形物を24g、収率75%で得た。

20

【0038】

ステップ2：3-メトキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル1.33g(14.1mmol)、フェノール1g(4.7mmol)、ヨウ化第一銅266mg(1.4mmol)、N,N-ジメチルグリシン144mg(1.4mmol)、炭酸セシウム2.3g(7.05mmol)及び1,4-ジオキサン10mLを混合した後、窒素ガス雰囲気、120で攪拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル50mLと水30mLを加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで3-メトキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルモニトリルの固形物を769mg、収率72%で得た。

30

【0039】

ステップ3：3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ギ酸の製造

3-メトキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルモニトリル600mgを氷酢酸15mLに溶かし、臭化水素酸液15mLを加えて120で8時間反応させた。反応液を25に冷却し、8時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ギ酸の白色固形物を370mg、収率60%で得た。

【0040】

ステップ4：2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸ベンジルエステルの製造

40

3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ギ酸89mg(0.38mmol)、グリシンベンジルエステル塩酸塩116mg(0.58mmol)、EDCI110mg(0.58mmol)及びHOBT52mg(0.385mmol)をジクロロメタン5mLに加えて懸濁液にし、該懸濁液にジイソプロピルエチルアミン75mg(0.578mmol)を滴下し、室温で8時間反応させた。反応液にジクロロメタン50mLを加えて希釈し、更に水30mLを加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留置した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが1:4の混合液で溶出することで2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸ベンジルエステルを106mg、収率73%で得た。

50

【0041】

ステップ5：2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の製造

2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸ベンジルエステル106mgをメタノール10mLに溶かし、窒素ガス雰囲気中で10%の水酸化パラジウム(II)/炭素10mgを加えた後、水素ガスを流して室温で攪拌しながら10時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して2-(3-ヒドロキシ-5-フェノキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の固形物を46mg、収率57%で得た。

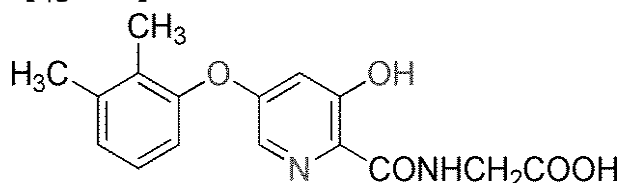
¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) 12.55(s, 1H), 9.21(t, J=6.2Hz, 1H), 8.00(d, J=2.4Hz, 1H), 7.54-7.40(m, 2H), 7.34-7.17(m, 3H), 6.83(d, J=2.4Hz, 1H), 3.97(d, J=6.2Hz, 1H)。

10

【0042】

実施例2：2-(5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の合成

【化14】



20

ステップ1：5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

室温においてナトリウムメトキシド9.7g(0.18mol)を含むメタノール溶液50mLを、5-プロモ-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリル30g(0.15mol)を含むメタノールの懸濁液150mLに滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で2時間反応させた。反応液に少量の氷酢酸を加えてpHを7~8に調整し、氷水300mLを加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して2時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥して5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの白色固形物24g、収率75%で得た。

30

【0043】

ステップ2：5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル426mg(2.0mmol, 1.0N)、2,3-ジメチルフェノール733mg(6.0mmol, 3.0N)、ヨウ化第一銅114mg(0.6mmol, 0.3N)、N,N-ジメチルグリシン61.8mg(0.6mmol, 0.3N)、炭酸セシウム1.3g(4.0mmol, 2.0N)及び1,4-ジオキサン6mLを混合した後、窒素ガス雰囲気、120℃で攪拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル50mLと水30mLを加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの淡黄色固形物410mg、収率80.7%で得た。

40

【0044】

ステップ3：5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸の製造

5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル410mg(1.61mmol)を氷酢酸2mLに溶かし、臭化水素酸液6mLを加えて120℃で8時間反応させた。反応液を25℃に冷却し、8時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して5

50

- (2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸の赤褐色固形物を350mg、収率83.9%で得た。

【0045】

ステップ4：{ [5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステルの製造

5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸250mg(0.96mmol, 1.0N)、グリシンベンジルエステル塩酸塩291.0mg(1.45mmol, 1.5N)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩277.0mg(1.45mmol, 1.5N)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール195.8mg(1.45mmol, 1.5N)をジクロロメタン10mLに加えて懸濁液にし、該懸濁液にジイソプロピルエチルアミン187.0mg(1.45mmol, 1.5N)を滴下し、室温で8時間反応させた。反応液にジクロロメタン50mLを加えて希釈し、更に水30mLを加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留去した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが1:4の混合液で溶出することで{ [5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステルの油状物を100mg、収率25.6%で得た。

10

【0046】

ステップ5：2-(5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の製造

{ [5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステル100mg(0.25mmol)をメタノール10mLに溶かし、窒素ガス雰囲気下で10%の水酸化パラジウム(II)/炭素20mgを加えた後、水素ガスを流して室温で攪拌しながら10時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して2-(5-(2,3-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の白色固形物を39mg、収率49.4%で得た。

20

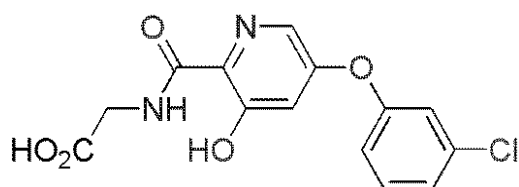
¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) 12.53(s, 1H), 9.17(t, J=6.2Hz, 1H), 7.97(d, J=2.4Hz, 1H), 7.25-7.07(m, 2H), 7.01-6.94(m, 1H), 6.55(d, J=2.4Hz, 1H), 3.97(d, J=6.0Hz, 1H), 2.31(s, 3H), 2.07(s, 3H)。

30

【0047】

実施例3：2-(5-(3-クロロフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の合成

【化15】



40

ステップ1：5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

室温においてナトリウムメトキシド9.7g(0.18mol)を含むメタノール溶液50mLを、5-ブロモ-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリル30g(0.15mol)を含むメタノール懸濁液150mLに滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で2時間反応させた。反応液に少量の氷酢酸を加えてpHを7~8に調整し、氷水300mLを加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して2時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケー

50

キを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥させて5 - ブロモ - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリルの白色固形物を24 g、収率75%で得た。

【0048】

ステップ2：5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリルの製造

5 - ブロモ - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリル400 mg、3 - クロロフェノール500 mg、ヨウ化第一銅120 mg、N, N - ジメチルグリシン80 mg、炭酸セシウム1.5 g (4.0 mmol, 2.0 N) 及び1, 4 - ジオキサン2 mLを混合した後、窒素ガス雰囲気、120 で攪拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル50 mLと水30 mLを加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリルの淡黄色固形物390 mgを得た。

10

【0049】

ステップ3：5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸の製造

5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリル390 mg (0.61 mmol) を氷酢酸1 mLに溶かし、臭化水素酸液3 mLを加えて120 で8時間反応させた。反応液を25 に冷却し、8時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸の赤褐色固形物300 mgを得た。

20

【0050】

ステップ4：{ [5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステルの製造

5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸300 mg、グリシンベンジルエステル塩酸塩560 mg、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩460 mg 及び1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール330 mgをジクロロメタン8 mLに加えて懸濁液にし、該懸濁液に更にジイソプロピルエチルアミン340 mgを滴下した後、室温で8時間反応させた。反応液にジクロロメタン50 mLを加えて希釈し、更に水30 mLを加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留去した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが1 : 4の混合液で溶出することで、{ [5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステルの淡黄色油状物150 mgを得た。

30

【0051】

ステップ5：2 - (5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の製造

{ [5 - (3 - クロロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステル150 mgをメタノール10 mLに溶かし、窒素ガス雰囲気下で10%の水酸化パラジウム(II) / 炭素15 mgを加え、水素ガスを流して室温で攪拌しながら10時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して2 - (5 - (2, 3 - ジフルオロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の白色固形物70 mgを得た。

40

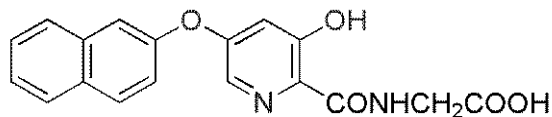
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 12.57 (s, 1H), 9.24 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.56 - 7.30 (m, 2H), 7.30 - 7.14 (m, 1H), 7.12 - 6.94 (m, 2H), 3.96 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H)。

【0052】

実施例4：2 - (3 - ヒドロキシ - 5 - (ナフタレン - 2 - オキシ)ピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の合成

50

【化16】



ステップ1：5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

室温において、ナトリウムメトキシド9.7g(0.18mol)を含むメタノール溶液50mLを、5-プロモ-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリル30g(0.15mol)を含むメタノール懸濁液150mLに滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で2時間反応させた。反応液に少量の氷酢酸を加えてpHを7~8に調整し、氷水300mLを加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して2時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥させて5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの白色固形物を24g、収率75%で得た。

10

【0053】

ステップ2：3-メトキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-ホルモニトリルの製造

5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル320mg(1.5mmol, 1.0N)、2-ナフトール649mg(4.5mmol, 3.0N)、ヨウ化第一銅85.5mg(0.45mmol, 0.3N)、N,N-ジメチルグリシン46.4mg(0.45mmol, 0.3N)、炭酸セシウム978mg(3.0mmol, 2.0N)及び1,4-ジオキササン6mLを混合した後、窒素ガス雰囲気、120で攪拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル50mLと水30mLを加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで3-メトキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-ホルモニトリルの赤色固形物を300mg、収率72.5%で得た。

20

【0054】

ステップ3：3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボン酸の製造

3-メトキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-ホルモニトリル300mgを氷酢酸1.5mLに溶かし、臭化水素酸液4.5mLを加えて120で8時間反応させた。反応液を25に冷却し、8時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボン酸の赤褐色固形物を200mg、収率81.8%で得た。

30

【0055】

ステップ4：{[3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステルの製造

3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボン酸250mg(0.89mmol, 1.0N)、グリシンベンジルエステル塩酸塩268.2mg(1.33mmol, 1.5N)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩254.0mg(1.33mmol, 1.5N)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール179.6mg(1.33mmol, 1.5N)をジクロロメタン10mLに加えて懸濁液にし、該懸濁液に更にジイソプロピルエチルアミン171.6mg(1.33mmol, 1.5N)を滴下した後、室温で8時間反応させた。反応液にジクロロメタン50mLを加えて希釈し、更に水30mLを加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留去した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが1:4の混合液で溶出することで{[3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステルの淡黄色油状物

40

50

を 100 mg、収率 25.4% で得た。

【0056】

ステップ 5: 2-(3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の製造。

{[3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-カルボニル]アミノ}酢酸ベンジルエステル 100 mg (0.23 mmol) をメタノール 10 mL に溶かし、窒素ガス雰囲気下で 10% の水酸化パラジウム (II) / 炭素 20 mg を加え、水素ガスを流して室温で攪拌しながら 10 時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して 2-(3-ヒドロキシ-5-(ナフタレン-2-オキシ)ピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の白色固形物を 43 mg、収率 56.2% で得た。

10

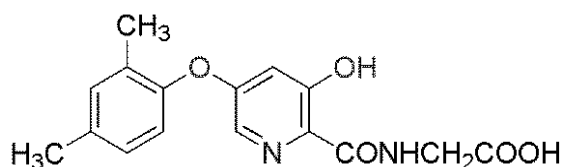
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 12.57 (s, 1H), 9.25 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.70 - 7.68 (m, 1H), 7.60 - 7.47 (m, 2H), 7.46 - 7.37 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.98 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H)。

【0057】

実施例 5: 2-(5-(2,4-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の合成

【化 17】

20



ステップ 1: 5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

室温においてナトリウムメトキシド 9.7 g (0.18 mol) を含むメタノール溶液 50 mL を、5-ブロモ-3-フロオロピリジン-2-ホルモニトリル 30 g (0.15 mol) を含むメタノール懸濁液 150 mL に滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で 2 時間反応させた。反応液に少量の水酢酸を加えて pH を 7 ~ 8 に調整し、氷水 300 mL を加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して 2 時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥して 5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの白色固形物を 24 g、収率 75% で得た。

30

【0058】

ステップ 2: 5-(2,4-ジメチルフェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

5-ブロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル 426 mg (2.0 mmol, 1.0 N)、2,4-ジメチルフェノール 733 mg (6.0 mmol, 3.0 N)、ヨウ化第一銅 114 mg (0.6 mmol, 0.3 N)、N,N-ジメチルグリシン 61.8 mg (0.6 mmol, 0.3 N)、炭酸セシウム 1.3 g (4.0 mmol, 2.0 N) 及び 1,4-ジオキサン 6 mL を混合した後、窒素ガス雰囲気、120 °C で攪拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル 50 mL と水 30 mL を加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで 5-(2,4-ジメチルフェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの淡黄色固形物を 250 mg、収率 49.2% で得た。

40

【0059】

ステップ 3: 5-(2,4-ジメチルフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸の製造

50

5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリル 250 mg (0.98 mmol) を氷酢酸 1.5 mL に溶かし、臭化水素酸液 4.5 mL を加えて 120 °C で 8 時間反応させた。反応液を 25 °C に冷却し、8 時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して 5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸の赤褐色固形物を 185 mg、収率 73.1% で得た。

【0060】

ステップ 4 : { [5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステルの製造

5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボン酸 185 mg (0.71 mmol, 1.0 N)、グリシンベンジルエステル塩酸塩 215.4 mg (1.07 mmol, 1.5 N)、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 204.4 mg (1.07 mmol, 1.5 N) 及び 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール 144.4 mg (1.07 mmol, 1.5 N) をジクロロメタン 10 mL に加えて懸濁液にし、該懸濁液に更にジイソプロピルエチルアミン 138 mg (1.07 mmol, 1.5 N) を滴下した後、室温で 8 時間反応させた。反応液にジクロロメタン 50 mL を加えて希釈し、更に水 30 mL を加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留去した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが 1 : 4 の混合液で溶出することで { [5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステルの淡黄色油状物を 50 mg、収率 17.3% で得た。

【0061】

ステップ 5 : 2 - (5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の製造

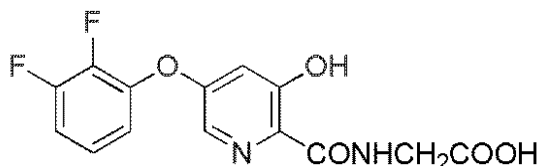
{ [5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - カルボニル] アミノ } 酢酸ベンジルエステル 50 mg (0.12 mmol) をメタノール 10 mL に溶かし、窒素ガス雰囲気下で 10% の水酸化パラジウム (II) / 炭素 10 mg を加え、水素ガスを流して室温で攪拌しながら 10 時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して 2 - (5 - (2, 4 - ジメチルフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の白色固形物を 20 mg、収率 51.4% で得た。

¹H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 12.52 (s, 1H), 9.17 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.23 - 7.18 (m, 1H), 7.15 - 7.07 (m, 1H), 7.06 - 6.94 (m, 1H), 6.56 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.11 (s, 3H)。

【0062】

実施例 6 : 2 - (5 - (2, 3 - ジフルオロフェノキシ) - 3 - ヒドロキシピリジン - 2 - ホルミルアミノ) 酢酸の合成

【化 18】



ステップ 1 : 5 - ブロモ - 3 - メトキシピリジン - 2 - ホルモニトリルの製造

室温においてナトリウムメトシド 9.7 g (0.18 mol) を含むメタノール溶液 50 mL を、5 - ブロモ - 3 - フロオロピリジン - 2 - ホルモニトリル 30 g (0.15 mol) を含むメタノール懸濁液 150 mL に滴下し、滴下終了後、反応液が透明になるまで室温で 2 時間反応させた。反応液に少量の氷酢酸を加えて pH を 7 ~ 8 に調整し、氷

水300 mLを加えた。反応液を濃縮して固形物が析出するようにし、冷却して2時間静置することでより徹底的に固形物を析出させた。析出した固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄して回収し、室温で自然乾燥して5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの白色固形物を24 g、収率75%で得た。

【0063】

ステップ2：5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの製造

5-プロモ-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル426 mg (2.0 mmol, 1.0 N)、2,3-ジフルオロフェノール786 mg (6.0 mmol, 3.0 N)、ヨウ化第一銅114 mg (0.6 mmol, 0.3 N)、N,N-ジメチルグリシン61.8 mg (0.6 mmol, 0.3 N)、炭酸セシウム1.3 g (4.0 mmol, 2.0 N)及び1,4-ジオキサン6 mLを混合した後、窒素ガス雰囲気、120 で撹拌しながら一晩反応させた。反応液を濃縮した後に酢酸エチル50 mLと水30 mLを加えてよく振り混ぜ、酢酸エチル層を回収して濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製することで5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリルの淡黄色固形物を160 mg、収率30.5%で得た。

【0064】

ステップ3：5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸の製造

5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-メトキシピリジン-2-ホルモニトリル160 mg (0.61 mmol)を氷酢酸1 mLに溶かし、臭化水素酸液3 mLを加えて120 で8時間反応させた。反応液を25 に冷却し、8時間静置することで固形物を析出させた。固形物を減圧濾過し、濾過ケーキを水で洗浄した後に回収し、減圧乾燥して5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸の赤褐色固形物を150 mg、収率92.0%で得た。

【0065】

ステップ4：{ [5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ }酢酸ベンジルエステルの製造

5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボン酸150 mg (0.56 mmol, 1.0 N)、グリシンベンジルエステル塩酸塩169.4 mg (0.84 mmol, 1.5 N)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩160.4 mg (0.84 mmol, 1.5 N)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール113.4 mg (0.84 mmol, 1.5 N)をジクロロメタン8 mLに加えて懸濁液にし、該懸濁液に更にジイソプロピルエチルアミン108.4 mg (0.84 mmol, 1.5 N)を滴下した後、室温で8時間反応させた。反応液にジクロロメタン50 mLを加えて希釈し、更に水30 mLを加えてよく振り混ぜ、有機相を回収して有機溶媒を留去した。残留物をカラムクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチルと石油エーテルとが1:4の混合液で溶出することで{ [5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ }酢酸ベンジルエステルの淡黄色油状物を70 mg、収率20.1%で得た。

【0066】

ステップ5：2-(5-(2,3-ジフルオロフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の製造

{ [5-(2,3-ジフルオロ-フェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボニル]アミノ }酢酸ベンジルエステル70 mg (0.17 mmol)をメタノール10 mLに溶かし、窒素ガス雰囲気下で10%の水酸化パラジウム(II)/炭素15 mgを加え、水素ガスを流して室温で撹拌しながら10時間反応させた。減圧濾過することで触媒を除去し、濾液を濃縮して2-(5-(2,3-ジフルオロフェノキシ)-3-ヒドロキシピリジン-2-ホルミルアミノ)酢酸の白色固形物を30 mg、収率54.5%で得た。

。

10

20

30

40

50

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 12.82 (s, 1H), 12.59 (s, 1H), 9.25 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.46 - 7.35 (m, 1H), 7.34 - 7.25 (m, 1H), 7.24 - 7.18 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H)。

【0067】

測定例1：体外におけるHIF-PHD2阻害剤系化合物の肝癌細胞Hep3Bのエリスロポエチン発現に対する促進作用

実験用肝癌細胞Hep3B(中国典型培養物保存センター、CCTCC)の培養に必要な完全培地として、MEM(GIBCO社製、Cat番号GNM41500、杭州吉諾生物医薬技術有限公司より購入)に10%の血清FBS(GIBCO社製、Cat番号10099-141)及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Cat番号GNM15140、杭州吉諾生物医薬技術有限公司より購入)を加えたものを使用し、細胞培養には、37℃、CO₂が5%のインキュベーターを用いた。実験用試薬として、DMSO(分子生物学実験用、純度 $\geq 99.9\%$ 、Cat番号D8418)はシグマ社製であり、測定用ELISAキット(ヒトエリスロポエチン定量用IVD ELISA、商品コードDEP00)はR&Dシステムズ社製であった。測定用対照物としてAKB-6548は、自ら作製するか、商業ルートで購入した。測定試料は、遮光密封して-20℃に保存した。

【0068】

測定試料及びポジティブコントロールを、遮光条件下で、滅菌水又はDMSOに完全に溶かし、濃度がそれぞれ 10^{-1} mol/L、 10^{-2} mol/Lの保存液を調製して-20℃に保存した。FBS濃度が0.5%のMEM培地を希釈液として、前記測定試料の保存液を希釈し、濃度がそれぞれ100 μ mol/L、10 μ mol/Lの測定用希釈液を調製した。96ウェルプレートに、200 μ L/ウェル(1.5又は 2.0×10^4 細胞/ウェル)の量で肝癌細胞Hep3Bの完全培地懸濁液を加え、温度37℃、CO₂濃度5%のインキュベーターで一晩培養した。96ウェルプレート中の古い培養液を捨て、細胞を0.5%のFBSのMEM培地で1回洗った後、遮光条件下で200 μ L/ウェルの量で測定試料を加えて、濃度がそれぞれ100 μ mol/L、10 μ mol/Lとなるようにし、各濃度には2つのウェルを設けてそれぞれ測定用ウェル及び予備用ウェルとした。また、測定液の代わりに希釈液を加えて細胞対照ウェル(測定試料と溶媒を含まず)とした。また、測定液の代わりに同じ濃度の溶媒(DMSO)を含む希釈液を用い、溶媒対照ウェル(測定試料を含まず)とした。温度37℃、CO₂濃度5%のインキュベーターで24時間培養した後、上清を捨てサンプルとして-20℃に冷凍保存した。停止液を100 μ L/ウェルの量で加えた後、マイクロプレートリーダーを用いて450 nm~600 nmの範囲でOD値を測定し、検量線に基づいて測定試料のEPO発現に対する促進活性(mIU/mL)を算出した。測定結果を下記表3に示す。

【0069】

10

20

30

【表 3】

化合物番号	EPOレベル/AKB654 8 EPOレベル (10 μM)	化合物番号	EPOレベル/AKB654 8 EPOレベル (10 μM)
1	0.5	33	0.2
12	0.8	27	0.0
2	0.3	34	0.5
13	0.5	28	0.1
14	1.7	35	0.2
16	1.1	29	0.2
6	0.6	30	1.0
4	1.5	20	1.4
3	0.8	31	0.1
5	1.3	25	0.2
18	1.3	26	0.6
8	1.5	32	0.8
17	1.2		
9	1.5		
7	0.2		
10	0.6		
21	1.5		
19	1.3		

10

20

【0070】

測定例 2：本発明に係る化合物の PHD2 に対する抑制効果 (IC₅₀) の測定

蛍光偏光法 (fluorescence polarization, FP) を利用して低酸素誘導因子 HIF-1 と VBC 複合体 (von Hippel-Lindau protein - ElonginB - ElonginC, VBC) との相互作用を測定し、HIF プロリルヒドロキシラーゼ (prolyl hydroxylases 2, PHD2) 阻害剤化合物の酵素阻害活性を測定した。

【0071】

アスコルビン酸 200 μM、 α -ケトグルタル酸 20 μM、FeCl₂ 100 μM を含む NETN (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF) 緩衝液に、遮光条件下で、終濃度が 1 μM の FAM-HIF (556 ~ 575) を加えた。そして、特定濃度の測定化合物及び陽性化合物 (ネガティブコントロール及びポジティブコントロールとして、化合物の代わりに緩衝液を用いる) を加え、最後に終濃度が 0.5 μg/μL の PHD2 (ネガティブコントロールとして PHD2 の代わりに緩衝液を用いる) を加えた。十分混合した後、室温、遮光条件下で静置することにより 30 分間反応させ、その後 95 °C のウォーターバスに 1 分間置いて反応を停止させた。温度が室温に戻るまで待ち、試料を次の測定に備えて一時保存した。黒色の 96 ウェルプレートに EBC 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40) を加え、更に終濃度が 300 nM の GST-VBC 複合体 (ブランク対照としてウェルに EBC 緩衝液のみを入れる) を加えた。そして、遮光して PHD2 プロリンヒドロキシル化反応のサンプルを、終濃度が 100 nM となるように加え、反応基質とした。十分混合した後、全波長マルチモードプレートリーダー (TECAN infinite M1000) を用いて励起波長 407 nm、発光波長 518 nm の条件下で横手方向及び長手方向の蛍光強度値を測定した。蛍光偏光度 (mP) は、下記式 1 に従って算出した。

30

40

【0072】

<式 1>

蛍光偏光度 (mP) = 1000 × (横手方向の蛍光強度値 - G 因子 × 長手方向の蛍光強度値) / (横手方向の蛍光強度値 + G 因子 × 長手方向の蛍光強度値)

50

そのうち、横手方向の蛍光強度値 = 測定ウェルの横手方向における蛍光強度値 - ブランク対照の横手方向における蛍光強度値

長手方向の蛍光強度値 = 測定ウェルの長手方向における蛍光強度値 - ブランク対照の長手方向における蛍光強度値

【0073】

また、下記式2に従って測定化合物のPHD2阻害率(%)を算出した。

【0074】

<式2>

阻害率(%) = $1 - (\text{mP測定ウェル} - \text{mPネガティブコントロールウェル}) / (\text{mPポジティブコントロールウェル} - \text{mPネガティブコントロールウェル})$

10

【0075】

IC₅₀はGraphpad Prism4.0ソフト(Golden software, Golden, Colorado, USA)を利用し、非線形回帰法を用いて算出した。

【0076】

【表4】

化合物番号	IC ₅₀ (μM)
1	84
5	237
8	91
9	15
19	63
22	236

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
		A 6 1 P	29/00

- (72)発明者 周雲隆
中国江蘇省南京市柳州東路天潤城六区2 2 幢5 0 4 室
- (72)発明者 蔡遂雄
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, ベリーフィールド 3 6 2 3
- (72)発明者 王光鳳
中国上海市浦東新区碩川路1 2 5 弄3 号8 0 2 室
- (72)発明者 焦玲玲
中国江蘇省泰州市高港区港城花苑2 1 棟5 0 3 室
- (72)発明者 閔平
中国上海市浦東新区 ジン 東一村9 号6 0 1 室
- (72)発明者 景羽
中国江蘇省泰州市海陵区濟川路1 1 1 号5 6 棟7 0 3 室
- (72)発明者 郭明
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, アスター メドーズ プレイス
5 8 1 0

審査官 齋藤 光介

- (56)参考文献 特開平0 7 - 2 4 2 6 3 5 (J P , A)
特表2 0 0 8 - 5 4 6 6 4 4 (J P , A)
特表2 0 1 4 - 5 2 2 4 0 9 (J P , A)
特表2 0 0 6 - 5 2 7 2 0 0 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 0 7 D
A 6 1 K
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)