POSSE
HERRERA
RUIZ

-Top Ranked Chambers Latin America 2012
-Firma Colombiana del año 2011

Industria y C
SUPERINTEN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-109274- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 14:42:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

DELEGATURA DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD

FASE NACIONAL -PCT

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: 1H-PIRAZOL-5-OLATO SÓDICO SUSTITUIDO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07D 403/14 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)

71. SOLICITANTE BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH

DOMICILIO Alfred Nobel Strasse 10, Monheim am Rhein

74. APODERADO HELENA CAMARGO WILLIAMSON

22. BOGOTÁ D.C., ABRIL 30 DE 2013

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-109274- -00000-0000

Fecha: 2013-04-30 14:42:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	**PCT/EP2011/070099**	**Fecha**	15/11/2011
Publicación Internacional No.	**WO 2012/065967 A1**	**Fecha**	24/05/2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

1H-PIRAZOL-5-OLATO SÓDICO SUSTITUIDO

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

C07D 403/14 **(2006.01)** ***A61P 9/00*** **(2006.01)** ***A61K 31/506*** **(2006.01)**

SOLICITANTE (S) Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	**Alfred Nobel Strasse 10, Monheim am Rhein**	No. TELÉFONO	
CIUDAD	**Monheim am Rhein**	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	**ALEMANIA**
PAÍS DE RESIDENCIA	**ALEMANIA**		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. MILITZER	**Hans Christian**	**ALEMANIA**
2. GRIES	**Jörg**	**ALEMANIA**
3. KOEP	**Stefan**	**ALEMANIA**

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Alemania		**1. Odenthal**	**1. Waldweg 2, 51519 Odenthal**
2. Alemania		**2. Haad**	**2. August-Macke-Weg 34, 42781 Haad**
3. Alemania		**3. Ennepetal**	**3. Saarlandring 31, 58256 Ennepetal**

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CAMARGO WILLIAMSON	**HELENA**	**C.C 35.455.268 T.P 76985**

DIRECCIÓN	**CARRERA 7 Nº 71 – 52, TORRE A, PISO 5**	No. TELÉFONO	**3257300**
CIUDAD	**BOGOTÁ**	CORREO ELECTRÓNICO	**helena.camargo@phrlegal.com**
PAÍS	**COLOMBIA**	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. **ALEMANIA**			**10 2010 044 131.7**	**18/11/2010**

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

HELENA CAMARGO WILLIAMSON

17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios:
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones:
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios:
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso, **PODER PROT 13 102341**
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

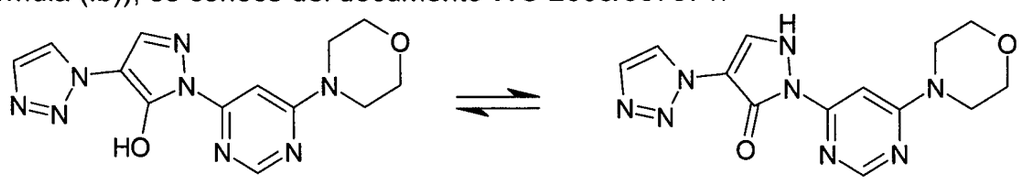
☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☒ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

1H-pirazol-5-olato sódico sustituido

La presente solicitud se refiere a 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico, a procedimientos para su preparación, a su uso para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades como también su uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades, especialmente de enfermedades cardiovasculares y hematológicas, de enfermedades renales como también para ayudar a la curación de heridas.

El compuesto de fórmula (I), 1-[6-(morfolin-4-il) pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-ol (forma enol; fórmula (Ia)) o bien 2-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1,2-dihidro-3H-pirazol-3-ona (forma ceto; fórmula (Ib)), se conoce del documento WO 2008/067871.



(Ia) (I) (Ib)

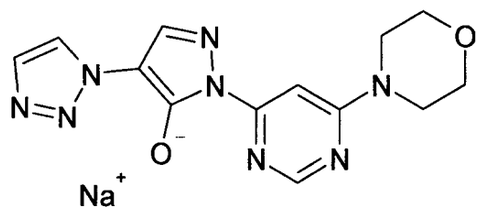
El compuesto de fórmula (I) actúa como inhibidor de las HIF-prolil-4-hidroxilasas y debido a este mecanismo de acción específico en *vivo* después de la administración por vía parenteral u oral produce la inducción de genes blanco HIF, como p. ej. eritropoyetina, y los procedimientos biológicos causados por ello, como p. ej., la eritropoyesis.

El compuesto de fórmula (I) es higroscópico y en condiciones normales del entorno (20-35 °C, presión normal) ya absorbe hasta aproximadamente el 6 % en peso de agua si la humedad ambiente relativa excede 20 % hr. La absorción de 6 % en peso de agua se cumple prácticamente con una humedad ambiental de 30 % hr. Un compuesto de fórmula (I) que contiene agua, cede nuevamente parte del agua contenida cuando la humedad ambiental es menor del 30 % hr. Esta absorción de agua o bien cesión de agua dificulta el manejo del compuesto de fórmula (I), p. ej., los procedimientos de pesaje, y la preparación del compuesto de fórmula (I) en una forma definida, estable y constante para el uso en

medicamentos o bien la preparación de medicamentos que contienen el compuesto de fórmula (I). De esa manera aumenta especialmente el dispendio técnico durante la preparación de formas de aplicación que contienen el compuesto de fórmula (I), como p. ej. comprimidos, granulados o soluciones bebibles, dado que para una concentración constante del compuesto de fórmula (I) es necesario tomar medidas para el control y para la regulación de la humedad ambiental.

Ahora se encontró sorprendentemente que del compuesto de fórmula (I) se puede preparar una sal sódica que presenta ventajas decisivas respecto del compuesto de fórmula (I).

La presente invención proporciona el compuesto 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico que corresponde al compuesto de fórmula (II)



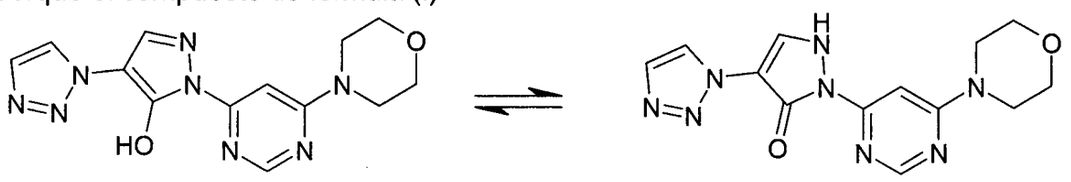
(II)

En el marco de la presente invención el 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico (compuesto de fórmula (II)) preferentemente se presenta en forma cristalina.

Mediante el uso de acuerdo con la invención del compuesto de fórmula (II) se asegura que se logra en comparación con el compuesto de fórmula (I) conocido una estabilidad significativamente más elevada respecto de la absorción o bien la cesión de agua al variar la humedad ambiental. El 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico (compuesto de fórmula (II)) contiene menos del 0,5 % en peso de agua, no es higroscópico y en condiciones de entorno usuales (20-35 °C, presión normal) incluso con humedad ambiental elevada de hasta el 90 % hr, solo varía mínimamente su contenido de agua, es

decir menos del 0,5 % en peso. El compuesto de fórmula (II) técnicamente es de manipulación más sencilla, es decir en los procedimientos de pesaje, y especialmente cuando se trata de garantizar una concentración constante del compuesto de fórmula (II) en una forma de aplicación, como p. ej. un granulado, una solución bebible o un comprimido. Además, el compuesto de fórmula (II) presenta respecto del compuesto de fórmula (I) una solubilidad en agua más elevada.

La invención proporciona además un procedimiento para la preparación del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II), que está caracterizado porque el compuesto de fórmula (I)



(Ia) (I) (Ib)

se hace reaccionar en un disolvente con hidróxido de sodio o soda cáustica acuosa o una sal sódica, en su caso con la adición de una base.

Es de preferencia un procedimiento para la preparación del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II), caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) se hace reaccionar en un disolvente con soda cáustica acuosa, en su caso con la adición de una base.

Se prefiere especialmente un procedimiento para la preparación del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II), caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) se hace reaccionar en un disolvente con soda cáustica acuosa, con la adición de trietilamina.

La reacción con hidróxido de sodio o soda cáustica acuosa o una sal sódica por lo general se produce en un disolvente, preferentemente en un rango de temperatura de 20 °C a 120 °C, de preferencia especial en un rango de temperatura de 40 °C a 70 °C, a presión normal. El compuesto de fórmula (II) se aísla de la suspensión obtenida a una temperatura entre -20 °C y 80 °C, preferentemente a una

temperatura de 0 °C a 20 °C, a presión normal mediante filtración y después de esto se seca.

En caso que la reacción se produzca con la adición de una base, el compuesto de fórmula (I) por lo general en primer lugar se disuelve con la adición de una base orgánica en un disolvente a una temperatura de 20 °C a 120 °C, preferentemente a una temperatura de 40 °C a 70 °C, a presión normal y después de esto se produce el precipitado del compuesto de fórmula (II) mediante la adición de hidróxido de sodio o soda cáustica acuosa o una sal sódica a una temperatura de 20 °C a 120 °C, preferentemente a una temperatura de 40 °C a 70 °C, a presión normal. El compuesto de fórmula (II) se aísla de la suspensión obtenida a una temperatura entre -20 °C y 80 °C, preferentemente a una temperatura de 0 °C a 20 °C, a presión normal por filtración y después de esto se seca.

Se usaron el hidróxido de sodio y la soda cáustica acuosa y la sal sódica en una proporción molar de 0,8 a 2 equivalentes molares respecto del compuesto de fórmula (I). Preferentemente se usan el hidróxido de sodio y la soda cáustica acuosa y la sal sódica en una proporción molar de 1,0 a 1,4 equivalentes molares respecto del compuesto de fórmula (I).

Como sal sódica son adecuadas por ejemplo las sales de ácidos orgánicos como carboxilatos de sodio, como por ejemplo acetato de sodio o citrato de sodio, o sales de ácidos inorgánicos como por ejemplo carbonato de sodio, hidrocarbonato de sodio, fosfato de sodio, hidrofosfato de sodio o cloruro de sodio.

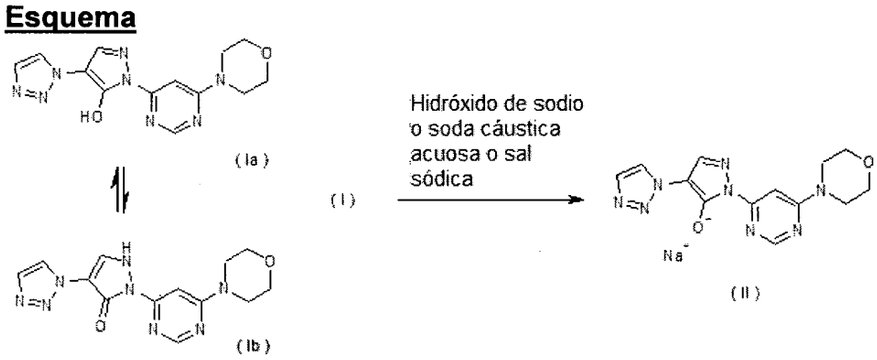
Como disolventes son adecuados los alcoholes de bajo peso molecular como por ejemplo metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, sec-butanol, iso-butanol, 1-pentanol, o tetrahidrofurano, o acetonitrilo, o tolueno, o 1,4-dioxano o mezclas de los disolventes mencionados, o mezclas de los disolventes indicados con agua. Preferentemente son metanol, etanol, 2-propanol, tetrahidrofurano o mezclas de los disolventes mencionados con agua. De preferencia especial son las mezclas de metanol con agua o etanol con agua en una relación entre 1 : 1 y 50 : 1 (v/v), de preferencia muy especial so las mezclas de metanol con agua en

una relación entre 7 : 3 y 30 : 1 (v/v).

Como bases orgánicas son adecuadas las aminas terciarias como por ejemplo trietilamina o diisopropiletilamina. Preferentemente es la trietilamina. La base orgánica se usa en una proporción de 0 a 4 equivalentes molares respecto del compuesto de fórmula (I). Preferentemente se usa la base orgánica en una proporción de 0,7 a 1,5 equivalentes molares respecto del compuesto de fórmula (I).

La preparación del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II) puede explicarse mediante el siguiente esquema de reacción:

Esquema



Explicaciones de las figuras:

Figura 1: Espectros IR del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)

Figura 2: Espectros Raman del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)

Figura 3: Espectros UV/VIS del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)

Figura 4: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (II)

Figura 5: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (I)

Figura 6: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (II)

Figura 7: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (I)

Figura 8: Espectro de masa del compuesto de fórmula (II)

Figura 9: Espectro de masa del compuesto de fórmula (I)

Figura 10: Difractograma de rayos X del compuesto de fórmula (II)

Figura 11: Difractograma de rayos X del compuesto de fórmula (I)

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención muestra un espectro de acción farmacológico valioso, no previsible. Por lo tanto, es adecuado para el uso como medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades en humanos y en animales.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención se distingue como inhibidor específico de las HIF-prolil-4-hidroxilasas.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención debido a sus propiedades farmacológicas puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades cardiovasculares, especialmente de insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, apoplejía, arterioesclerosis, hipertonía esencial, pulmonar y maligna así como también enfermedad oclusiva arterial periférica.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención por lo demás es adecuado para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos de la hematopoyesis, como p. ej. anemias idiopáticas, anemia renal y anemias concomitantes de una enfermedad tumoral (especialmente una anemia inducida por quimioterapia), de una infección (especialmente infección por VIH) u otra enfermedad inflamatoria, como p. ej. artritis reumatoidea. El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención por lo demás es adecuado para el tratamiento de apoyo de anemias a causa de pérdida de sangre, anemia por carencia de hierro, anemia por carencia de vitaminas (p.ej. a causa de carencia de vitamina B12 o a causa de carencia de ácido fólico), anemia hipoplásica y aplásica, anemia hemolítica o para el tratamiento de apoyo de anemias a causa de trastornos del metabolismo de hierro (anemia sideroacréstica) o anemias a causa de otros trastornos endocrinos (p. ej., hipotireosis).

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención además es adecuado para incrementar el hematocrito con el objeto de obtener sangre para la autodonación antes de intervenciones quirúrgicas.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención además puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de condiciones isquémicas causados por intervenciones quirúrgicas y sus secuelas después de intervenciones quirúrgicas, especialmente operaciones cardíacas usando una máquina cardiopulmonar (p. ej., intervenciones de bypass, implantes de válvulas cardíacas), intervenciones en las carótidas, intervenciones en la arteria aorta e intervenciones con apertura mediante instrumental o penetración de la calota craneal. El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención es adecuado además para el tratamiento general y/o la profilaxis en intervenciones quirúrgicas con la finalidad de acelerar la sanación de heridas y abreviar el tiempo de convalecencia.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención además es adecuado para el tratamiento y la profilaxis de secuelas de estados isquémicos agudos y prolongados del cerebro (p. ej., apoplejía, asfixia de parto).

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención además puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer y para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección del estado de salud que se manifiesta durante el tratamiento del cáncer especialmente después de la terapia con citoestáticos, antibióticos y radiación.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención es apropiado además para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades de tipo reumático y de otras formas de enfermedad que pertenecen a las enfermedades autoinmunes, y especialmente para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección del estado de salud que se manifiesta durante el tratamiento de tales enfermedades.

Por lo demás, el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención puede usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de afecciones oculares (p. ej., glaucoma), del cerebro (p. ej., Parkinson, Alzheimer, demencia, sensación dolorosa crónica), de enfermedades renales crónicas, de insuficiencia renal y de falla renal aguda, como también para ayudar a la curación de heridas.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención además es adecuado para el tratamiento y/o la profilaxis de una debilidad física general que incluso puede llegar

a la caquexia, que se manifiesta con mayor frecuencia a edad más avanzada.

Adicionalmente, el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención es adecuado para el tratamiento y/o la profilaxis de disfunción sexual.

Además el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención es adecuado para el tratamiento y/o la profilaxis de Diabetes mellitus y sus afecciones secundarias, como p. ej. Macro- y microangiopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía.

Por lo demás, el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención es adecuado para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades fibrósicas p. ej. del corazón, del pulmón y del hígado.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención también es especialmente adecuado para la profilaxis y el tratamiento de la retinopatía de los prematuros (Retinopathia praematurorum).

La presente invención proporciona además el uso del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II) para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes indicadas.

La presente invención proporciona además el uso del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II) para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes indicadas.

La presente invención proporciona además un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes indicadas usando una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (II).

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención puede usarse solo o en caso necesario en combinación con otros principios activos. La presente invención proporciona además medicamentos, que contienen el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención y uno o varios otros principios activos, especialmente para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades antes indicadas. Como principios activos adecuados para la combinación se indican preferentemente a

modo de ejemplo: inhibidores de ACE, antagonistas del receptor de angiotensina II, bloqueadores de beta receptores, antagonistas de calcio, inhibidores de PDE, antagonistas del receptor de corticoides minerales, diuréticos, aspirina, suplementos de hierro, suplementos de vitamina B12 y ácido fólico, estatinas, derivados de Digitalis (Digoxina), quimioterapéuticos tumorales como también antibióticos.

En una realización preferente de la invención, se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con inhibidor de ACE, como preferentemente y a modo de ejemplo enalapril, captopril, lisinopril, ramipril, delapril, fosinopril, quinopril, perindopril o trandopril.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un antagonista AII de angiotensina, como preferentemente y a modo de ejemplo losartán, candesartán, valsartán, telmisartán o embusartán.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un bloqueador de beta receptores, como preferentemente y a modo de ejemplo propranolol, atenolol, timolol, pindolol, alprenolol, oxprenolol, penbutolol, bupranolol, metipranolol, nadolol, mepindolol, carazalol, sotalol, metoprolol, betaxolol, celiprolol, bisoprolol, carteolol, esmolol, labetalol, carvedilol, adaprolol, landiolol, nebivolol, epanolol o bucindolol.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un antagonista de calcio, como preferentemente y a modo de ejemplo nifedipina, amlodipina, verapamilo o diltiazem.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE), como preferentemente y a modo de ejemplo milrinona, amrinona, pimobendan, cilostazol, sildenafilo, vardenafilo o tadalafilo.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un antagonista del receptor de corticoides minerales, como preferentemente y a modo de ejemplo espironolactona,

eplerenona, canrenona o canrenoato de potasio.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un diurético, como preferentemente y a modo de ejemplo furosemida, bumetanida, torsemida, bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclototiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, politiazida, triclorometiazida, clorotalidona, indapamida, metolazona, quinetazona, acetazolamida, diclorofenamida, metazolamida, glicerina, isosorbida, manitol, amilorida o triamtereno.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un inhibidor de HMG-CoA reductasa de la clase de las estatinas, como preferentemente y a modo de ejemplo lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, cerivastatina o pitavastatina.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un agente quimioterapéutico tumoral, como preferentemente y a modo de ejemplo del grupo de los complejos de platino, como p. ej. cisplatino y carboplatino, de los alquilantes, como p. ej. ciclofosfoamida y clorambucilo, de los antimetabolitos, como p. ej. 5-fluoruracilo y metotrexato, de los inhibidores de topoisomerasa, como p. ej. etoposida y camptotecina, de los antibióticos, como p. ej. doxorubicina y daunorubicina, o de los inhibidores de quinasa, como p. ej., sorafenib y sunitinib.

En una realización preferente de la invención se administra el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención en combinación con un antibiótico, como preferentemente y a modo de ejemplo del grupo de las penicilinas, cefalosporinas o quinolonas, como p. ej. ciprofloxacina y moxifloxacina.

La presente invención proporciona además medicamentos que contienen el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención, en general junto con uno o varios adyuvantes inertes, no tóxicos, adecuados para uso farmacéutico, como también su uso para los fines antes enunciados.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención puede presentar una acción sistémica y/o local. A este fin se lo puede aplicar de manera adecuada, como p. ej. por vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dérmica, transdérmica, conjuntiva, ótica o como implante o bien como prótesis endovascular.

Para estas vías de aplicación, el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención puede administrarse en formas de aplicación adecuadas.

Para la administración oral son adecuadas formas de aplicación eficientes de acuerdo con el estado de la técnica que liberan el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención de modo rápido y/o modificado, como p. ej. comprimidos (comprimidos recubiertos o no recubiertos, por ejemplo recubrimientos resistentes a jugos gástricos o de disolución lenta o con recubrimiento insolubles, que controlan la liberación del compuesto de acuerdo con la invención), comprimidos, obleas/láminas, liofilizados/láminas, cápsulas que se desintegran rápidamente en la cavidad bucal (por ejemplo, cápsulas de gelatina dura o blanda), grageas, granulados, pellets, polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones.

La administración por vía parenteral se puede realizar evitando el paso de absorción (p. ej., por vía intravenosa, intrarterial, intracardial, intraespinal o intralumbar) o usando la absorción (p. ej., por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Para la administración por vía parenteral son adecuadas entre otras las formas de aplicación con preparados inyectables o para infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Para otras vías de administración son adecuadas, p. ej. formas farmacéuticas para inhalación (entre otros, inhaladores en polvo, nebulizadores), gotas, soluciones o aerosoles nasales, comprimidos para uso lingual, sublingual o bucal, obleas/láminas o cápsulas, supositorios, preparados óticos u oculares, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas agitables), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (p. ej., parches),

leches, pastas, espumas, talco para espolvorear, implantes o prótesis endovasculares.

Preferentemente es la administración por vía oral o parenteral, especialmente la administración por vía oral y por vía intravenosa.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención puede ser transformado a las formas de aplicación indicadas. Ello puede suceder de un modo en sí conocido al mezclarlo con adyuvantes inertes, no tóxicos, adecuados para uso farmacéutico. Forman parte de estos adyuvantes entre otros sustancias portadoras (por ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), disolventes (p. ej., polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y agentes de dispersión o reticulación (por ejemplo dodecilsulfato de sodio, polioxisorbitanoleato), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizadores (p. ej., antioxidantes como por ejemplo ácido ascórbico), colorantes (p. ej., pigmentos inorgánicos, como por ejemplo óxidos de hierro) y sustancias mejoradoras del gusto y/o del olor.

En general resultó ventajoso administrar por vía parenteral cantidades de aproximadamente 0,001 a 1 mg/kg, de preferencia aproximadamente 0,01 a 0,5 mg/kg de peso corporal para lograr resultados efectivos. Para la aplicación por vía oral, la dosificación es aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, de preferencia aproximadamente 0,01 a 20 mg/kg y de preferencia muy especial de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal.

A pesar de ello, en su caso puede ser necesario apartarse de las cantidades indicadas y concretamente en relación con el peso corporal, la vía de aplicación, la reacción individual frente al principio activo, la forma y el momento de la preparación o bien el intervalo, en el que se realiza la aplicación. De esa manera, puede ser suficiente en algunos casos, administrar menos que la cantidad mínima antes indicada, mientras que en otros casos es necesario exceder el límite superior mencionado. En caso de aplicar cantidades más elevadas puede ser recomendable, distribuir estar en varias dosis individuales a lo largo del día.

Los ejemplos de realización indicados a continuación explican la invención. La invención no se limita a los ejemplos.

Los datos en porcentaje en los siguientes ensayos y ejemplos son, salvo indicación en contrario, porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Las proporciones de disolventes, de dilución y los datos de la concentración de las soluciones líquido/líquido en cada caso se refieren al volumen.

A. Ejemplos

Abreviaturas:

ACN	Acetonitrilo
bS	singulete ancho (en espectros RMN)
D	doblete (en espectros RMN)
DSC	calorimetría diferencial dinámica (Differential Scanning Calorimetry)
% en peso	porcentaje en peso
M	multiplete (en espectros RMN)
n.d.	no detectado
RMN	resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance)
hr	humedad relativa
S	singulete (en espectros RMN)
seg.	Segundos
T	triplete (en espectros RMN)
v/v	volumen/volumen
δ	oscilaciones de deformación
v	oscilaciones de elongación

Compuestos de partida:

Ejemplo 1A

Éster metílico del ácido 2-(1H-1,2,3-triazol-1-il)acrílico

Se disolvieron 450 g de éster etílico del ácido 2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acético en 3,5 l de metanol, se diluyó con 30 g de trietilamina y se agitó durante 16 h a 22 °C. A continuación se eliminaron por destilación al vacío todos los disolventes. Se obtuvieron 410 g del compuesto del título en forma de aceite.

Ejemplo 2A

Éster metílico del ácido 3-(Dimetilamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-il)acrílico

Se diluyeron 400 g de éster metílico del ácido 2-(1H-1,2,3-triazol-1-il)acrílico con

522 g de dimetilformamida-dimetilacetal y se calentaron hasta la ebullición. Se eliminaron por destilación las sustancias de bajo punto de ebullición que se formaban. Al cabo de 4 h se enfrió a 55 °C y se agregaron 1050 ml de ter-butiléter de metilo/ 2-propanol (3 : 1 v/v). La suspensión resultante se enfrió a 22 °C y se filtró. La torta de filtro se lavó varias veces con ter-butiléter de metilo y se secó al vacío a 40 °C. Se obtuvieron 493 g del compuesto del título como sólido.

Ejemplo 3A

1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-ol (forma enol; fórmula (Ia)) o bien 2-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1,2-dihidro-3H-pirazol-3-ona (forma ceto; fórmula (Ib))

Se mezclaron 20 g de 4-(6-hidrazinopirimidin-4-il)morfolino y 24,6 g de éster metílico del ácido (2E/Z)-3-(dimetilamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-il)acrílico en 210 ml de acetato de etilo con 5,84 g de ácido trifluoroacético y se agitó 24 h bajo reflujo. La suspensión resultante se enfrió a 0 °C y se filtró. La torta de filtro se lavó con acetato de etilo, se aspiró intensamente y después de esto en 160 ml de agua. La suspensión se ajustó mediante la adición de 4,5 ml de ácido acético a un valor aproximado de pH 5, se agitó otros 15 minutos y se filtró. La torta de filtro se lavó dos veces con 50 ml de agua y después de esto se secó al vacío a 40 °C. Rendimiento: 26,0 g (79,4 % del teórico) del compuesto del título.

La preparación de los compuestos 4-(6-hidrazinopirimidin-4-il)morfolin (Ejemplo Nº 16A), éster etílico del ácido 2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acético (Ejemplo Nº 39A) y éster etílico del ácido 3-(dimetilamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acrílico (Ejemplo Nº 3A) ya se describió en el documento WO 2008/067871.

La preparación del compuesto 2-(6-morfolin-4-ilpirimidin-4-il)-4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1,2-dihidro-3*H*-pirazol-3-ona a partir de 4-(6-hidrazinopirimidin-4-il)morfolina y éster etílico del ácido 3-(dimetilamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acrílico también se describió en el documento WO 2008/067871 (Ejemplo Nº 71).

Ejemplos de realización:

Ejemplo 1

1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico (compuesto de fórmula (II))

Ejemplo 1.1

Se suspendieron 10 g del compuesto del ejemplo 3A en 50 ml de metanol/agua (9 : 1 v/v). A la suspensión se añadió bajo agitación 3,4 g de soda cáustica al 45 % y se añadió además 50 ml de metanol/agua (9 : 1 v/v). La suspensión se calentó a 50 °C y se agitó durante 2 h a 50 °C. Después de esto se enfrió a 0 °C, se continuó agitando durante 1 h a 0 °C y se filtró. La torta de filtro obtenida se lavó con metanol/agua (9 : 1 v/v) y se secó. Rendimiento: 10,1 g del compuesto de fórmula (II); 6,8 % en peso de Na

Ejemplo 1.2

Se suspendieron 5 g del compuesto del ejemplo 3A en 60 ml de etanol/agua (1 : 1 v/v) y se diluyeron a 22 °C con 1,41 g de soda caústica al 45 %. La suspensión se agitó durante 3 días a 50 °C y durante 2 h a 20 °C. El sólido se separó por filtración, se lavó con 10 ml de agua y se secó. Rendimiento: 4 g del compuesto de fórmula (II).

Ejemplo 1.3

Se suspendieron 30,25 g del compuesto del ejemplo 3A en 150 ml metanol/agua (9 : 1 v/v) a 22 °C. Se añadieron 13,3 ml de trietilamina y la mezcla se calentó a 60 °C. Al cabo de 15 min se filtró la solución obtenida prácticamente clara, se lavó el filtro con 10 ml de metanol/agua (9 : 1 v/v) y se mezcló el producto filtrado recolectado a 60 °C lentamente con 10,3 g de soda cáustica al 45 %. La suspensión resultante se mezcló con poca cantidad de cristales del compuesto de fórmula (II), se continuó agitando durante 1 h a 60 °C, después de esto se enfrió lentamente a 0 °C y se filtró. La torta de filtro se lavó con 15 ml de metanol/agua (9 : 1 v/v) y se secó al vacío a 40 °C. Rendimiento: 25,1 g del compuesto de fórmula (II).

Ejemplo 1.4

Se suspendieron 25 g del compuesto del ejemplo 3A en 150 ml de metanol/agua (1 : 1 v/v) y se mezcló con 11 ml de trietilamina. La solución obtenida se calentó a

60 °C y se mezcló con 8,5 g de soda cáustica al 45 %. La suspensión resultante se enfrió lentamente a 22 °C, se agitó durante 2 h a 22 °C y después de esto 1 h a 0-5 °C. Después de la filtración se lavó la torta de filtro con 15 ml de metanol/agua (1 : 1 v/v) y se secó al vacío a 40 °C. Rendimiento: 26 g del compuesto de fórmula (II).

Calorimetría diferencial dinámica (DSC):

Los termogramas se obtuvieron usando un calorímetro de barrido diferencial DSC 7 o bien Pyris-1 y un dispositivo para el análisis termogravimétrico TGA 7 de la empresa Perkin-Elmer.

Calorímetro de barrido diferencial DSC 7 o bien Pyris-1; fabricante: Perkin-Elmer; velocidad de calentamiento: 2 y 20 K/min: gas de barrido: nitrógeno; crisol: crisoles de aluminio no herméticos al gas; preparación de muestras: ninguna.

Dispositivo para el análisis termogravimétrico TGA 7; fabricante: Perkin-Elmer; velocidad de calentamiento: 10 $Kmin^{-1}$; gas de barrido: nitrógeno, 20-30 ml/min; crisol: crisol de platino abierto; preparación de muestras: ninguna.

El 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico (compuesto de fórmula (II)) se disgrega a una temperatura superior a los 300 °C sin fundirse.

Adsorción y desorción de vapor de agua:

La isotérmica de absorción de humedad se registró con un dispositivo analizador de vapor *Dynamic Vapour Sorption Analyzer* IGA Sorp de la empresa Hiden Analytical. La temperatura de medición fue de 25 °C. No hubo ninguna preparación de muestras.

Tabla 1: adsorción y desorción de vapor de agua de 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico (compuesto de fórmula (II))

	Compuesto de fórmula (II)		Compuesto de fórmula (I)	
Humedad ambiente relativa	Adsorción	Desorción	Adsorción	Desorción
0 % hr	0 %	0 %	0,1 %	0,1 % (5 %
10 % hr	0 %	0 %	0,2 %	0,1 %

20 % hr	0,1 %	0 %	0,3 %	0,2 %
30 % hr	0,1 %	0,1 %	4,8 %	4,7 %
40 % hr	0,2 %	0,2 %	5,1 %	5,2 %
50 % hr	0,2 %	0,3 %	5,3 %	5,4 %
60 % hr	0,2 %	0,3 %	5,4 %	5,6 %
70 % hr	0,4 %	0,4 %	5,6 %	5,6 %
80 % hr	0,4 %	0,5 %	5,7 %	5,7 %
90 % hr	0,8 %	0,8 %	5,9 %	5,9 %

Datos de solubilidad:

Procedimiento: Se prepararon soluciones saturadas de la sustancia de ensayo mediante la agitación durante 16 horas de una suspensión en agua a 25 °C. Las suspensiones obtenidas después se filtraron y se determinó el contenido en el filtrado mediante medición por HPLC.

Tabla 2: Solubilidad en agua

	Compuesto de fórmula (II)	Compuesto de fórmula (I)
Solubilidad en agua a 25 °C [mg/100ml]	2800	14,3

Espectroscopia IR y Raman:

Para la medición de las espectroscopias IR y Raman del compuesto de fórmula (II) se usaron espectrómetros FT/IR IFS 66v de Bruker y espectrómetros FT/Raman MultiRAM de Bruker con los siguientes parámetros:

	IR	**Raman**
Resolución espectral	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Número de mediciones individuales (escaneos)	32	64
Intervalo del número de ondas	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 200 cm^{-1}
Preparación de muestras	comprimido KBr	ninguna

Tabla 3: Asignación de bandas de oscilación características en los espectros IR o bien Raman del compuesto de fórmula (II)

Elemento estructural	Ubicación de bandas IR (cm^{-1})	Ubicación de bandas Raman (cm^{-1})
ν =C-H	3153 – 3006	3153 – 3010
ν C-H	2976 – 2855	2978 – 2856
ν C=C, ν C=N	1630 – 1439	1623 – 1401

ν C-N	1241	1244
ν C-O	1112	1118
δ =C-H $_{en\ fase}$	987	988

Para la medición de espectros IR y Raman del compuesto de fórmula (I) se usaron espectrómetros FT/IR Vertex 80v de Bruker y espectrómetros FT/Raman MultiRAM de Bruker con los siguientes parámetros:

	IR	**Raman**
Resolución espectral	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Número de mediciones individuales (escaneos)	32	64
Intervalo del número de ondas	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 100 cm^{-1}
Preparación de muestras	comprimido KBr	ninguna

Tabla 4: Asignación de bandas de oscilación características en los espectros IR o bien los espectros Raman del compuesto de fórmula (I)

Elemento estructural	Ubicación de bandas IR (cm^{-1})	Ubicación de bandas Raman (cm^{-1})
ν O-H	3441	-
ν =C-H	3135 – 3108	3134 – 3006
ν C-H	2965 – 2884	2967 – 2884
ν C=C, ν C=N, δ C-H	1636 – 1345	1650 – 1345
ν C-$O_{éter}$	1257	1259

Espectroscopia UV/VIS:

Los espectros UV/VIS se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer (Lambda 40P) con las siguientes condiciones o bien parámetros:

Cubeta: longitud de pasaje 1 cm; vidrio de cuarzo

Rango de cantidad de ondas: 200 - 800 nm

Ranura de apertura: 1 nm

Preparación de muestras: aprox. 1 mg/100 ml de acetonitrilo/agua 1:1

Bandas: 285; 249 nm de compuesto de fórmula (II) y 289,3; 248,2 nm de compuesto de fórmula (I)

Tabla 5: Cálculo de la absorción específica y del coeficiente de absorción molar

Compuesto de fórmula	Disolvente	Longitud de onda (nm)	Absorción específica $A^{1\%}_{1cm}$ (litro/g * cm)	Coeficiente de absorción molar ε (litro/mol * cm)

(I)	acetonitrilo/ agua 1:1	249	1111	34928
(II)	acetonitrilo/ agua 1:1	284	501,2	16855

Espectroscopia RMN:

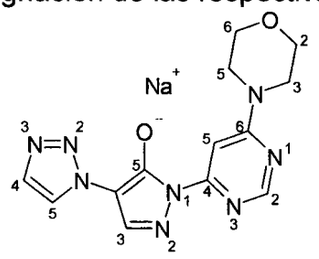
Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro RMN (Advance) de Bruker en las siguientes condiciones o bien parámetros:

Compuesto de fórmula (II)	Espectro ^{1}H RMN	Espectro ^{13}C-RMN
Frecuencia de trabajo	500,13 MHz	125,76 MHz
Disolvente	ácido trifluoroacético	ácido trifluoroacético
Concentración	6,84 mg/ml	42,7 mg/ml
Estándar interno	tetrametilsilano (TMS)	tetrametilsilano (TMS)
Diámetro del tubito de ensayo	5 mm	5 mm
Temperatura	25 °C	25 °C
Técnica	Técnica de transformada de Fourier	Técnica de transformada de Fourier
Ancho espectral	20,65 ppm	245,41 ppm
Resolución digital	0,079 Hz/Pt	0,4710 Hz/Pt
Duración del pulso	2,83 µsec, 30° ángulo de excitación	9,1 µsec, 90° ángulo de excitación
Tiempo de absorción	6,399 sec	1,06 sec
Tiempo de relajación	0,5 sec	4 sec
Número de caídas libres de inducción	32	128

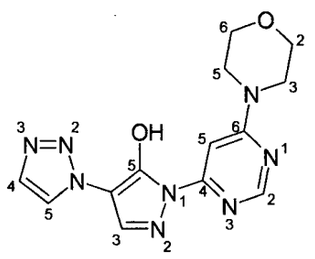
Compuesto de fórmula (I)	Espectro ^{1}H RMN	Espectro ^{13}C RMN
Frecuencia de trabajo	500,13 MHz	125,76 MHz
Disolvente	Dimetilsulfóxido-d_6 (DMSO)	Dimetilsulfóxido-d_6 (DMSO)
Concentración	6,3 mg/ml	35,8 mg/ml
Estándar interno	tetrametilsilano (TMS)	tetrametilsilano (TMS)
Diámetro del tubito de ensayo	5 mm	5 mm
Temperatura	25 °C	27 °C
Técnica	Técnica de transformada de Fourier	Técnica de transformada de Fourier
Ancho espectral	20,65 ppm	240,89 ppm
Resolución digital	0,079 Hz/Pt	0,9248 Hz/Pt
Duración del pulso	3,1 µsec, 30° ángulo de	7,0 µsec, 90° ángulo de

	excitación	excitación
Tiempo de absorción	6,344 sec	1,08 sec
Tiempo de relajación	0,5 sec	4 sec
Número de caídas libres de inducción	32	1024

Fórmulas estructurales del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I) con asignación de las respectivas señales RMN



(II)



(I)

Tabla 6: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (II) - desplazamiento químico, multiplicidad de señal, número relativo de protones (la numeración de los átomos H se refiere a la fórmula estructural para la asignación de las respectivas señales RMN)

Átomos H	Desplazamiento químico δ (ppm)	Multiplicidad y constante de acoplamiento	Número de los protones /molécula
1-[6-(morfolin-4-il)			
H-2; H-3; H-5; H-6	4,00-4,25	M	8
pirimidin-4-il]-			
H-2	8,72	S	1
H-5	7,77	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-			
H-4	8,64	D J= 1,4 Hz	1
H-5	8,98	D J= 1,4 Hz	1
1H-pirazol-5-olato sódico			
H-3	8,68	S	1

Tabla 7: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (I) - desplazamiento químico, multiplicidad de señal, número relativo de protones (la numeración de los átomos H se refiere a la fórmula estructural para la asignación de las respectivas señales RMN)

Átomos H	Desplazamiento	Multiplicidad y	Número de los

	químico δ (ppm)	constantes de acoplamiento	protones /molécula
1-[6-(morfolin-4-il)			
H-2; H-3; H-5; H-6	3,71	S	8
pirimidin-4-il]-			
H-2	8,55	S	1
H-5	7,42	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-			
H-4	7,86	D (0,6Hz)	1
H-5	8,38	D (0,6Hz)	1
1H-pirazol-5-ol			
H-3	8,27	S	1
5-OH	n.d. (c)	n,d,	1

Tabla 8: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (II) - desplazamiento químico, multiplicidad de señal, número relativo de núcleos C en el compuesto de fórmula (II) (la numeración de los átomos C se refiere a la fórmula estructural para la asignación de las respectivas señales RMN)

Átomos C	Desplazamiento químico δ (ppm)	Multiplicidad y constantes de acoplamiento	Número de núcleos C / molécula
1-[6-(morfolin-4-il)			
C-2; C-6	67,80	T	2
C-3; C-5	48,21	T	2
pirimidin-4-il]-			
C-2	151,65	D	1
C-4	152,01	S	1
C-5	91,48	D	1
C-6	159,90	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-			

C-4	130,93	D	1
C-5	129,57	D	1
1H-pirazol-5-olato sódico			
C-3	138,03	D	1
C-4	106,99	S	1
C-5	157,43	S	1

Tabla 9: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (I) - desplazamiento químico, multiplicidad de señal, número relativos de núcleos C en el compuesto de fórmula (I) (la numeración de los átomos C se refiere a la fórmula estructural para la asignación de las respectivas señales RMN)

Átomos C	Desplazamiento químico δ (ppm)	Multiplicidad y constantes de acoplamiento	Número de los núcleos C /molécula
1-[6-(morfolin-4-il			
C-2; C-6	65,56	T	2
C-3, C-5	44,29	T	2
pirimidin-4-il]-			
C-2	154,08	D	1
C-4	152,43	S	1
C-5	85,62	D	1
C-6	161,99	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-			
C-4	132,94	D	1
C-5	123,68	D	1
1H-pirazol-5-ol			
C-3	135,84	D	1
C-4	102,82	S	1
C-5	154,70	S	1

Espectroscopia de masa:

El espectro de masa se registró en un espectrómetro de masa de Waters (ZQ) en las condiciones o bien parámetros indicados a continuación:

Procedimientos de ionización	ESI (Electronic Spray Ionization)
Disolvente	acetonitrilo / agua

Tabla 10: Interpretación del espectro de masa del compuesto de fórmula (II)

		Número de masa (MZ)
Formación de iones M+H	C13H14N8O2 + H	315
Formación de iones M+Na	C13H14N8O2 + Na	337

Tabla 11: Interpretación del espectro de masa del compuesto de fórmula (I)

		Número de masa (MZ)
Formación de iones M+H	C13H15N8O2	315

Análisis elemental:

Tabla 12: Resultados del análisis elemental del compuesto de fórmula (II)

Elemento	medido (%)	calculado (%)	diferencia (%)
C	46,1	46,4	0,3
H	4,0	3,9	0,1
N	33,1	33,3	0,2

Tabla 13: Resultados del análisis elemental del compuesto de fórmula (I)

Elemento	medido (%)	calculado (%)	diferencia (%)
C	49,5	49,7	0,2
H	4,4	4,5	0,1
N	35,5	35,7	0,2
O	12,6	10,2	2,4

Difractometría de rayos X:

Difractómetro de transmisión PANalytical X'Pert PRO con contador PIXcel

(Multichannel):

Radiación:	cobre, K alfa
Monocromador primario:	espejo de rayos X para focalización
Longitud de onda (K1):	1,5406 Å
Longitud de onda (K2):	1,5444 Å
Parámetros del generador:	40 kV, 40 mA
Rango de medición:	2-38°
Condiciones ambientales:	25 °C, 40 – 60 % hr

o bien

sistema de difracción de polvo STOE:

Difractómetro:	transmisión
Monocromador:	germanio curvado (111)
Generador :	45 kV, 35 mA
Longitud de onda:	1.540598 Cu
Detector:	PSD lineal
Modo de escaneo:	transmisión/ PSD móvil / omega fijo
Tipo de escaneo:	2Theta:Omega
Condiciones ambientales:	25 °C, 40 – 60 % hr

Tabla 14: Difractometría de polvo por rayos X del compuesto de fórmula (II)

Compuesto de fórmula (II) Reflejos [2 Theta]	
5,7	23,6
11,5	25,3
13,2	26,4
13,7	26,9
15,8	27,7
16,4	27,7
18,4	29,4

Compuesto de fórmula (II) Reflejos [2 Theta]	
18,9	29,9
19,3	30,0
21,0	30,7
22,0	31,5
23,1	31,6

Tabla 15: Difractometría de polvo por rayos X del compuesto de fórmula (I)

Compuesto de fórmula (I) Reflejos [2 Theta]	
5,6	24,6
14,4	24,8
14,9	25,1
16,3	26,3
16,5	26,8
17,6	28
17,8	28,5
18,2	29
18,5	29,9
19	32,4
19,7	32,7
21,6	33,2
22	33,8
22,4	34,7
22,9	35,7
24	36,4
24,5	36,7

B. Evaluación de la efectividad farmacológica

Las propiedades farmacológicas de los compuestos de acuerdo con la invención se pueden mostrar en los siguientes ensayos:

Abreviaturas:

DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
FCS	suero fetal de ternero
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano

1. Ensayos *in vitro* para la determinación de la actividad y la selectividad de los inhibidores de HIF-prolil-4-hidroxilasa

1.a) Inhibición de la actividad de la HIF-prolilhidroxilasa:

La HIF hidroxilada se enlaza específicamente con el complejo-C de Hippel-Lindau proteína-elongina B-elongina (complejo VBC). Esta interacción sólo se produce cuando la HIF está hidroxilada en un radical prolilo conservado. Constituye la base para la determinación bioquímica de la actividad de la HIF-prolilhidroxilasa. El ensayo se describe en la forma descrita [Oehme F., Jonghaus W., Narouz-Ott L., Huetter J., Flamme I., *Anal. Biochem.* **330** (1), 74-80 (2004)]:

Se incubó una placa de microtitulación clara de 96 cavidades recubierta con NeutrAvidin HBC (empresa Pierce) durante 30 minutos con caseína bloqueante. Después de esto se lavó la placa tres veces con cada vez 200 µl de tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, caseína bloqueante 10 % (v/v), 0,05 % (v/v) Tween 20) por cavidad: El péptido biotina-DLDLEMLAPYIPMDDDFQL (empresa Eurogentec, 4102 Seraing, Bélgica) se agrega en una concentración de 400 nM en 100 µl de tampón de lavado. Este péptido se usa como sustrato para la hidroxilación de prolilo y se une a la placa de microtitulación. Después de 60 minutos de incubación se lava la placa tres veces con tampón de lavado, se incuba durante 30 minutos con biotina 1 mM en caseína bloqueante y a continuación se lava tres veces con tampón de lavado.

Para realizar las reacciones de la prolilhidroxilasa, se incuba al sustrato de péptido

ligado a la placa durante 1 a 60 minutos con un lisato celular que contiene prolilhidroxilasa. Las reacciones se producen en 100 µl de tampón de reacción (Tris 20 mM, pH 7,5, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 2-oxoglutarato 1 µM–1 mM, $FeSO_4$ 10 µM, ascorbato 2 mM) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción además contiene el inhibidor de la prolilhidroxilasa en diferentes concentraciones. La sustancia de ensayo se usa preferentemente, pero no exclusivamente en concentraciones entre 1 nM y 100 µM. Mediante el lavado triple de la placa con el tampón de lavado se detienen las reacciones.

Para la determinación cuantitativa de la hidroxilación de prolilo se adiciona una proteína de fusión, que contiene tanto la tioredoxina a partir de E. coli como también el complejo VBC, en 80 µl de tampón de enlace (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM). Al cabo de 15 minutos se añaden 10 µl de una solución de anticuerpo anti-tioredoxina policlonal de conejo en tampón de enlace. Después de otros 30 minutos se adiciona 10 µl de una solución de inmunoglobulina anti-conejo acoplada con peroxidasa de rábano picante en tampón de enlace. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se lava tres veces con tampón de lavado para eliminar el complejo VBC sin ligar y anticuerpos. Para determinar la cantidad de complejo VBC ligado, se incuba durante 15 minutos con TMB. La reacción cromática se finaliza con la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M. Al medir la densidad óptica a 450 nm se determina la cantidad de complejo VBC enlazado. Es proporcional a la cantidad de prolina hidroxilada en el sustrato péptido.

Para la detección de la hidroxilación de prolilo se puede usar alternativamente un complejo VBC acoplado con europio (empresa Perkin Elmer). En ese caso se determina la cantidad de complejo VBC ligado mediante fluorescencia resuelta en el tiempo. Además es posible usar complejo VBC marcado con [^{35}S]-metionina. Para ello el complejo VBC con marcación radioactiva puede prepararse mediante la transcripción traslación *in vitro* en lisato de reticulocitos.

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención inhibe la actividad de la HIF-prolilhidroxilasa en este ensayo con un valor IC_{50} de 0,47 µM (valor medio

para EGLN2/PHD1) o bien 0,14 µM (valor medio para EGLN1/PHD2).

1.b) Ensayo *in vitro* celular, funcional:

La cuantificación de la efectividad del compuesto de acuerdo con la invención se realiza mediante una línea celular recombinante. La célula se deriva originariamente de una línea celular de carcinoma pulmonar humano (A549, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, EE.UU.). La línea celular de ensayo se transforma de manera estable con un vector que contiene el gen reportero de la *Photinus piralis*-luciferasa (denominado en adelante luciferasa) bajo el control de un promotor mínimo artificial. El promotor mínimo se compone de dos elementos responsables de la hipoxia corriente arriba de la caja TATA [Oehme F., Ellinghaus P., Kolkhof P., Smith T.J., Ramakrishnan S., Hütter J., Schramm M., Flamme I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296** (2), 343-9 (2002)]. Bajo la acción de la hipoxia (p. ej., cultivo en presencia del 1 % de oxígeno durante 24 horas) o bajo la acción de inhibidores de dioxigenasa no selectivos (p. ej., desferroxamina en una concentración de 100 µM, cloruro de cobalto en una concentración de 100 µM o éster dietílico de *N*-oxalilglicina en una concentración de 1 mM) la línea celular de ensayo produce luciferasa, que puede ser detectada y cuantificada con ayuda de reactivos de bioluminiscencia adecuados (p. ej., Steady-Glo® Luciferase Assay System, Promega Corporation, Madison, WI 53711, EE.UU.) y de un luminómetro adecuado.

Desarrollo del ensayo: Las células se colocan el día previo al ensayo en una cantidad exacta de medio de cultivo (DMEM, 10 % FCS, glutamina 2 mM) en una placa de microtitulación de 384 o 1536 cavidades y se mantienen en un incubador de células (96 % humedad ambiental, 5 % v/v CO_2, 37 °C). El día del ensayo se adicionan al medio de cultivo las sustancias de ensayo en concentraciones escalonadas. En preparados que se usan como control negativo no se agrega ninguna sustancia de ensayo a las células. Como control positivo para determinar la sensibilidad de la célula a los inhibidores se adiciona p. ej. desferroxamina en concentraciones finales de 100 µM. De 6 a 24 horas después de pasar las

sustancias de ensayo a las cavidades de la placa de microtitulación se mide la señal lumínica resultante en el luminómetro. Mediante los valores de medición se elabora una relación dosis-efecto que se usa como base para la determinación de las concentraciones efectivas de la mitad del máximo (denominado valor EC_{50}).

El compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención presenta en el ensayo aquí descrito un valor EC_{50} de 7 µM.

1.c) Ensayo *in vitro* celular, funcional para modificar la expresión génica:

Para estudiar la modificación de la expresión de ARNm específicos en líneas celulares humanas después del tratamiento con sustancias de ensayo, se cultivan las siguientes líneas celulares en placas de 6 o 24-cavidades: células de hepatoma humano (HUH, JCRB Cell Bank, Japón), fibroblastos renales embrionales humanos (HEK/293, ATCC, Manassas, VA 20108, EE.UU.), células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC, Manassas, VA 20108, EE.UU.), células endoteliales de venas de cordón umbilical (HUVEC, Cambrex, East Rutherford, New Jersey 07073, EE.UU.). Al cabo de 24 horas después de la adición de las sustancias de ensayo se lavan las células con solución salina con tampón de fosfato y de ellas se obtiene el ARN total usando un procedimiento adecuado (p. ej., reactivo Trizol®, Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Alemania).

Para un experimento de análisis típico se produce la digestión con DNasa I de 1 µg por vez del ARN total obtenido de ese modo y se traduce usando una reacción de transcriptasa inversa adecuada (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega Corporation, Madison, WI 53711, EE.UU.) en un ADN complementario (DNAc). Se usa en cada caso 2,5 % del preparado de ADNc así obtenido para la reacción en cadena de polimerasa. El nivel de expresión del ARNm de los genes a estudiar se analiza mediante la *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* **6** (10), 986-94 (1996)] usando un instrumento de detección de secuencia ABI Prism 7700 (empresa Applied Biosystems, Inc.). Las combinaciones de sondas primer usadas para ello se generan mediante el software Primer Express 1.5 (empresa Applied Biosystems, Inc.). En

detalle se analizan los ARNm de eritropoyetina, carboanhidrasa IX, lactato deshidrogenasa A y el factor de crecimiento de endotelio vascular.

2. Ensayos *in vivo* para la comprobación del efecto en el sistema cardiovascular

2.a) Ensayo *in vivo* para modificar la expresión génica:

Se administra a ratones o a ratas los compuestos de ensayo disueltos con disolventes adecuados, ya sea por vía oral mediante administración por sonda esofágica, o por vía intraperitoneal o intravenosa. Las dosificaciones típicas son 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 300 mg de sustancia por peso corporal y administración. A los animales de control solo se les administró disolvente. A las 4, 8 o 24 horas después de la administración de la sustancia de ensayo se sacrificó a los animales con una sobredosis de isoflurano y a continuación con rotura de cuello y se retiraron los órganos a analizar. Algunas partes de los órganos se congelaron súbitamente en nitrógeno líquido. De las partes de órganos se obtiene ARN total tal como se describió en B.1.a) y se traduce ese en un ADNc. El nivel de expresión del ARNm de los genes a analizar se estudia mediante la *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* **6** (10), 986-94 (1996)] empleando un instrumento de detección de secuencia ABI Prism 7700 (empresa Applied Biosystems, Inc.).

La sustancia de acuerdo con la presente invención en comparación con el control con placebo después de la administración oral o parenteral, produce un aumento significativo, dependiente de la dosis, del ARNm de la eritropoyetina en el riñón.

2.b) Determinación del nivel de eritropoyetina en suero:

A los ratones o a las ratas se les administra la sustancia de ensayo en un disolvente adecuado ya sea por vía intraperitoneal u oral una o dos veces por día. Las dosificaciones típicas son 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 300 mg de sustancia por peso corporal y administración. A los animales de control solo se les administró disolvente. Antes de la aplicación y cuatro horas después de la última administración de la sustancia se realiza a los animales bajo una anestesia breve una extracción de

sangre del plexo venoso retro orbital o de la vena de la cola. Mediante la adición de heparina de litio se evita la coagulación de la sangre. Se obtiene plasma sanguíneo mediante centrifugación. En el plasma sanguíneo se determina el contenido de eritropoyetina usando un ensayo ELISA para eritropoyetina (Quantikine® mouse Epo Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de medición se convierten en pg/ml usando una medición de referencia realizada para eritropoyetina de ratón.

La sustancia de acuerdo con la presente invención después de la administración oral o parenteral, produce un aumento significativo, dependiente de la dosis, de la eritropoyetina plasmática respecto del valor inicial y del control con placebo.

2.c) Determinación de la composición celular de la sangre periférica:

A los ratones o a las ratas se les administra la sustancia de ensayo en un disolvente adecuado ya sea por vía intraperitoneal u oral una o dos veces por día durante varios días. Las dosificaciones típicas son 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 300 mg de sustancia por peso corporal y administración. A los animales de control solo se les administró disolvente. Al final del ensayo se realiza a los animales bajo una anestesia breve una extracción de sangre del plexo venoso retro orbital o de la vena de la cola y se evita la coagulación mediante la adición de citrato de sodio. En un equipo de medición electrónico adecuado se determina en las muestras de sangre las concentraciones de eritrocitos, leucocitos y trombocitos. Las concentraciones de los reticulocitos se determinan al realizar frotis de sangre que se colorean con una solución colorante adecuada para ello (empresa KABE Labortechnik, Nümbrecht), mediante análisis microscópico de 1000 eritrocitos por vez. Para la determinación del hematocrito se extrae sangre del plexo venoso retro orbital usando un capilar para hematocrito y se lee en forma manual el valor del hematocrito después de centrifugar los capilares en una centrífuga adecuada para ello.

La sustancia de acuerdo con la presente invención después de la administración oral o parenteral, produce un aumento significativo, dependiente de la dosis, del hematocrito, del número de eritrocitos y de los reticulocitos respecto del valor inicial y

del control con placebo.

C. Ejemplos de realización para composiciones farmacéuticas

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser transformadas de la siguiente manera en preparaciones farmacéuticas:

Comprimido:

Composición:

100 mg del compuesto de acuerdo con la invención, 50 mg de lactosa (monohidrato), 50 mg de almidón de maíz (nativo), 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP 25) (empresa BASF, Ludwigshafen, Alemania) y 2 mg de estearato de magnesio.

Peso del comprimido 212 mg. Diámetro 8 mm, radio de curvatura 12 mm.

Preparación:

La mezcla del compuesto de acuerdo con la invención, lactosa y almidón es granulada con una solución al 5 % (m/m) de la PVP en agua. El granulado se mezcla después del secado con el estearato de magnesio durante 5 minutos. Esta mezcla se comprime con una prensa usual para comprimidos (para el tamaño del comprimido, ver arriba). Como valor de referencia para la compresión se usa una fuerza de prensado de 15 kN.

Suspensión de aplicación oral:

Composición:

1000 mg del compuesto de acuerdo con la invención, 1000 mg de etanol (96 %), 400 mg de Rhodigel® (goma de xantano de la empresa FMC, Pennsilvania, EE.UU.) y 99 g de agua.

Una dosis individual de 100 mg del compuesto de acuerdo con la invención equivale a 10 ml de suspensión oral.

Preparación:

Se suspende el Rhodigel en etanol, se agrega el compuesto de acuerdo con la invención a la suspensión. Se agrega agua bajo agitación. Hasta finalizar el hinchamiento del Rhodigel se continúa agitando durante aproximadamente 6 h.

Solución de aplicación oral:

Composición:

500 mg del compuesto de acuerdo con la invención, 2,5 g de polisorbato y 97 g de polietilenglicol 400. Una dosis individual de 100 mg del compuesto de acuerdo con la invención equivalen a 20 g de solución oral.

Preparación:

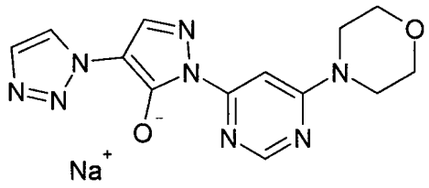
Se suspende el compuesto de acuerdo con la invención en la mezcla de polietilenglicol y polisorbato bajo agitación. El procedimiento de agitación se continúa hasta la completa disolución del compuesto de acuerdo con la invención.

Solución i.v.:

Se disuelve el compuesto de acuerdo con la invención en una concentración inferior a la solubilidad de saturación en un disolvente fisiológicamente compatible (p. ej., solución salina isotónica, solución de glucosa al 5 % y/o solución de PEG 400 al 30 %). La solución se filtra de forma estéril y se envasa en viales para inyección estériles y libres de pirógenos.

Reivindicaciones

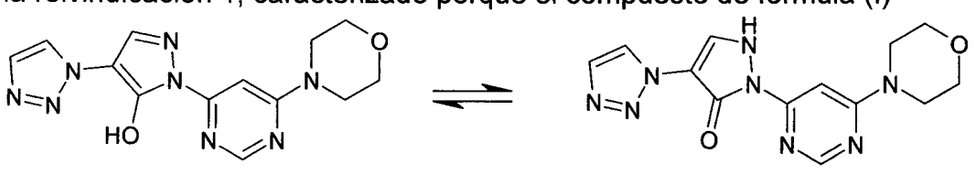
1. 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico de acuerdo con el compuesto de fórmula (II)



(II)

2. Compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de fórmula (II) se presenta en forma cristalina.

3. Procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I)



(Ia) (I) (Ib)

se hace reaccionar en un disolvente con hidróxido de sodio o soda cáustica acuosa o una sal sódica, en su caso con la adición de una base.

4. Procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) se hace reaccionar en un disolvente con soda cáustica acuosa, en su caso con la adición de una base.

5. Procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) se hace reaccionar en un disolvente con soda cáustica acuosa, con la adición de trietilamina.

6. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades.

7. Uso del compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades.

8. Uso del compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades cardio-circulatorias, insuficiencia cardíaca, anemia, enfermedades renales crónicas e insuficiencia renal.

9. Medicamento que contiene el compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 en combinación con un adyuvante inerte, no tóxico, adecuado para uso farmacéutico .

10. Medicamento que contiene el compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 en combinación con otro principio activo.

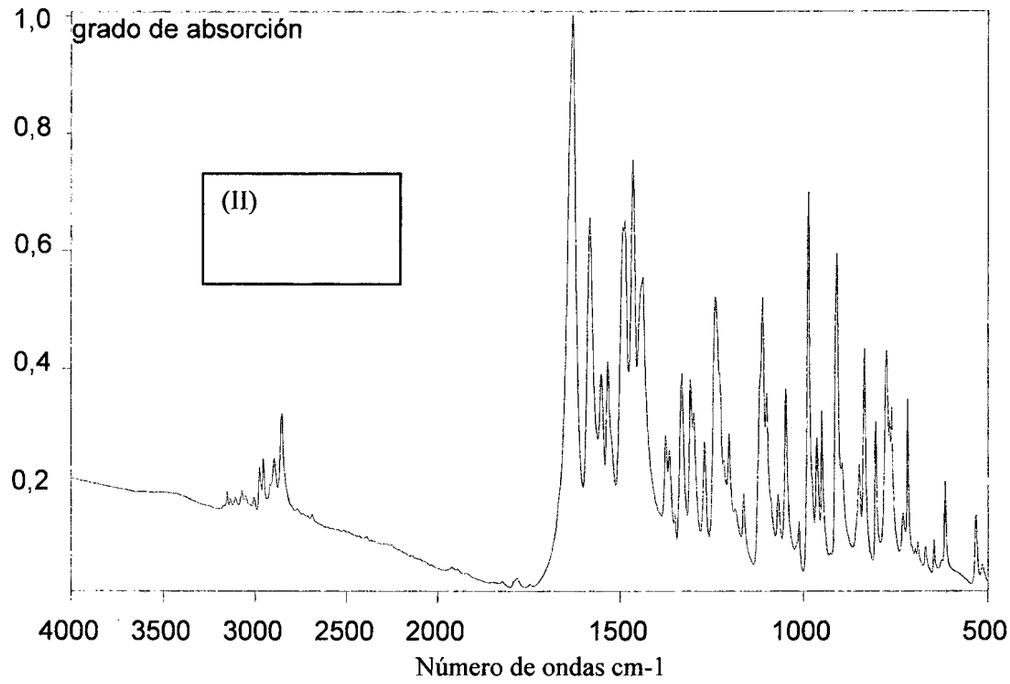
11. Medicamento de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10 para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades cardio-circulatorias, insuficiencia cardíaca, anemia, enfermedades renales crónicas e insuficiencia renal.

1H-pirazol-5-olato sódico sustituido

Resumen

La presente solicitud se refiere a 1-[6-(morfolin-4-il)pirimidin-4-il]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-il)-1H-pirazol-5-olato sódico, a procedimientos para su preparación, su uso para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades como también su uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades, especialmente de enfermedades cardiovasculares y hematológicas, de enfermedades renales como también para ayudar a la curación de heridas.

Figura 1: Espectros IR del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)



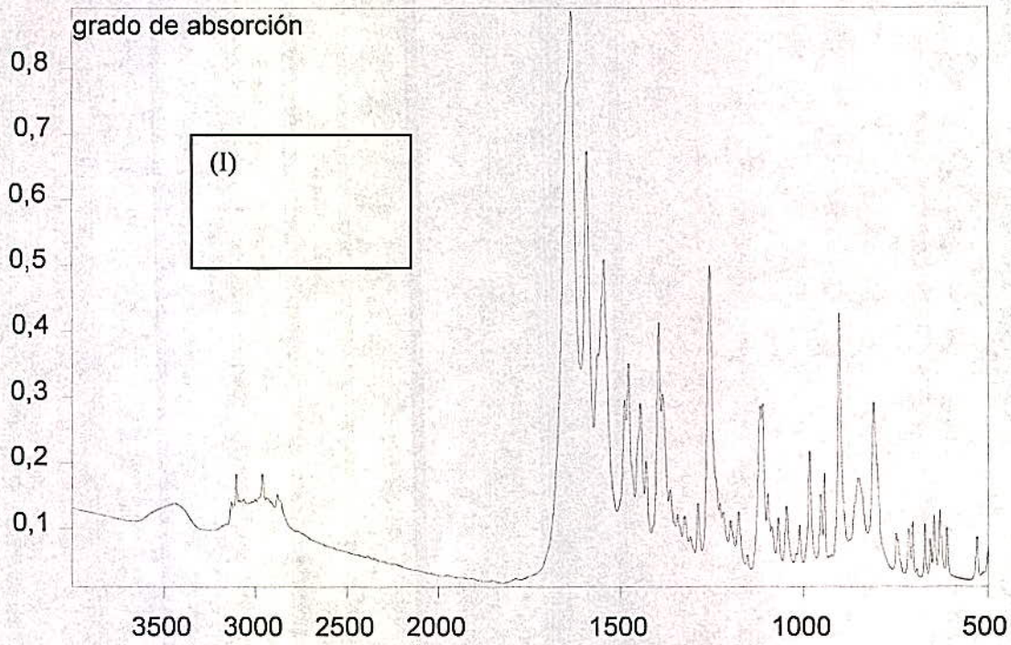
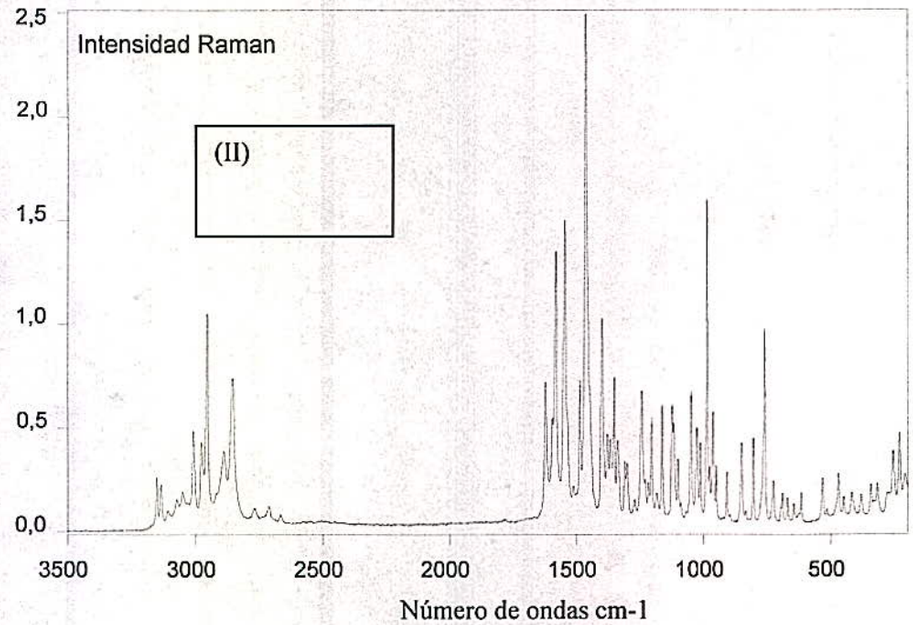

grado de absorción
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
(I)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Número de ondas cm-1

Figura 2: Espectros Raman del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)



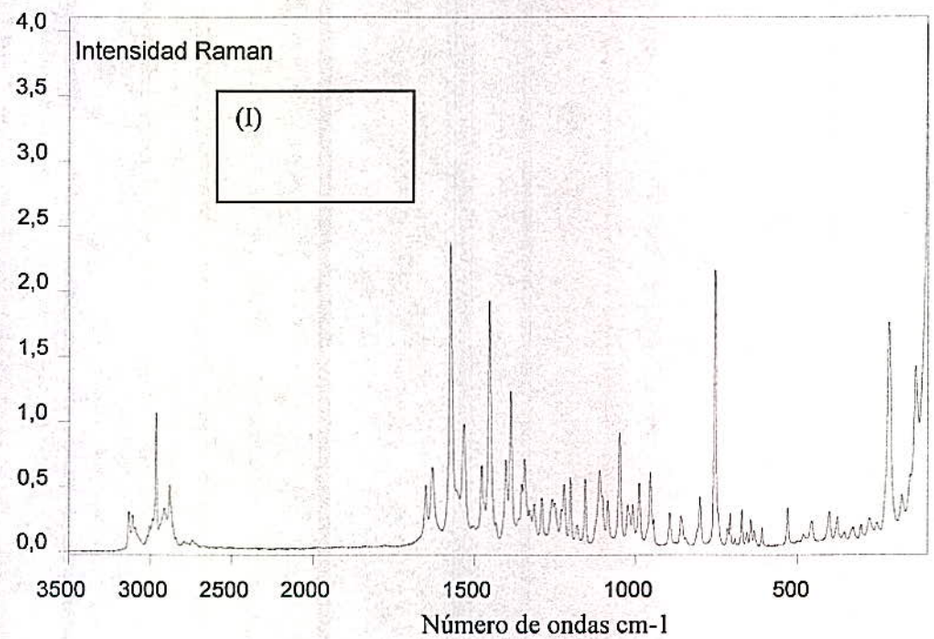


Figura 3: Espectros UV/VIS del compuesto de fórmula (II) y del compuesto de fórmula (I)

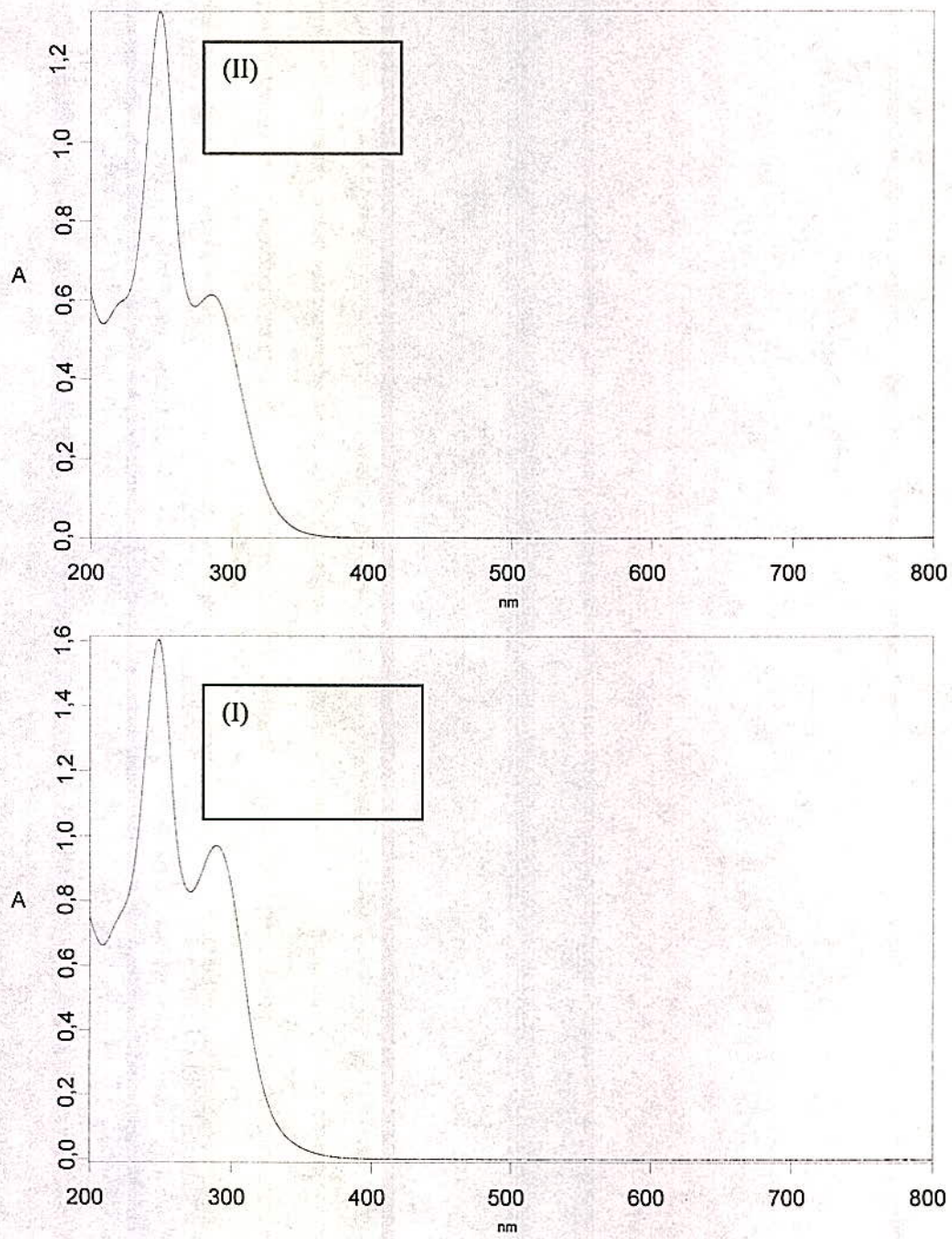
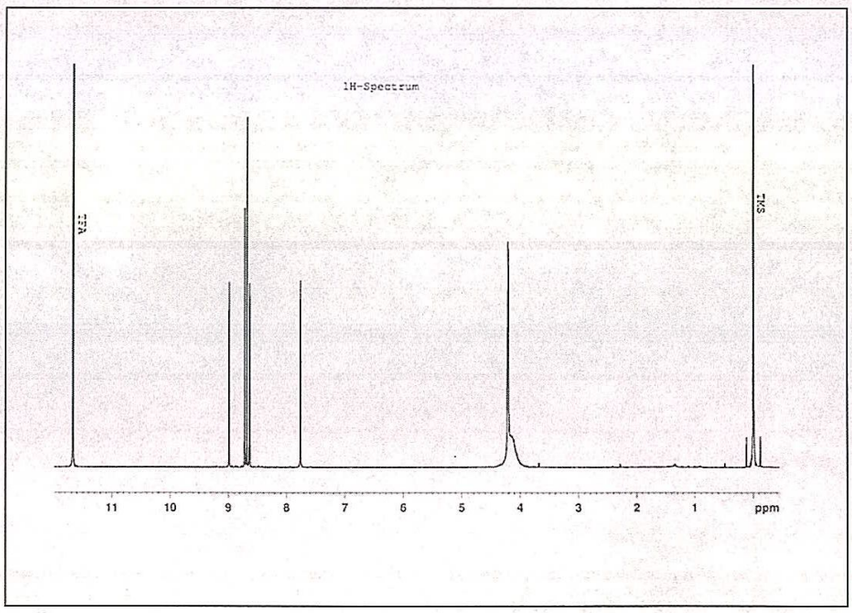
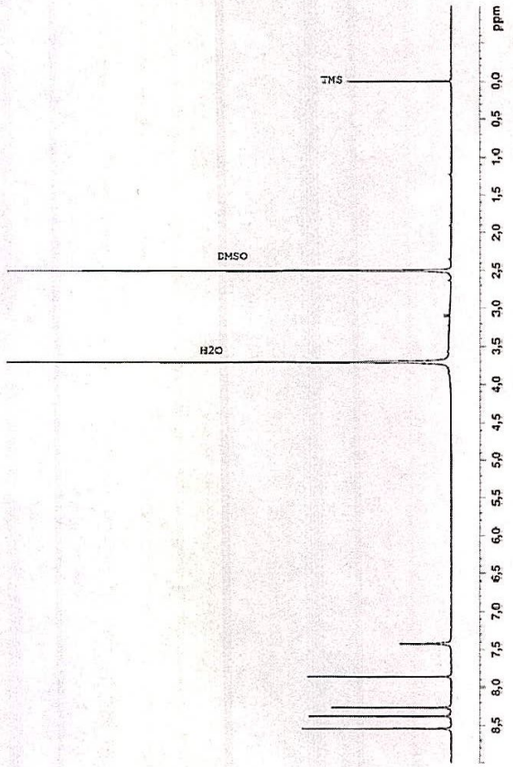


Figura 4: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (II)



41

Figura 5: Espectro ^{1}H RMN del compuesto de fórmula (I)



43

Figura 6: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (II)

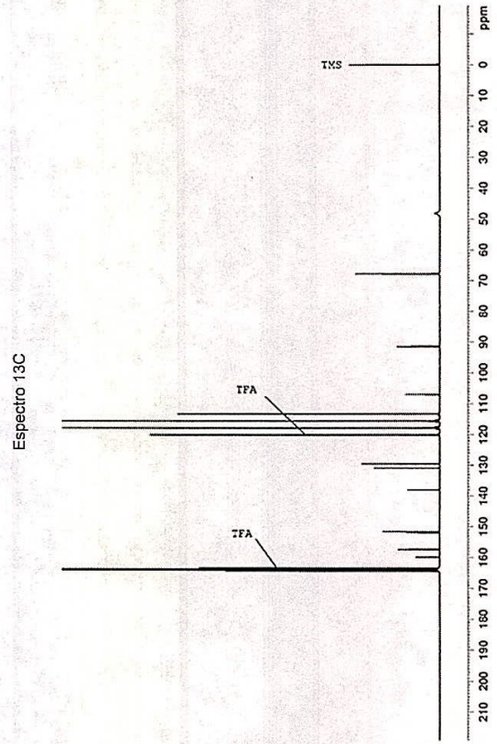


Figura 7: Espectro ^{13}C RMN del compuesto de fórmula (I)

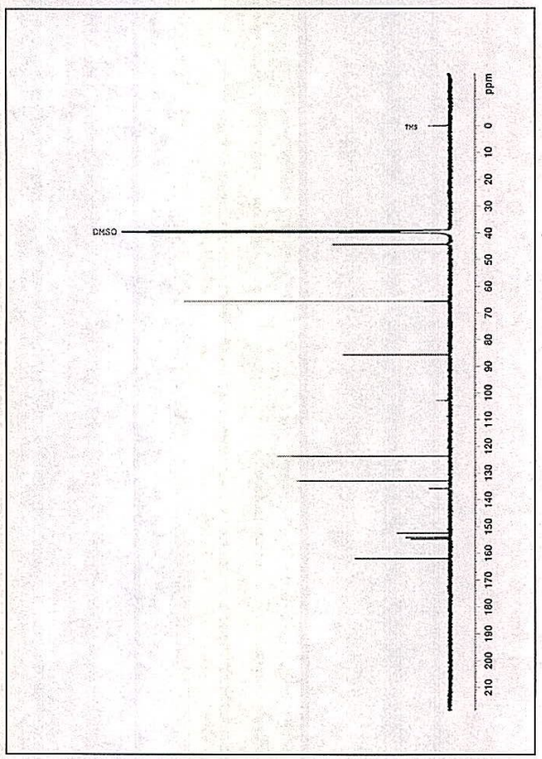


Figura 8: Espectro de masa del compuesto de fórmula (II)

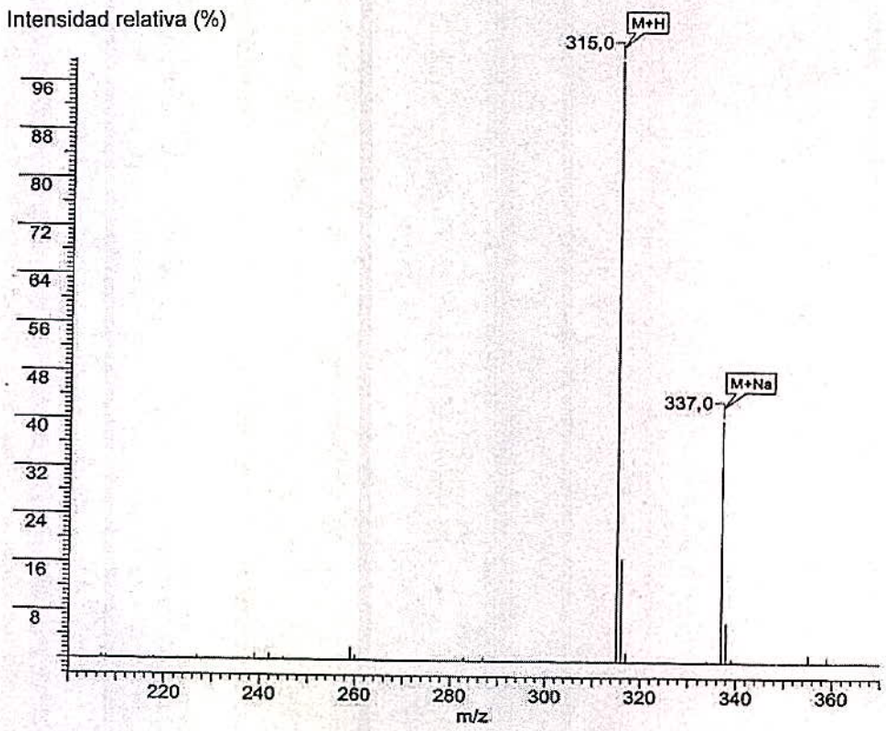


Figura 9: Espectro de masa del compuesto de fórmula (I)

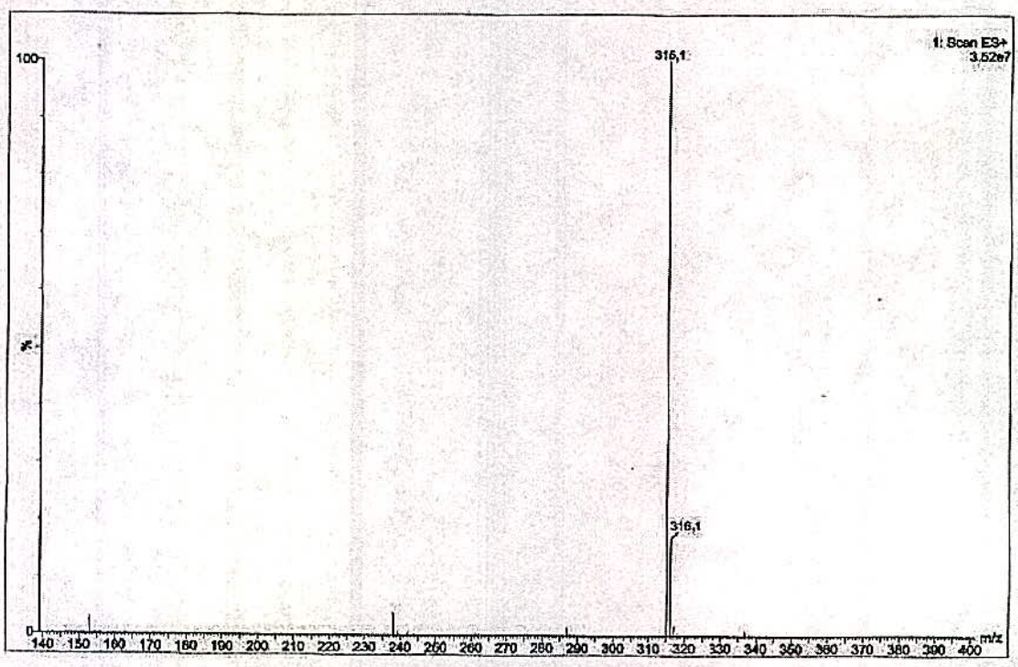


Figura 10: Difractograma de rayos X del compuesto de fórmula (II)

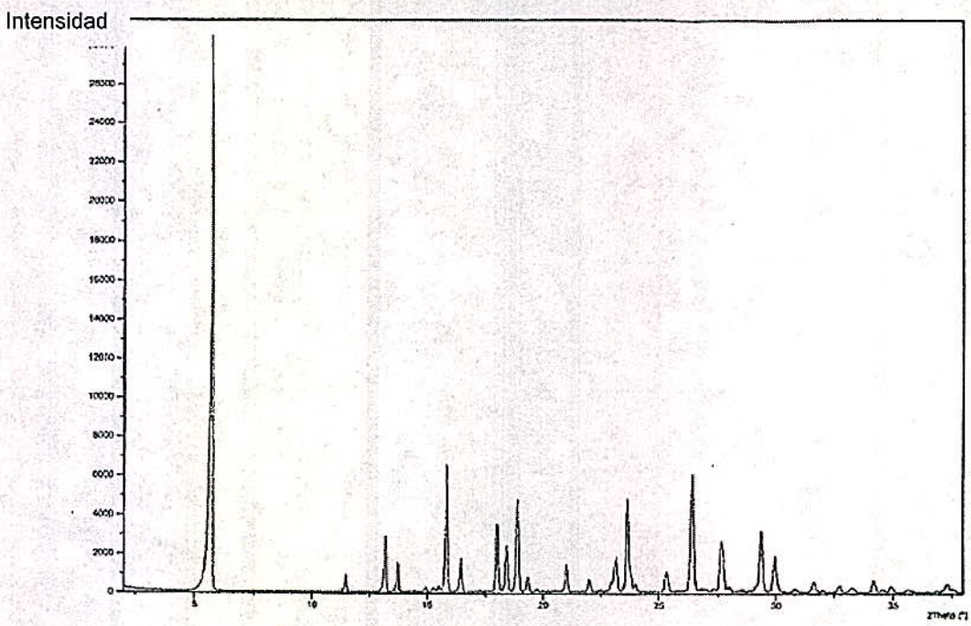
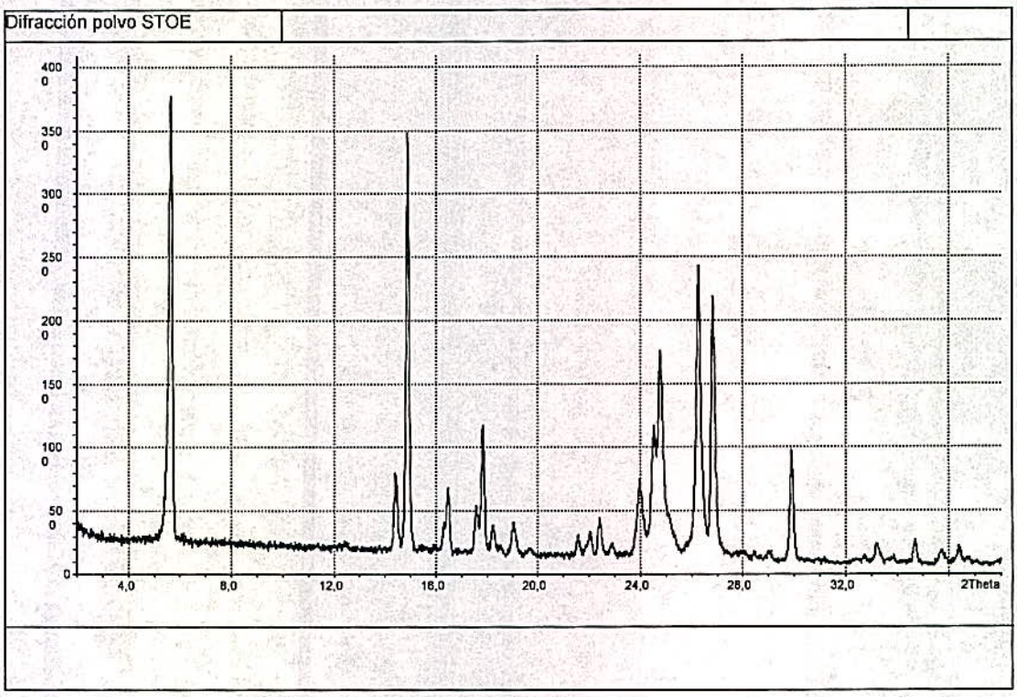
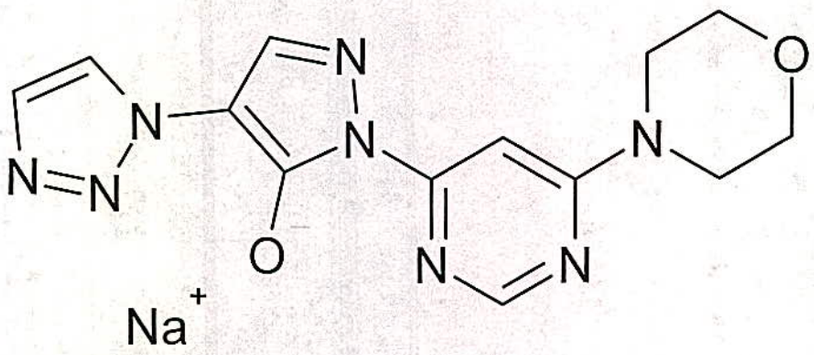


Figura 11: Difractograma de rayos X del compuesto de fórmula (I)


Difracción polvo STOE
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
4,0
8,0
12,0
16,0
20,0
24,0
28,0
32,0
2Theta


N
N
N
N
N
O
O
N
N
Na+

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Mai 2012 (24.05.2012)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/065967 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07D 403/14 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/070099

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. November 2011 (15.11.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102010044131.7
18. November 2010 (18.11.2010) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Müller Strasse 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **MILITZER, Hans-Christian** [DE/DE]; Waldweg 2, 51519 Odenthal (DE). **GRIES, Jörg** [DE/DE]; August-Macke-Weg 34, 42781 Haan (DE). **KOEP, Stefan** [DE/DE]; Saarlandring 31, 58256 Ennepetal (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

WO 2012/065967 A1

(54) Title: SUBSTITUTED SODIUM-1H-PYRAZOLE-5-OLATE

(54) Bezeichnung : SUBSTITUIERTES NATRIUM-1H-PYRAZOL-5-OLAT

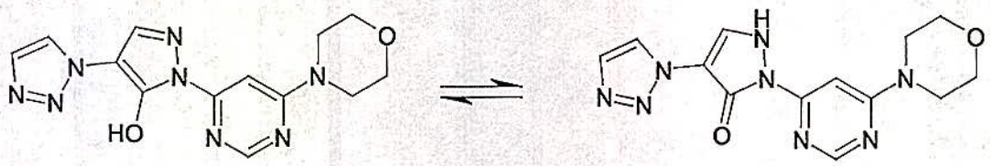
(57) Abstract: The invention relates to sodium-1-[6-{morpholine-4-yl)pyrimidine-4-yl]-4-(1H-1,2,3- triazole-1-yl)-1H-pyrazole-5-olate, to a method for producing same, to the use thereof for treating and/or preventing diseases, and to the use thereof for producing medications for treating and/or preventing diseases, in particular cardiovascular and hematological diseases and kidney diseases, and for promoting wound healing.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Anmeldung betrifft Natrium-1-[6-{morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat, Verfahren zu dessen Herstellung, dessen Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie dessen Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen, von Nierenerkrankungen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Substituiertes Natrium-1H-pyrazol-5-olat

Die vorliegende Anmeldung betrifft Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat, Verfahren zu dessen Herstellung, dessen Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie dessen Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen, von Nierenerkrankungen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Die Verbindung der Formel (I), 1-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-ol (Enol-Form; Formel (Ia)) bzw. 2-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on (Keto-Form; Formel (Ib)), ist aus WO 2008/067871 bekannt.



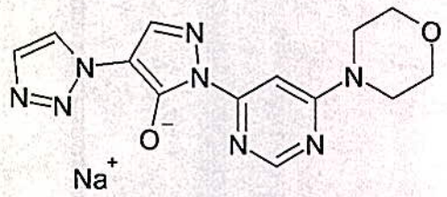
(Ia) (I) (Ib)

Die Verbindung der Formel (I) wirkt als Hemmstoff der HIF-Prolyl-4-Hydroxylasen und führt aufgrund dieses spezifischen Wirkmechanismus *in vivo* nach parenteraler oder oraler Verabreichung die Induktion von HIF-Zielgenen, wie z.B. Erythropoetin, und der hierdurch verursachten biologischen Prozesse, wie z.B. Erythropoese, herbei.

Die Verbindung der Formel (I) ist hygroskopisch und nimmt bei üblichen Umgebungsbedingungen (20-35°C, Normaldruck) bereits oberhalb einer relativen Luftfeuchtigkeit von 20 %rF bis zu etwa 6 Gew% Wasser auf. Die Aufnahme von 6 Gew% Wasser ist bei einer Luftfeuchte von 30 %rF nahezu erreicht. Eine Wasser enthaltende Verbindung der Formel (I) gibt bei abnehmender Luftfeuchte unterhalb von 30 %rF Teile des enthaltenen Wassers wieder ab. Diese Wasseraufnahme beziehungsweise Wasserabgabe erschweren den Umgang mit der Verbindung der Formel (I), z. B. Wägeprozesse, und die Herstellung der Verbindung der Formel (I) in einer gleichbleibenden, stabilen und definierten Form für den Einsatz in Arzneimitteln beziehungsweise die Herstellung von Arzneimitteln enthaltend die Verbindung der Formel (I). Insbesondere erhöht sich dadurch der technische Aufwand bei der Herstellung von Applikationsformen enthaltend die Verbindung der Formel (I), wie z.B. Tabletten, Granulaten oder Trinklösungen, da für eine gleichbleibende Konzentration der Verbindung der Formel (I) Maßnahmen zur Kontrolle und zur Regelung der Luftfeuchtigkeit erforderlich sind.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass aus der Verbindung der Formel (I) ein Natriumsalz hergestellt werden kann, das gegenüber der Verbindung der Formel (I) entscheidende Vorteile aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat entsprechend der Verbindung der Formel (II)

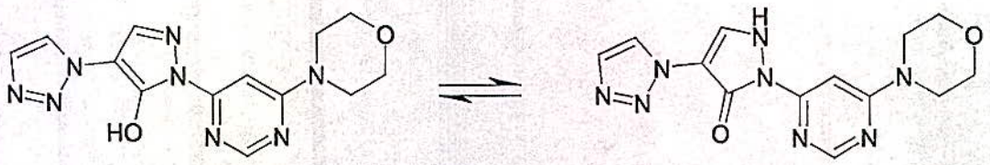


(II)

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) in kristalliner Form vor.

Durch den erfindungsgemäßen Einsatz der Verbindung der Formel (II) wird sichergestellt, dass eine im Vergleich zur bekannten Verbindung der Formel (I) signifikant höhere Stabilität gegenüber der Aufnahme beziehungsweise Abgabe von Wasser bei schwankender Luftfeuchtigkeit erreicht wird. Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) enthält weniger als 0,5 Gew% Wasser, ist nicht hygroskopisch und ändert unter üblichen Umgebungsbedingungen (20-35°C, Normaldruck) auch bei erhöhter Luftfeuchte bis zu 90 %rF seinen Wassergehalt nur minimal, d. h. weniger als 0,5 Gew%. Die Verbindung der Formel (II) ist technisch deutlich leichter handhabbar, d. h. bei Wägeprozessen, und insbesondere wenn es darum geht, eine gleichbleibende Konzentration der Verbindung der Formel (II) in einer Applikationsform, wie z.B. einem Granulat, einer Trinklösung oder einer Tablette, zu gewährleisten. Darüber hinaus weist die Verbindung der Formel (II) gegenüber der Verbindung der Formel (I) eine erhöhte Löslichkeit in Wasser auf.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II), dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I)



(Ia) (I) (Ib)

in einem Lösungsmittel mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umgesetzt wird.

Bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II), dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umgesetzt wird.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II), dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, unter Zusatz von Triethylamin, umgesetzt wird.

Die Umsetzung mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmittel, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 20°C bis 120°C, besonders bevorzugt in einem Temperaturbereich von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck. Die Verbindung der Formel (II) wird aus der erhaltenen Suspension bei einer Temperatur zwischen -20°C und 80°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C, bei Normaldruck durch Filtration isoliert und anschließend getrocknet.

Findet die Umsetzung unter Zusatz einer Base statt, wird die Verbindung der Formel (I) im Allgemeinen zunächst unter Zugabe einer organischen Base in einem Lösungsmittel bei einer Temperatur von 20°C bis 120°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck gelöst und anschließend die Verbindung der Formel (II) durch Zugabe von Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz bei einer Temperatur von 20°C bis 120°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck gefällt. Die Verbindung der Formel (II) wird aus der erhaltenen Suspension bei einer Temperatur zwischen -20°C und 80°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C, bei Normaldruck durch Filtration isoliert und anschließend getrocknet.

Natriumhydroxid und wässrige Natronlauge und das Natrium-Salz werden in einem Molverhältnis von 0,8 bis 2 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt. Bevorzugt werden Natriumhydroxid und wässrige Natronlauge und das Natrium-Salz in einem Molverhältnis von 1,0 bis 1,4 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt.

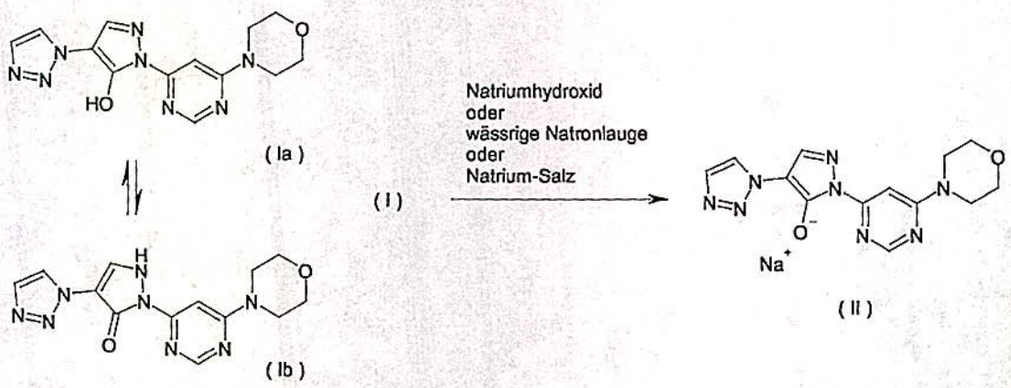
Als Natrium-Salz eignen sich beispielsweise Salze organischer Säuren wie Natriumcarboxylate, wie beispielsweise Natriumacetat oder Natriumcitrat, oder Salze anorganischer Säuren wie beispielsweise Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumphosphat, Natriumhydrogenphosphat oder Natriumchlorid.

Als Lösungsmittel eignen sich niedere Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, n-Propanol, iso-Propanol, n-Butanol, sec-Butanol, iso-Butanol, 1-Pentanol, oder Tetrahydrofuran, oder Acetonitril, oder Toluol, oder 1,4-Dioxan oder Gemische der genannten Lösungsmittel, oder Gemische der genannten Lösungsmittel mit Wasser. Bevorzugt sind Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Tetrahydrofuran oder Gemische der genannten Lösungsmittel mit Wasser. Besonders bevorzugt sind Mischungen von Methanol mit Wasser oder Ethanol mit Wasser in einem Verhältnis zwischen 1 : 1 und 50 : 1 (v/v), ganz besonders bevorzugt sind Mischungen von Methanol mit Wasser in einem Verhältnis zwischen 7 : 3 und 30 : 1 (v/v).

Als organische Basen eignen sich tertiäre Amine wie beispielsweise Triethylamin oder Diisopropylethylamin. Bevorzugt ist Triethylamin. Die organische Base wird in einem Verhältnis von 0 bis 4 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt. Bevorzugt wird die organische Base in einem Verhältnis von 0,7 bis 1,5 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) kann durch das folgende Reaktionsschema veranschaulicht werden:

Schema



Erklärungen zu den Abbildungen:

Abbildung 1: IR-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 2: Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 3: UV/VIS Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 4: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 5: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 6: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 7: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 8: Massenspektrum der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 9: Massenspektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 10: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 11: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (I)

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zeigt ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum. Sie eignet sich daher zur Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten bei Menschen und Tieren.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zeichnet sich als spezifischer Hemmstoff der HIF-Prolyl-4-Hydroxylasen aus.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften zur Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Krankheiten, insbesondere von Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit, Angina pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Arteriosklerose, essentieller, pulmonaler und maligner Hypertonie sowie peripherer arterieller Verschlusskrankheit eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich weiterhin zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Störungen der Blutbildung, wie z.B. idiopathischen Anämien, renaler Anämie und Anämien in Begleitung einer Tumor-Erkrankung (insbesondere einer Chemotherapie-induzierten Anämie), einer Infektion (insbesondere HIV-Infektion) oder einer anderen entzündlichen Erkrankung

wie z.B. rheumatoider Arthritis. Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist darüber hinaus geeignet zur unterstützenden Behandlung von Anämien infolge Blutverlust, Eisenmangel-Anämie, Vitaminmangel-Anämie (z.B. infolge Vitamin B12-Mangel oder infolge Folsäure-Mangel), hypoplastischer und aplastischer Anämie, hämolytischer Anämie oder zur unterstützenden Behandlung von Anämien in Folge von Eisenverwertungsstörungen (sideroachrestische Anämie) oder Anämien infolge anderer endokriner Störungen (z.B. Hypothyreose).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist ferner geeignet zur Steigerung des Hämatokrits mit dem Ziel der Gewinnung von Blut zur Eigenblutspende vor Operationen.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann außerdem zur Behandlung und/oder Prophylaxe von operationsbedingten Ischämiezuständen und deren Folgeerscheinungen nach chirurgischen Eingriffen, insbesondere Eingriffen am Herzen unter Verwendung einer Herz-Lungenmaschine (z.B. Bypass-Operationen, Herzklappen-Implantationen), Eingriffen an den Halsschlagadern, Eingriffen an der Körperschlagader (Aorta) und Eingriffen mit instrumenteller Öffnung oder Durchdringung der Schädelkalotte verwendet werden. Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich ferner zur allgemeinen Behandlung und/oder Prophylaxe bei chirurgischen Eingriffen mit dem Ziel einer Beschleunigung der Wundheilung und Verkürzung der Rekonvaleszenzzeit.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist darüber hinaus zur Behandlung und Prophylaxe von Folgeerscheinungen akuter und protrahierter Ischämiezustände des Gehirns geeignet (z.B. Schlaganfall, Geburtsasphyxie).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann ferner zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs und zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer im Zuge der Behandlung von Krebs auftretenden Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes insbesondere nach Therapie mit Zytostatika, Antibiotika und Bestrahlungen eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich ferner zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und anderen den Autoimmunerkrankungen zuzurechnenden Krankheitsformen und insbesondere zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer im Zuge der medikamentösen Behandlung derartiger Erkrankungen auftretenden Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eingesetzt werden zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen des Auges (z.B. Glaukom), des Gehirns (z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Demenz, chronisches Schmerzempfinden), von chronischen Nierenerkrankungen, Niereninsuffizienz und akutem Nierenversagen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Weiterhin eignet sich die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer insbesondere im höheren Lebensalter gehäuft auftretenden allgemeinen körperlichen Schwäche bis hin zur Kachexie.

Ferner eignet sich die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe sexueller Dysfunktion.

Außerdem ist die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen, wie z.B. diabetischer Makro- und Mikroangiopathie, diabetischer Nephropathie und Neuropathie, geeignet.

Weiterhin eignet sich die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen z.B. des Herzens, der Lunge und der Leber.

Insbesondere ist die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) auch zur Prophylaxe und Behandlung der Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum) geeignet.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen, unter Verwendung einer wirksamen Menge der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann allein oder bei Bedarf in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt werden. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, enthaltend die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, insbesondere zur Behandlung und/oder Prävention der zuvor genannten Erkrankungen. Als geeignete Kombinationswirkstoffe seien beispielhaft und vorzugsweise genannt: ACE-Inhibitoren, Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten, Beta-Rezeptor-Blocker, Calcium-Antagonisten, PDE-Inhibitoren, Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, Diuretika, Aspirin, Eisen-Supplements, Vitamin B12- und Folsäure-Supplements, Statine, Digitalis (Digoxin)-Derivate, Tumor-Chemotherapeutika sowie Antibiotika.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem ACE-Inhibitor, wie beispielhaft und vorzugsweise Enalapril, Captopril, Lisinopril, Ramipril, Delapril, Fosinopril, Quinopril, Perindopril oder Trandopril, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Angiotensin AII-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Losartan, Candesartan, Valsartan, Telmisartan oder Embusartan, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem beta-Rezeptoren-Blocker, wie beispielhaft und vorzugsweise Propranolol, Atenolol, Timolol, Pindolol, Alprenolol, Oxprenolol, Penbutolol, Bupranolol, Metipranolol, Nadolol, Mepindolol, Carazalol, Sotalol, Metoprolol, Betaxolol, Celiprolol, Bisoprolol, Carteolol, Esmolol, Labetalol, Carvedilol, Adaprolol, Landiolol, Nebivolol, Epanolol oder Bucindolol, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Calcium-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Nifedipin, Amlodipin, Verapamil oder Diltiazem, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor, wie beispielhaft und vorzugsweise Milrinone, Amrinone, Pimobendan, Cilostazol, Sildenafil, Vardenafil oder Tadalafil, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Spironolacton, Eplerenon, Canrenon oder Kalium-Canrenoat, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Diuretikum, wie beispielhaft und vorzugsweise Furosemid, Bumetanid, Torsemid, Bendroflumethiazid, Chlorthiazid, Hydrochlorthiazid, Hydroflumethiazid, Methyclothiazid, Polythiazid, Trichlormethiazid, Chlorthalidon, Indapamid, Metolazon, Quinethazon, Acetazolamid, Dichlorphenamid, Methazolamid, Glycerin, Isosorbid, Mannitol, Amilorid oder Triamteren, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor aus der Klasse der Statine, wie

beispielhaft und vorzugsweise Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, Rosuvastatin, Cerivastatin oder Pitavastatin, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Tumor-Chemotherapeutikum verabreicht, beispielhaft und vorzugsweise aus der Gruppe der Platin-Komplexe, wie z.B. Cisplatin und Carboplatin, der Alkylantien, wie z.B. Cyclophosphamid und Chlorambucil, der Antimetabolite, wie z.B. 5-Fluoruracil und Methotrexat, der Topoisomerase-Hemmer, wie z.B. Etoposid und Camptothecin, der Antibiotika, wie z.B. Doxorubicin und Daunorubicin, oder der Kinase-Inhibitoren, wie z.B. Sorafenib und Sunitinib.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Antibiotikum verabreicht, beispielhaft und vorzugsweise aus der Gruppe der Penicilline, Cephalosporine oder Chinolone, wie z.B. Ciprofloxacin und Moxifloxacin.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II), üblicherweise zusammen mit einem oder mehreren inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen enthalten, sowie deren Verwendung zu den zuvor genannten Zwecken.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck kann sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie z.B. oral, parenteral, pulmonal, nasal, sublingual, lingual, buccal, rectal, dermal, transdermal, conjunctival, otisch oder als Implantat bzw. Stent.

Für diese Applikationswege kann die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in geeigneten Applikationsformen verabreicht werden.

Für die orale Applikation eignen sich nach dem Stand der Technik funktionierende, die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) schnell und/oder modifiziert abgebende Applikationsformen, wie z.B. Tabletten (nicht-überzogene oder überzogene Tabletten, beispielsweise mit magensaftresistenten oder sich verzögert auflösenden oder unlöslichen Überzügen, die die Freisetzung der erfindungsgemäßen Verbindung kontrollieren), in der Mundhöhle schnell zerfallende Tabletten oder Filme/Oblaten, Filme/Lyophylisate, Kapseln (beispielsweise Hart- oder Weichgelatinekapseln), Dragees, Granulate, Pellets, Pulver, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole oder Lösungen.

Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. intramuskulär, subcutan, intracutan, percutan oder intraperitoneal). Für die

parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Lyophilisaten oder sterilen Pulvern.

Für die sonstigen Applikationswege eignen sich z.B. Inhalationsarzneiformen (u.a. Pulverinhalatoren, Nebulizer), Nasentropfen, -lösungen oder -sprays, lingual, sublingual oder buccal zu applizierende Tabletten, Filme/Oblaten oder Kapseln, Suppositorien, Ohren- oder Augenpräparationen, Vaginalkapseln, wäßrige Suspensionen (Lotionen, Schüttelmixturen), lipophile Suspensionen, Salben, Cremes, transdermale therapeutische Systeme (z.B. Pflaster), Milch, Pasten, Schäume, Streupuder, Implantate oder Stents.

Bevorzugt sind die orale oder parenterale Applikation, insbesondere die orale und die intravenöse Applikation.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch Mischen mit inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen geschehen. Zu diesen Hilfsstoffen zählen u.a. Trägerstoffe (beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Lactose, Mannitol), Lösungsmittel (z.B. flüssige Polyethylenglycole), Emulgatoren und Dispergier- oder Netzmittel (beispielsweise Natriumdodecylsulfat, Polyoxysorbitanoleat), Bindemittel (beispielsweise Polyvinylpyrrolidon), synthetische und natürliche Polymere (beispielsweise Albumin), Stabilisatoren (z.B. Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure), Farbstoffe (z.B. anorganische Pigmente wie beispielsweise Eisenoxide) und Geschmacks- und/oder Geruchskorrigentien.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei parenteraler Applikation Mengen von etwa 0,001 bis 1 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 0,5 mg/kg Körpergewicht zur Erzielung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen. Bei oraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 100 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 20 mg/kg und ganz besonders bevorzugt 0,1 bis 10 mg/kg Körpergewicht.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten gegenüber dem Wirkstoff, Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Applikation erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung. Die Erfindung ist nicht auf die Beispiele beschränkt.

Die Prozentangaben in den folgenden Tests und Beispielen sind, sofern nicht anders angegeben, Gewichtsprozente; Teile sind Gewichtsteile. Lösungsmittelverhältnisse, Verdünnungsverhältnisse und Konzentrationsangaben von flüssig/flüssig-Lösungen beziehen sich jeweils auf das Volumen.

A. **Beispiele**

Abkürzungen:

ACN	Acetonitril
bS	breites Singulett (in NMR Spektren)
D	Dublett (in NMR Spektren)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry)
Gew%	Gewichtsprozent
M	Multiplett (in NMR Spektren)
n.d.	nicht detektiert
NMR	Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
rF	relative Feuchte
S	Singulett (in NMR Spektren)
sec	Sekunden
T	Triplett (in NMR Spektren)
v/v	Volumen/Volumen
δ	Deformationsschwingungen
ν	Streckschwingungen

Ausgangsverbindungen:

Beispiel 1A

2-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)acrylsäuremethylester

450 g 2-(1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)essigsäureethylester wurden in 3,5 l Methanol gelöst, mit 30 g Triethylamin versetzt und 16 h bei 22°C gerührt. Anschließend wurden im Vakuum alle Lösungsmittel abdestilliert. Man erhielt 410 g der Titelverbindung als Öl.

Beispiel 2A

3-(Dimethylamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäuremethylester

400 g 2-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)acrylsäuremethylester wurden mit 522 g Dimethylformamid-dimethylacetal versetzt und zum Sieden erhitzt. Entstehende Leichtsieder wurden abdestilliert. Nach 4 h wurde auf 55°C abgekühlt und 1050 ml Methyl-tert-butylether / 2-Propanol (3 : 1 v/v) wurden zudosiert. Die erhaltene Suspension wurde auf 22°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit Methyl-tert-butylether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Man erhielt 493 g der Titelverbindung als Feststoff.

Beispiel 3A

1-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-ol (Enol-Form; Formel (Ia)) bzw. 2-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on (Keto-Form; Formel (Ib))

20 g 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin und 24,6 g (2E/Z)-3-(Dimethylamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäuremethylester in 210 ml Ethylacetat wurden mit 5,84 g Trifluoressigsäure versetzt und 24 h unter Rückfluss gerührt. Die erhaltene Suspension wurde auf 0°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat gewaschen, scharf abgesaugt und anschließend in 160 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde durch Zugabe von 4,5 ml Essigsäure auf etwa pH 5 eingestellt, weitere 15 Minuten gerührt und filtriert. Der Filterkuchen wurde zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 26,0 g (79,4 % d. Th.) der Titelverbindung.

Die Herstellung der Verbindungen 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin (Beispiel Nr. 16A), 2-(1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)essigsäureethylester (Beispiel Nr. 39A) und 3-(Dimethylamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäureethylester (Beispiel Nr. 3A) wurde bereits in WO 2008/067871 beschrieben.

Die Herstellung der Verbindung 2-(6-Morpholin-4-ylpyrimidin-4-yl)-4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-on aus 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin und 3-(Dimethylamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäureethylester wurde ebenfalls in WO 2008/067871 beschrieben (Beispiel Nr. 71).

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II))

Beispiel 1.1

10 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 50 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) suspendiert. Zu der Suspension wurden 3,4 g 45%ige Natronlauge unter Rühren gegeben und weitere 50 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) hinzugefügt. Die Suspension wurde auf 50°C erwärmt und 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurde auf 0°C abgekühlt, 1 h bei 0°C nachgerührt und filtriert. Der

erhaltene Filterkuchen wurde mit Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 10,1 g der Verbindung der Formel (II); 6,8 Gew% Na

Beispiel 1.2

5 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 60 ml Ethanol/Wasser (1 : 1 v/v) suspendiert und bei 22°C mit 1,41 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die Suspension wurde 3 Tage bei 50°C und 2 h bei 20°C gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4 g der Verbindung der Formel (II).

Beispiel 1.3

30,25 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 150 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) bei 22°C suspendiert. 13,3 ml Triethylamin wurden zugegeben und die Mischung wurde auf 60°C erwärmt. Nach 15 min. wurde die erhaltene fast klare Lösung filtriert, der Filter mit 10 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) nachgewaschen und das gesammelte Filtrat bei 60°C langsam mit 10,3 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die erhaltene Suspension wird mit wenigen Kristallen der Verbindung der Formel (II) versetzt, 1 h bei 60°C nachgerührt, anschließend langsam auf 0°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wird mit 15 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 25,1 g der Verbindung der Formel (II).

Beispiel 1.4

25 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 150 ml Methanol/Wasser (1 : 1 v/v) suspendiert und mit 11 ml Triethylamin versetzt. Die erhaltene Lösung wurde auf 60°C erwärmt und mit 8,5 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die erhaltene Suspension wurde langsam auf 22°C abgekühlt, 2 h bei 22°C und anschließend 1 h bei 0-5°C gerührt. Nach Filtration wurde der Filterkuchen mit 15 ml Methanol/Wasser (1 : 1 v/v) gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 26 g der Verbindung der Formel (II).

Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC):

Die Thermogramme wurden unter Verwendung eines Differential Scanning Calorimeters DSC 7 bzw. Pyris-1 und Thermogravimetric Analyser TGA 7 der Fa. Perkin-Elmer erhalten.

*Differential Scanning Calorimeter DSC 7 bzw. Pyris-1;*Hersteller: Perkin-Elmer; Heizrate: 2 und 20 K/min: Spülgas: Stickstoff; Tiegel: nicht gasdichte Aluminium-Tiegel; Probenvorbereitung: keine.

Thermogravimetric Analyzer TGA 7; Hersteller: Perkin-Elmer; Heizrate: 10 $Kmin^{-1}$; Spülgas: Stickstoff, 20-30 ml/min; Tiegel: offener Platin-Tiegel; Probenvorbereitung: keine.

Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) zersetzt sich oberhalb von 300°C ohne zu schmelzen.

Wasserdampfadsorption und Wasserdampfdesorption:

Die Feuchtesorptionsisotherme wurde mit einem Dynamic Vapour Sorption Analyzer IGA Sorp der Fa. Hiden Analytical aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 25°C. Es gab keine Probenvorbereitung.

Tabelle 1: Wasserdampfadsorption und Wasserdampfdesorption von Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II))

	Verbindung der Formel (II)		Verbindung der Formel (I)	
Relative	Adsorption	Desorption	Adsorption	Desorption
0 %rF	0 %	0 %	0,1 %	0,1 % (5 %rF)
10 %rF	0 %	0 %	0,2 %	0,1 %
20 %rF	0,1 %	0 %	0,3 %	0,2 %
30 %rF	0,1 %	0,1 %	4,8 %	4,7 %
40 %rF	0,2 %	0,2 %	5,1 %	5,2 %
50 %rF	0,2 %	0,3 %	5,3 %	5,4 %
60 %rF	0,2 %	0,3 %	5,4 %	5,6 %
70 %rF	0,4 %	0,4 %	5,6 %	5,6 %
80 %rF	0,4 %	0,5 %	5,7 %	5,7 %
90 %rF	0,8 %	0,8 %	5,9 %	5,9 %

Löslichkeitsdaten:

Methode: Gesättigte Lösungen der Prüfsubstanz wurden durch 16stündiges Rühren einer Suspension in Wasser bei 25°C hergestellt. Die erhaltenen Suspensionen wurden anschließend filtriert und der Gehalt im Filtrat wurde mittels HPLC-Messung bestimmt.

Tabelle 2: Löslichkeiten in Wasser

	Verbindung der Formel (II)	Verbindung der Formel (I)
Löslichkeit in Wasser bei 25°C [mg/100ml]	2800	14,3

IR and Raman Spektroskopie:

Für die Messung von IR- und Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) wurden Bruker FT/IR-Spektrometer IFS 66v und Bruker FT/Raman-Spektrometer MultiRAM mit folgenden Parametern verwendet:

	IR	**Raman**
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Anzahl der Einzelmessungen (Scans)	32	64
Wellenzahlbereich	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 200 cm^{-1}
Probenvorbereitung	KBr Pressling	keine

Tabelle 3: Zuordnung charakteristischer Schwingungsbanden in den IR- bzw. Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II)

Strukturelement	IR–Bandenlage (cm^{-1})	Raman-Bandenlage (cm^{-1})
ν =C-H	3153 – 3006	3153 – 3010
ν C-H	2976 – 2855	2978 – 2856
ν C=C, ν C=N	1630 – 1439	1623 – 1401
ν C-N	1241	1244
ν C-O	1112	1118
δ =C-H $_{in\ phase}$	987	988

Für die Messung von IR- und Raman-Spektren der Verbindung der Formel (I) wurden Bruker FT/IR-Spektrometer Vertex 80v und Bruker FT/Raman-Spektrometer MultiRAM mit folgenden Parametern verwendet:

	IR	**Raman**
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Anzahl der Einzelmessungen (Scans)	32	64
Wellenzahlbereich	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 100 cm^{-1}
Probenvorbereitung	KBr Pressling	keine

Tabelle 4: Zuordnung charakteristischer Schwingungsbanden in den IR- bzw. Raman-Spektren der Verbindung der Formel (I)

Strukturelement	IR–Bandenlage (cm^{-1})	Raman-Bandenlage (cm^{-1})
ν O-H	3441	-
ν =C-H	3135 – 3108	3134 – 3006
ν C-H	2965 – 2884	2967 – 2884
ν C=C, ν C=N, δ C-H	1636 – 1345	1650 – 1345
ν $C-O_{Ether}$	1257	1259

UV/VIS-Spektroskopie:

UV/VIS-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer Spektrometer (Lambda 40P) mit den folgenden Bedingungen bzw. Parametern gemessen:

Küvette: Durchgangslänge 1cm; Quartzglas
Wellenzahlbereich: 200 - 800 nm
Öffnungsspalt: 1 nm
Probenvorbereitung: Ca. 1 mg/100ml Acetonitril/Wasser 1:1
Banden: 285; 249 nm Verbindung der Formel (II) und 289,3; 248,2 nm Verbindung der Formel (I)

Tabelle 5: Berechnung der spezifischen Absorption und des molaren Absorptionskoeffizienten

Verbindung der Formel	Lösungsmittel	Wellenlänge (nm)	Spezifische Absorption $A^{1\%}_{1cm}$ (liter/g * cm)	Molarer Absorptionskoeffizent ε (liter/mol * cm)
(I)	Acetonitril/ Wasser 1:1	249	1111	34928
(II)	Acetonitril/ Wasser 1:1	284	501.2	16855

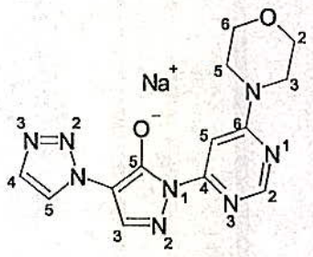
NMR-Spektroskopie:

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker NMR-Spektrometer (Advance) mit folgenden Bedingungen bzw. Parametern aufgenommen:

Verbindung der Formel (II)	^{1}H-NMR-Spektrum	^{13}C-NMR-Spektrum
Arbeitsfrequenz	500.13 MHz	125.76 MHz
Lösungsmittel	Trifluoressigsäure	Trifluoressigsäure
Konzentration	6.84 mg/ml	42.7 mg/ml
Interner Standard	Tetramethylsilan (TMS)	Tetramethylsilan (TMS)
Probenröhrchen-Durchmesser	5 mm	5 mm
Temperatur	25°C	25°C
Technik	Fouriertransformationstechnik	Fouriertransformationstechnik
Spektrale Breite	20.65 ppm	245.41 ppm
Digitale Auflösung	0.079 Hz/Pt	0.4710 Hz/Pt
Pulsdauer	2.83 µsec, 30° Anregungswinkel	9.1 µsec, 90° Anregungswinkel
Aufnahmedauer	6.399 sec	1.06 sec
Relaxationszeit	0.5 sec	4 sec
No. of free induction decays	32	128

Verbindung der Formel (I)	^{1}H-NMR-Spektrum	^{13}C-NMR-Spektrum
Arbeitsfrequenz	500.13 MHz	125.76 MHz
Lösungsmittel	Dimelhylsufoxid-d_6 (DMSO)	Dimethylsulfoxid-d_6 (DMSO)
Konzentration	6.3 mg/ml	35.8 mg/ml
Interner Standard	Tetramethylsilan (TMS)	Tetramethylsilan (TMS)
Probenröhrchen-Durchmesser	5 mm	5 mm
Temperatur	25°C	27°C
Technik	Fouriertransformationstechnik	Fouriertransformationstechnik
Spektrale Breite	20.65 ppm	240.89 ppm
Digitale Auflösung	0.079 Hz/Pt	0.9248 Hz/Pt
Pulsdauer	3.1 µsec, 30° Anregungswinkel	7.0 µsec, 90° Anregungswinkel
Aufnahmedauer	6.344 sec	1.08 sec
Relaxationszeit	0.5 sec	4 sec
No. of free induction decays	32	1024

Strukturformeln der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I) mit Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale



(II) (I)

Tabelle 6: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative Protonenanzahl (Nummerierung der H-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

H-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der Protonen /Molekül
Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)			
H-2; H-3; H-5; H-6	4.00-4.25	M	8
pyrimidin-4-yl]-			
H-2	8.72	S	1
H-5	7.77	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
H-4	8.64	D J= 1.4 Hz	1
H-5	8.98	D J= 1.4 Hz	1
1H-pyrazol-5-olat			
H-3	8.68	S	1

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative Protonenanzahl (Nummerierung der H-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

H-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der Protonen /Molekül
1-[6-(morpholin-4-yl)			
H-2; H-3; H-5; H-6	3.71	S	8
pyrimidin-4-yl]-			
H-2	8.55	S	1
H-5	7.42	S	1

4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
H-4	7.86	D (0.6Hz)	1
H-5	8.38	D (0.6Hz)	1
1H-pyrazol-5-ol			
H-3	8.27	S	1
5-OH	n.d (c)	n.d.	1

Tabelle 8: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative C-Kernzahl in der Verbindung der Formel (II) (Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

C-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der C-Kerne /Molekül
Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)			
C-2; C-6	67.80	T	2
C-3; C-5	48.21	T	2
pyrimidin-4-yl]-			
C-2	151.65	D	1
C-4	152.01	S	1
C-5	91.48	D	1
C-6	159.90	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
C-4	130.93	D	1
C-5	129.57	D	1
1H-pyrazol-5-olat			
C-3	138.03	D	1
C-4	106.99	S	1
C-5	157.43	S	1

5

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative C-Kernzahl in der Verbindung der Formel (I) (Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

C-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der C-Kerne /Molekül
1-[6-(morpholin-4-yl			
C-2; C-6	65.56	T	2
C-3, C-5	44.29	T	2
pyrimidin-4-yl]-			
C-2	154.08	D	1
C-4	152.43	S	1
C-5	85.62	D	1
C-6	161.99	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
C-4	132.94	D	1
C-5	123.68	D	1
1H-pyrazol-5-ol			
C-3	135.84	D	1
C-4	102.82	S	1
C-5	154.70	S	1

Massenspektroskopie:

Das Massenspektrum wurde auf einem Waters Massenspektrometer (ZQ) mit den nachfolgend aufgeführten Bedingungen bzw. Parametern aufgenommen:

Ionisationsmethode	ESI (Electronic Spray Ionization)
Lösungsmittel	Acetonitril/Wasser

Tabelle 10: Interpretation des Massenspektrums der Verbindung der Formel (II)

		Massenzahl (MZ)
Ionenbildung M+H	C13H14N8O2 + H	315
Ionenbildung M+Na	C13H14N8O2 + Na	337

Tabelle 11: Interpretation des Massenspektrums der Verbindung der Formel (I)

		Massenzahl (MZ)
Ionenbildung M+H	C13H15N8O2	315

Elementaranalyse:

Tabelle 12: Ergebnisse der Elementanalyse der Verbindung der Formel (II)

Element	gemessen (%)	berechnet (%)	Differenz (%)
C	46.1	46.4	0.3
H	4.0	3.9	0.1
N	33.1	33.3	0.2

Tabelle 13: Ergebnisse der Elementanalyse der Verbindung der Formel (I)

Element	gemessen (%)	berechnet (%)	Differenz (%)
C	49.5	49.7	0.2
H	4.4	4.5	0.1
N	35.5	35.7	0.2
O	12.6	10.2	2.4

Röntgendiffraktometrie:

Transmissionsdiffraktometer PANalytical X'Pert PRO mit PIXcel-Zähler (Multichannel):

Strahlung:	Kupfer, K alpha
Primär-Monochromator:	fokussierender Röntgenspiegel
Wellenlänge (K1):	1,5406 Å
Wellenlänge (K2):	1,5444 Å
Generatorparameter:	40 kV, 40 mA
Messbereich:	2-38°
Raumbedingungen:	25°C, 40 – 60 %rF

bzw.

STOE Pulver Diffraktions-System:

Diffraktometer :	Transmission
Monochromator :	Curved Germanium (111)
Generator :	45 kV, 35 mA
Wellenlänge :	1.540598 Cu
Detektor :	Linear PSD
Scan Mode :	Transmission / Moving PSD / Fixed omega
Scan Type :	2Theta:Omega
Raumbedingungen:	25°C, 40 – 60 %rF

Tabelle 14: Pulverröntgendiffraktometrie der Verbindung der Formel (II)

Verbindung der Formel (II) Reflexe [2 Theta]	
5,7	23,6
11,5	25,3
13,2	26,4
13,7	26,9
15,8	27,7
16,4	27,7
18,4	29,4
18,9	29,9
19,3	30,0
21,0	30,7
22,0	31,5
23,1	31,6

Tabelle 15: Pulverröntgendiffraktometrie der Verbindung der Formel (I)

Verbindung der Formel (I) Reflexe [2 Theta]	
5,6	24,6
14,4	24,8
14,9	25,1
16,3	26,3
16,5	26,8
17,6	28
17,8	28,5
18,2	29
18,5	29,9
19	32,4
19,7	32,7
21,6	33,2
22	33,8
22,4	34,7
22,9	35,7
24	36,4
24,5	36,7

B. Bewertung der pharmakologischen Wirksamkeit

Die pharmakologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen können in folgenden Assays gezeigt werden:

Abkürzungen:

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Calf Serum
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. *In vitro*-Tests zur Bestimmung der Aktivität und Selektivität von HIF-Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitoren

1.a) Hemmung der Aktivität von HIF-Prolylhydroxylase:

Hydroxylierter HIF bindet spezifisch an den von Hippel-Lindau Protein-Elongin B-Elongin C-Komplex (VBC-Komplex). Diese Interaktion tritt nur auf, wenn HIF an einem konservierten Prolylrest hydroxyliert ist. Sie ist die Grundlage für die biochemische Bestimmung der HIF-Prolylhydroxylase-Aktivität. Der Test wird wie beschrieben durchgeführt [Oehme F., Jonghaus W., Narouz-Ott L., Huetter J., Flamme I., *Anal. Biochem.* **330** (1), 74-80 (2004)]:

Eine klare, mit NeutrAvidin HBC beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte (Fa. Pierce) wird für 30 Minuten mit Blocker-Casein inkubiert. Anschließend wird die Platte dreimal mit je 200 µl Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Blocker-Casein, 0.05% (v/v) Tween 20) pro Loch gewaschen. Das Peptid Biotin-DLDLEMLAPYIPMDDDFQL (Fa. Eurogentec, 4102 Seraing, Belgien) wird in einer Konzentration von 400 nM in 100 µl Waschpuffer zugegeben. Dieses Peptid dient als Substrat für die Prolylhydroxylierung und wird an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach 60 Minuten Inkubation wird die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten mit 1 mM Biotin in Blocker-Casein inkubiert und dann erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Durchführung der Prolylhydroxylase-Reaktion wird das an die Platte gebundene Peptidsubstrat 1 bis 60 Minuten mit einem Prolylhydroxylase-haltigen Zelllysat inkubiert. Die Reaktion findet in 100 µl Reaktionspuffer (20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 µM–1 mM 2-Oxoglutarat, 10 µM $FeSO_4$, 2 mM Ascorbat) bei Raumtemperatur statt. Die Reaktionsmischung enthält außerdem den zu testenden Hemmstoff der Prolylhydroxylase in verschiedenen Konzentrationen. Die Testsubstanz wird bevorzugt, aber nicht ausschließlich bei Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 µM eingesetzt. Durch dreimaliges Waschen der Platte mit Waschpuffer wird die Reaktion gestoppt.

Zur quantitativen Bestimmung der Prolylhydroxylierung wird ein Fusionsprotein, das sowohl Thioredoxin aus E. coli als auch den VBC-Komplex enthält, in 80 µl Bindungspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl) zugegeben. Nach 15 Minuten werden 10 µl einer Lösung von polyklonalem Anti-Thioredoxin-Antikörper aus Kaninchen in Bindungspuffer zugefügt. Nach weiteren 30 Minuten setzt man 10 µl einer Lösung von mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Anti-Kaninchen-Immunglobulin in Bindungspuffer hinzu. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundenen VBC-Komplex und Antikörper zu entfernen. Um die Menge an gebundenem VBC-Komplex zu bestimmen, wird 15 Minuten mit TMB inkubiert. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure beendet. Durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm wird die Menge an gebundenem VBC-Komplex bestimmt. Sie ist proportional zur Menge an hydroxyliertem Prolin im Peptidsubstrat.

Zur Detektion der Prolylhydroxylierung kann alternativ ein mit Europium (Fa. Perkin Elmer) gekoppelter VBC-Komplex verwendet werden. In diesem Fall wird die Menge an gebundenem VBC-Komplex durch zeitaufgelöste Fluoreszenz bestimmt. Außerdem ist die Verwendung von mit [^{35}S]-Methionin markiertem VBC-Komplex möglich. Hierfür kann der radioaktiv markierte VBC-Komplex durch *in vitro*-Transkription-Translation in Retikulozytenlysat hergestellt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) hemmt die Aktivität der HIF-Prolylhydroxylase in diesem Test mit einem IC_{50}-Wert von 0,47 µM (Mittelwert für EGLN2/PHD1) bzw. 0,14 µM (Mittelwert für EGLN1/PHD2).

1.b) Zellulärer, funktioneller *in vitro*-Test:

Die Quantifizierung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt mit Hilfe einer rekombinanten Zelllinie. Die Zelle leitet sich ursprünglich von einer humanen Lungencarcinom-Zelllinie ab (A549, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, USA). Die Testzelllinie wird stabil mit einem Vektor transfiziert, der das Reportergen der *Photinus pyralis*-Luciferase (im folgenden Luciferase genannt) unter der Kontrolle eines artifiziellen Minimalpromotors enthält. Der Minimalpromotor besteht aus zwei Hypoxie-responsiblen Elementen stromaufwärts einer TATA-Box [Oehme F., Ellinghaus P., Kolkhof P., Smith T.J., Ramakrishnan S., Hütter J., Schramm M., Flamme I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296** (2), 343-9 (2002)]. Unter Einwirkung von Hypoxie (z.B. Kultivierung in Gegenwart von 1% Sauerstoff für 24 Stunden) oder unter Einwirkung unselektiver Dioxygenase-Inhibitoren (z.B. Desferroxamin in einer Konzentration von 100 µM, Cobaltchlorid in einer Konzentration von 100 µM oder *N*-Oxalylglycindiethylester in einer Konzentration von 1 mM) produziert die Testzelllinie Luciferase, die mit Hilfe geeigneter Biolumineszenz-Reagenzien (z.B. Steady-Glo® Luciferase Assay System, Promega Corporation,

Madison, WI 53711, USA) und eines geeigneten Luminometers detektiert und quantifiziert werden kann.

Testablauf: Die Zellen werden am Tag vor dem Test in einer exakt bemessenen Menge Kulturmedium (DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin) in 384- oder 1536-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert und in einem Zellinkubator (96% Luftfeuchtigkeit, 5% v/v CO_2, 37°C) gehalten. Am Testtag werden dem Kulturmedium die Testsubstanzen in abgestuften Konzentrationen zugesetzt. In als Negativkontrolle dienenden Ansätzen wird den Zellen keine Testsubstanz zugesetzt. Als Positivkontrolle zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Zelle für Inhibitoren wird z.B. Desferroxamin in einer Endkonzentration von 100 µM zugesetzt. Sechs bis 24 Stunden nach Übertragung der Testsubstanzen in die Löcher der Mikrotiterplatten wird das resultierende Lichtsignal im Luminometer gemessen. Anhand der Meßwerte wird eine Dosiswirkungsbeziehung aufgestellt, die als Grundlage für die Ermittlung der halbmaximalen Wirkkonzentration (als EC_{50}-Wert bezeichnet) dient.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) weist in dem hier beschriebenen Test einen EC_{50}-Wert von 7 µM auf.

1.c) Zellulärer, funktioneller *in vitro*-Test zur Veränderung der Genexpression:

Um die Veränderung der Expression spezifischer mRNAs in menschlichen Zelllinien nach Behandlung mit Testsubstanzen zu untersuchen, werden folgende Zelllinien auf 6- oder 24-Lochplatten kultiviert: humane Hepatomzellen (HUH, JCRB Cell Bank, Japan), humane embryonale Nierenfibroblasten (HEK/293, ATCC, Manassas, VA 20108, USA), humane Cervixcarcinomzellen (HeLa, ATCC, Manassas, VA 20108, USA), humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC, Cambrex, East Rutherford, New Jersey 07073, USA). 24 Stunden nach Zugabe der Testsubstanzen werden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Saline gewaschen und aus ihnen die Gesamt-RNA unter Verwendung einer geeigneten Methode gewonnen (z.B. Trizol®-Reagenz, Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland).

Für ein typisches Analyseexperiment wird je 1 µg der so gewonnenen Gesamt-RNA mit DNase I verdaut und unter Verwendung einer geeigneten Reversen-Transkriptase-Reaktion (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega Corporation, Madison, WI 53711, USA) in eine komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. 2.5% des so gewonnenen cDNA-Ansatzes werden jeweils für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Das Expressionsniveau der mRNA der zu untersuchenden Gene wird mittels der *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* **6** (10), 986-94 (1996)] unter Verwendung eines ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionsinstruments (Fa. Applied Biosystems, Inc.) untersucht. Die hierbei benutzten Primer-Sonden-Kombinationen werden mittels der Primer Express 1.5 Software (Fa.

Applied Biosystems, Inc.) generiert. Im einzelnen werden die mRNAs von Erythropoetin, Carboanhydrase IX, Lactatdehydrogenase A und vaskulärem Endothelzellwachstumsfaktor untersucht.

2. *In vivo*-Tests zum Nachweis der Wirkung im Kardiovaskularsystem

2.a) *In vivo*-Test zur Veränderung der Genexpression:

Mäusen oder Ratten werden die in geeigneten Lösungsmitteln gelösten Prüfverbindungen entweder oral durch Schlundsonden-Applikation, intraperitoneal oder intravenös verabfolgt. Typische Dosierungen sind 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. 4, 8 oder 24 Stunden nach Gabe der Prüfsubstanz werden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran und anschließendem Genickbruch getötet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Teile der Organe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus den Organteilen wird wie unter B.1.a) beschrieben Gesamt-RNA gewonnen und diese in eine cDNA übersetzt. Das Expressionsniveau der mRNA der zu untersuchenden Gene wird mittels der *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* **6** (10), 986-94 (1996)] unter Verwendung eines ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionsinstruments (Fa. Applied Biosystems, Inc.) untersucht.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt im Vergleich mit der Placebo-Kontrolle nach oraler oder parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der mRNA des Erythropoetins in der Niere.

2.b) Bestimmung des Erythropoetin-Spiegels im Serum:

Mäusen oder Ratten wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel entweder intraperitoneal oder oral einmal oder zweimal täglich verabreicht. Typische Dosierungen sind 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Placebo-Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. Vor der Applikation und vier Stunden nach der letzten Substanzgabe wird den Tieren in Kurznarkose aus dem retroorbitalen Venenplexus oder der Schwanzvene Blut entnommen. Das Blut wird durch Zusatz von Lithium-Heparin ungerinnbar gemacht. Durch Zentrifugieren wird das Blutplasma gewonnen. In dem Blutplasma wird mit Hilfe eines Erythropoetin-ELISA (Quantikine® mouse Epo Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) entsprechend der Anleitung des Herstellers der Gehalt an Erythropoetin bestimmt. Die Meßwerte werden anhand einer für Maus-Erythropoetin erhobenen Referenzmessung in pg/ml umgerechnet.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt nach oraler und parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg des Plasma-Erythropoetins gegenüber dem Ausgangswert und der Placebo-Kontrolle.

2.c) Bestimmung der zellulären Zusammensetzung des peripheren Blutes:

Mäusen oder Ratten wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel entweder intraperitoneal oder oral einmal oder zweimal täglich über mehrere Tage verabreicht. Typische Dosierungen sind z.B. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. Am Versuchsende wird den Tieren in Kurznarkose aus dem Venenplexus des Augenwinkels oder der Schwanzvene Blut entnommen und durch Zusatz von Natriumcitrat ungerinnbar gemacht. In einem geeigneten elektronischen Messgerät werden in den Blutproben die Konzentrationen von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten bestimmt. Die Konzentration der Retikulozyten wird anhand von Blutausstrichen, die mit einer dafür geeigneten Farblösung (Fa. KABE Labortechnik, Nümbrecht) gefärbt werden, durch mikroskopische Durchmusterung von je 1000 Erythrozyten bestimmt. Für die Bestimmung des Hämatokrits wird Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer Hämatokritkapillare entnommen und der Hämatokritwert nach Zentrifugieren der Kapillare in einer dafür geeigneten Zentrifuge manuell abgelesen.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt nach oraler und parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl und der Retikulozyten gegenüber dem Ausgangswert und der Placebo-Kontrolle.

C. **Ausführungsbeispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen**

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können folgendermaßen in pharmazeutische Zubereitungen überführt werden:

Tablette:

Zusammensetzung:

100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 50 mg Lactose (Monohydrat), 50 mg Maisstärke (nativ), 10 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP 25) (Fa. BASF, Ludwigshafen, Deutschland) und 2 mg Magnesiumstearat.

Tablettengewicht 212 mg. Durchmesser 8 mm, Wölbungsradius 12 mm.

Herstellung:

Die Mischung aus erfindungsgemäßer Verbindung, Lactose und Stärke wird mit einer 5%-igen Lösung (m/m) des PVPs in Wasser granuliert. Das Granulat wird nach dem Trocknen mit dem Magnesiumstearat 5 Minuten gemischt. Diese Mischung wird mit einer üblichen Tablettenpresse verpresst (Format der Tablette siehe oben). Als Richtwert für die Verpressung wird eine Presskraft von 15 kN verwendet.

Oral applizierbare Suspension:

Zusammensetzung:

1000 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 1000 mg Ethanol (96%), 400 mg Rhodigel® (Xanthan gum der Fa. FMC, Pennsylvania, USA) und 99 g Wasser.

Einer Einzeldosis von 100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung entsprechen 10 ml orale Suspension.

Herstellung:

Das Rhodigel wird in Ethanol suspendiert, die erfindungsgemäße Verbindung wird der Suspension zugefügt. Unter Rühren erfolgt die Zugabe des Wassers. Bis zum Abschluß der Quellung des Rhodigels wird ca. 6 h gerührt.

Oral applizierbare Lösung:

Zusammensetzung:

500 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 2.5 g Polysorbat und 97 g Polyethylenglycol 400. Einer Einzeldosis von 100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung entsprechen 20 g orale Lösung.

Herstellung:

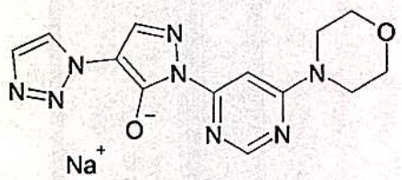
Die erfindungsgemäße Verbindung wird in der Mischung aus Polyethylenglycol und Polysorbat unter Rühren suspendiert. Der Rührvorgang wird bis zur vollständigen Auflösung der erfindungsgemäßen Verbindung fortgesetzt.

i.v.-Lösung:

Die erfindungsgemäße Verbindung wird in einer Konzentration unterhalb der Sättigungslöslichkeit in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel (z.B. isotonische Kochsalzlösung, Glucoselösung 5% und/oder PEG 400-Lösung 30%) gelöst. Die Lösung wird steril filtriert und in sterile und pyrogenfreie Injektionsbehältnisse abgefüllt.

Patentansprüche

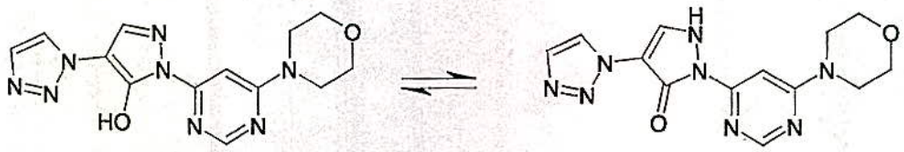
1. Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat entsprechend der Verbindung der Formel (II)



(II)

2. Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (II) in kristalliner Form vorliegt.

3. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I)



(Ia) (I) (Ib)

in einem Lösungsmittel mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umgesetzt wird.

4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umgesetzt wird.

5. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, unter Zusatz von Triethylamin, umgesetzt wird.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

7. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

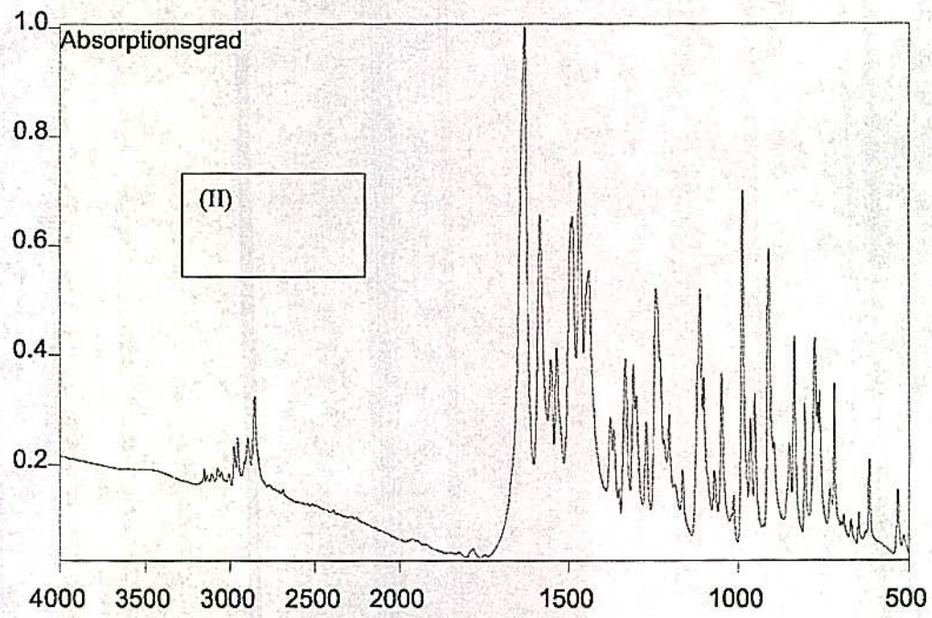
8. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Herzinsuffizienz, Anämie, chronischen Nierenerkrankungen und Niereninsuffizienz.

9. Arzneimittel enthaltend die Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in Kombination mit einem inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff .

10. Arzneimittel enthaltend die Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in Kombination mit einem weiteren Wirkstoff.

11. Arzneimittel nach Anspruch 9 oder 10 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Herzinsuffizienz, Anämie, chronischen Nierenerkrankungen und Niereninsuffizienz.

Abb. 1 IR-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)



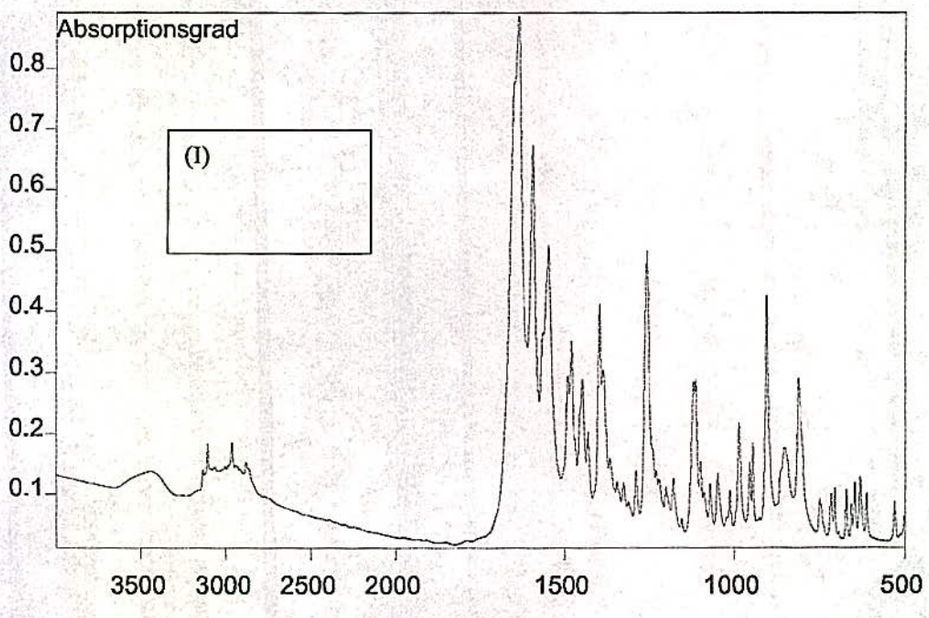
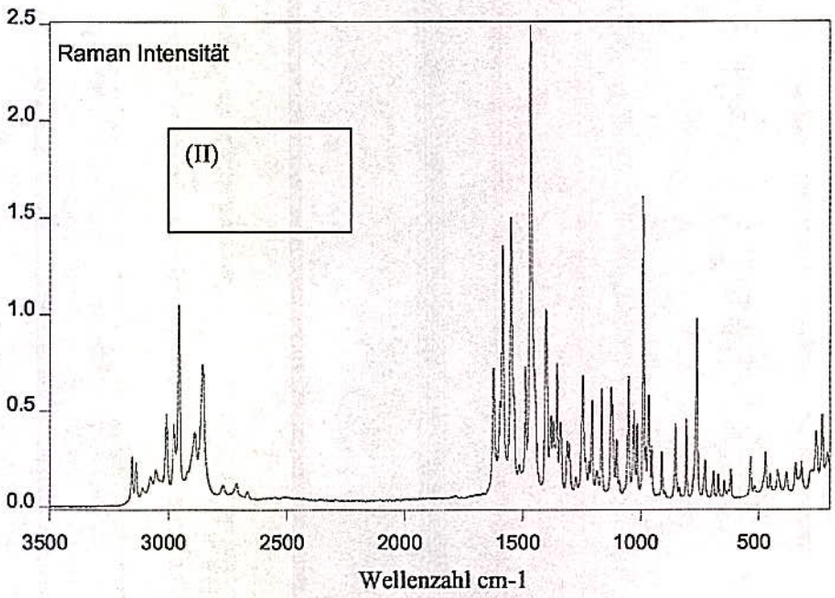


Abb. 2 Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)



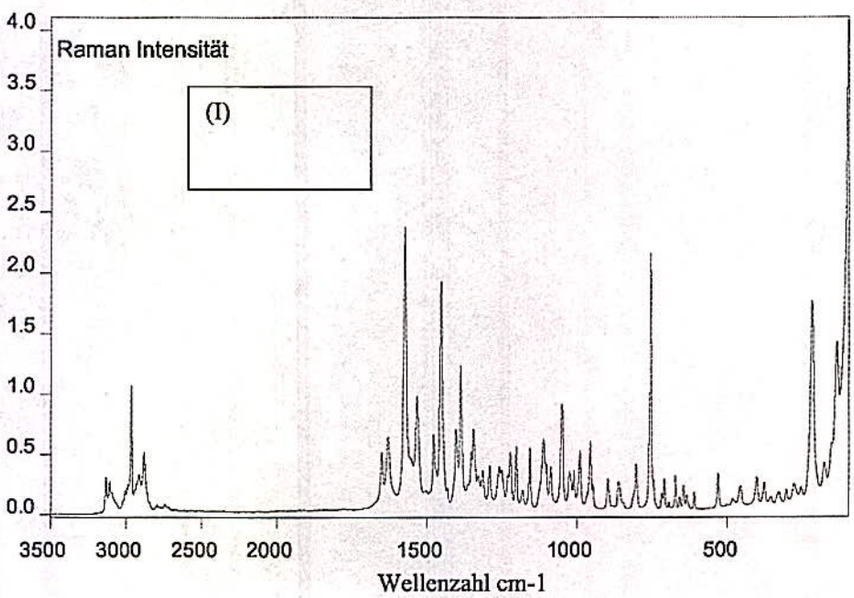
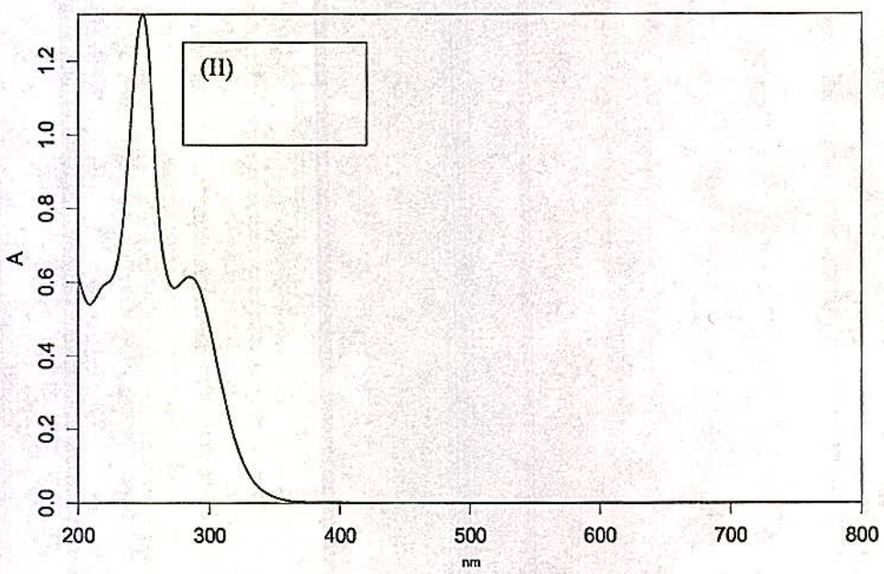


Abb. 3 UV/VIS Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)



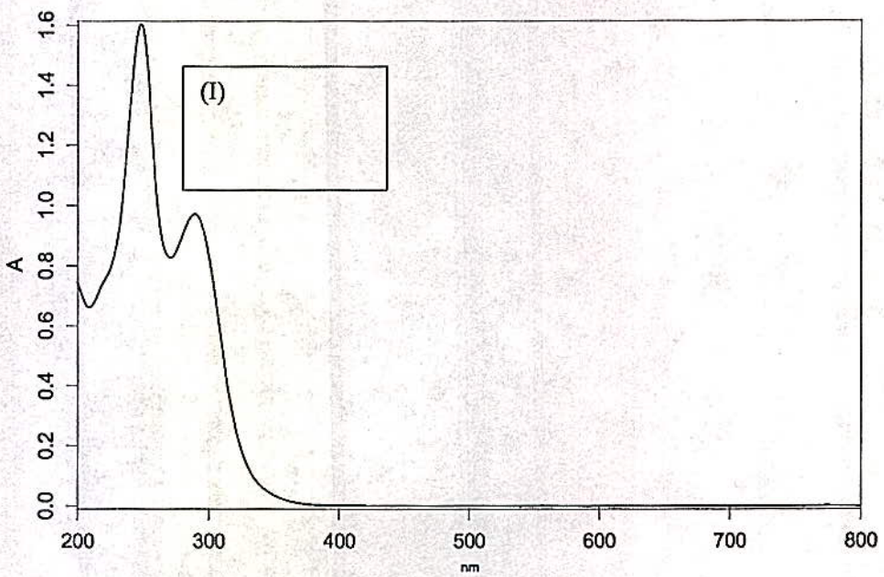


Abb. 4: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

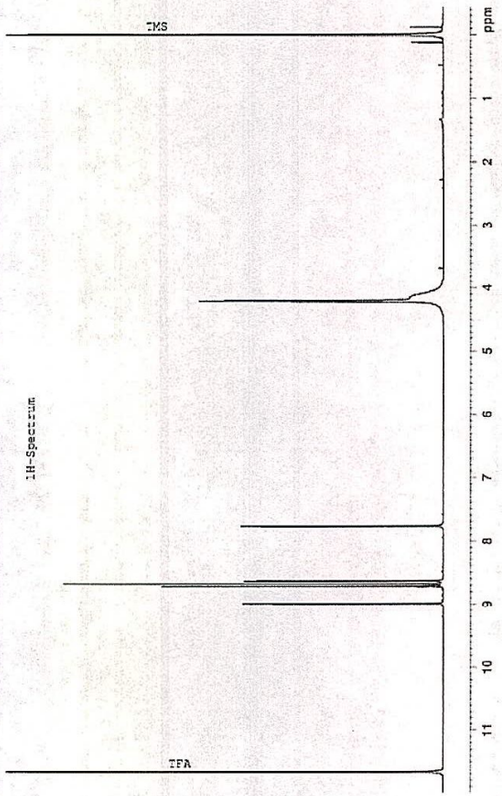


Abb. 5: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

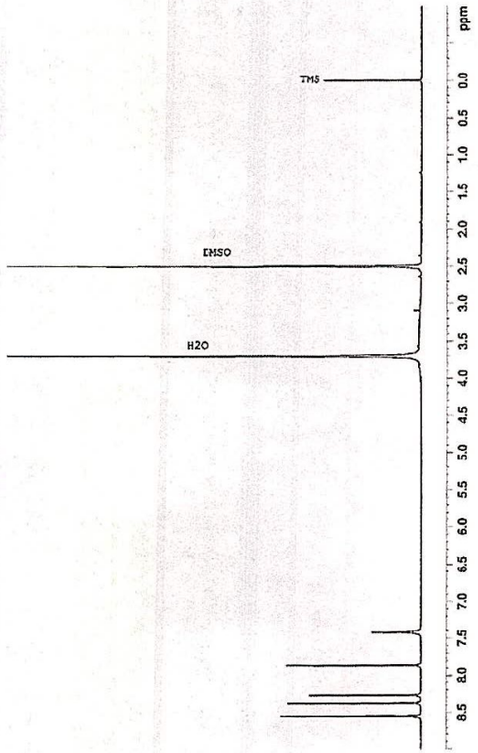


Abb. 6: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

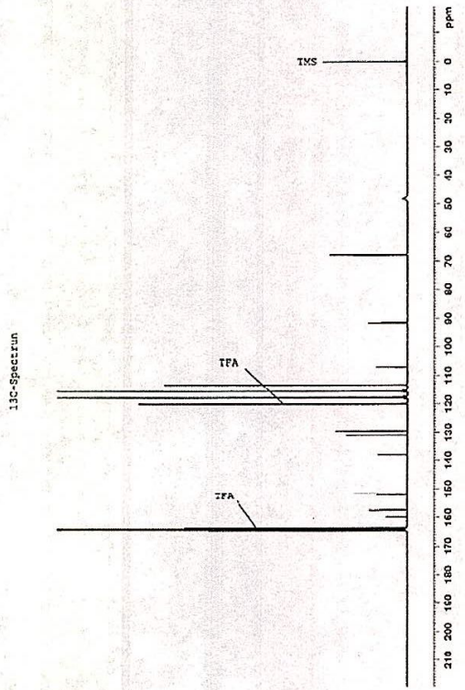


Abb. 7: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

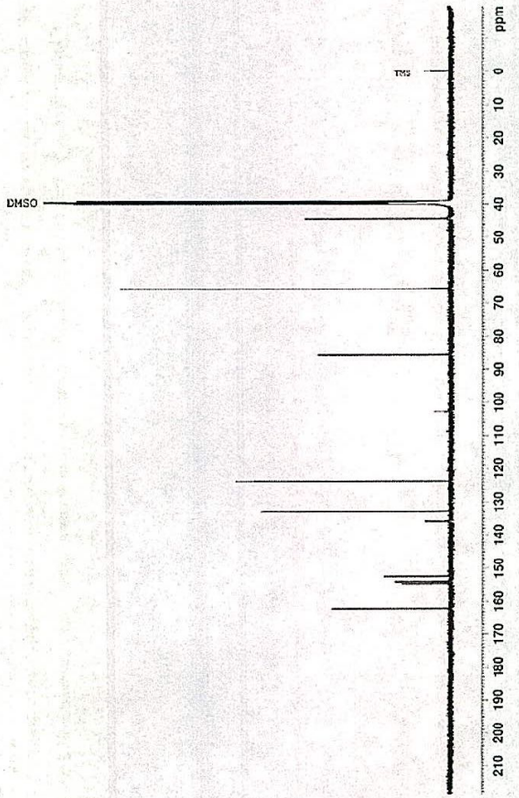


Abb. 8: Massenspektrum der Verbindung der Formel (II)

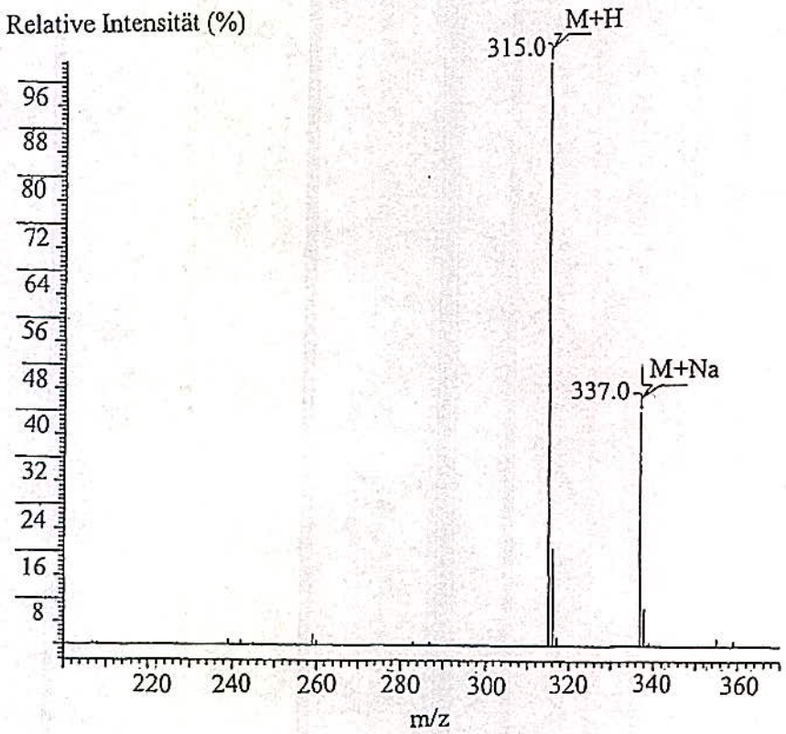


Abb. 9: Massenspektrum der Verbindung der Formel (I)

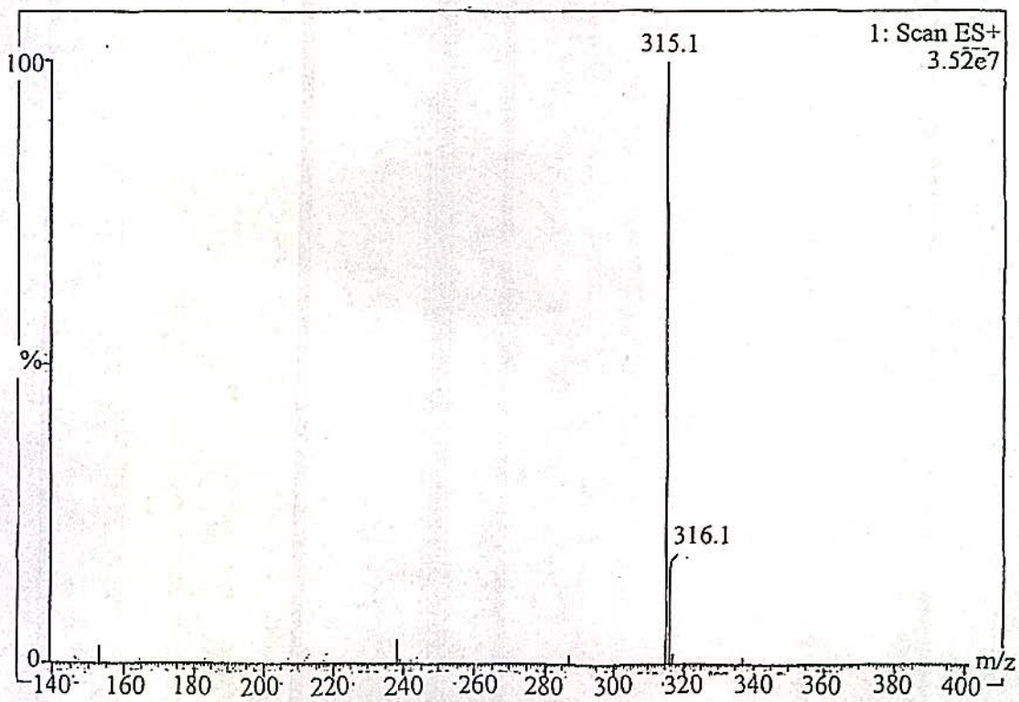


Abb. 10: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (II)

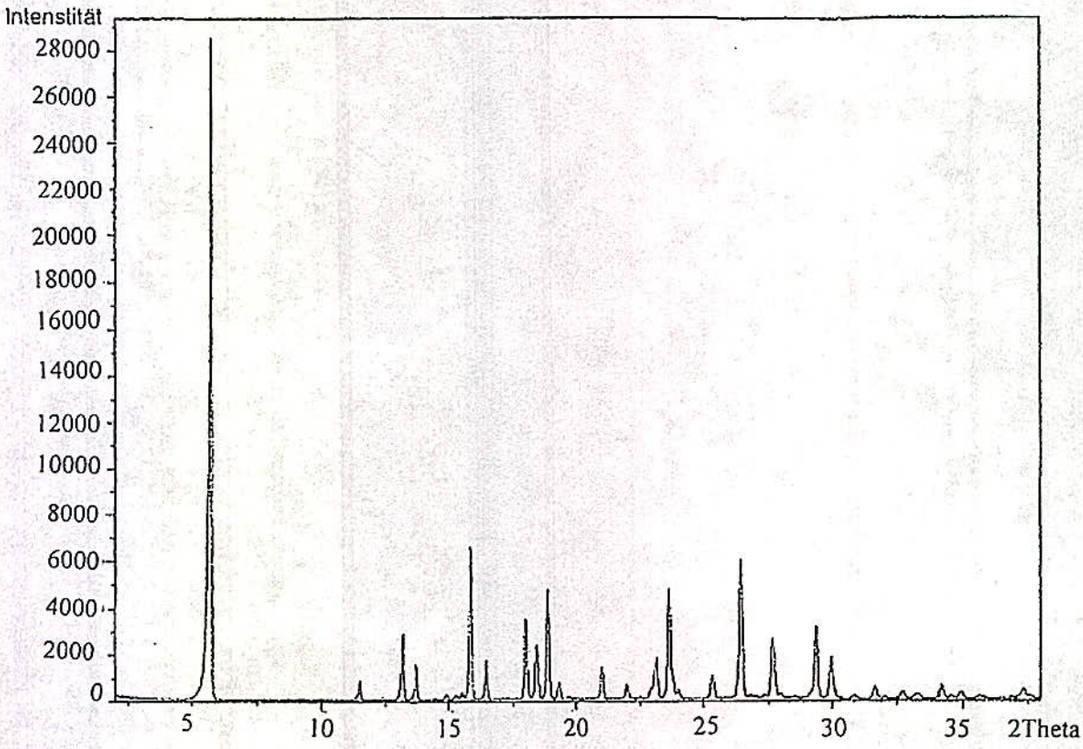
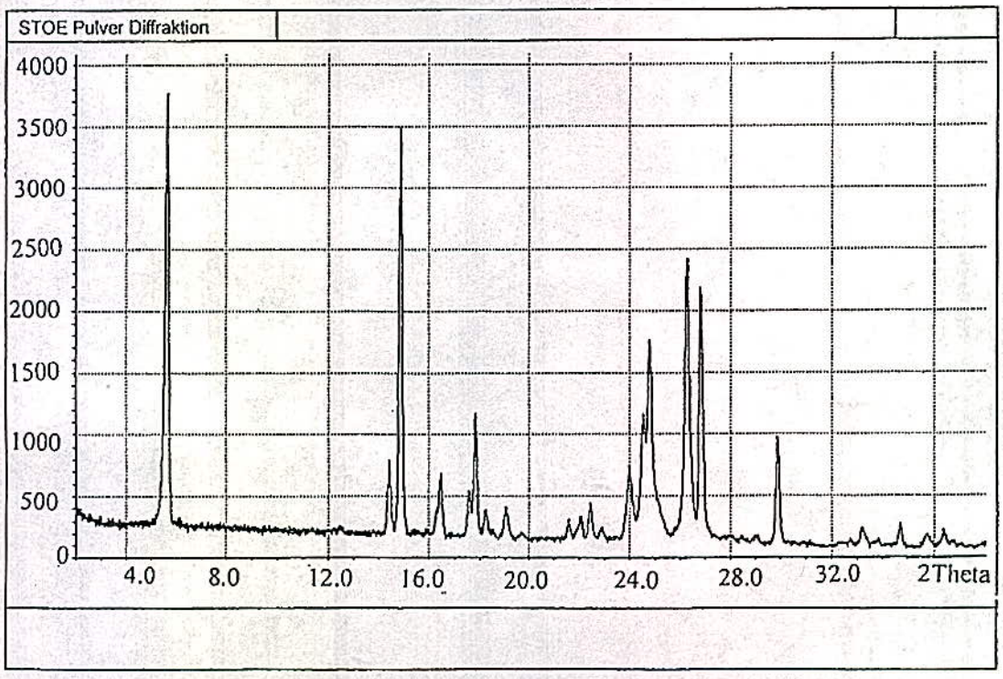


Abb. 11: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (I)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/070099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D403/14 A61K31/506 A61P9/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/067871 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; THEDE KAI [DE]; FLAMME INGO [DE]; OEHME FELI) 12 June 2008 (2008-06-12) cited in the application page 1, lines 2-6 page 29, line 7 - page 31, line 14 examples 71,72 page 151; table 1 -----	6-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 December 2011	28/12/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoepfner, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/070099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008067871 A1	12-06-2008	AR 063392 A1	28-01-2009
		AU 2007328052 A1	12-06-2008
		CA 2667382 A1	12-06-2008
		CN 101631785 A	20-01-2010
		CR 10750 A	16-09-2009
		DE 102006050516 A1	30-04-2008
		EP 2084151 A1	05-08-2009
		EP 2383269 A2	02-11-2011
		JP 2010507602 A	11-03-2010
		JP 2011006486 A	13-01-2011
		KR 20090074811 A	07-07-2009
		MA 30914 B1	02-11-2009
		PE 08952008 A1	05-09-2008
		SV 2009003236 A	19-01-2010
		TW 200833330 A	16-08-2008
		US 2010305085 A1	02-12-2010
		UY 30663 A1	31-05-2008
		WO 2008067871 A1	12-06-2008
		ZA 200902705 A	30-06-2010

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/070099

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07D403/14 A61K31/506 A61P9/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07D

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2008/067871 A1 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; THEDE KAI [DE]; FLAMME INGO [DE]; OEHME FELI) 12. Juni 2008 (2008-06-12) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeilen 2-6 Seite 29, Zeile 7 - Seite 31, Zeile 14 Beispiele 71,72 Seite 151; Tabelle 1 -----	6-11

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. Dezember 2011	28/12/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoepfner, Wolfgang

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/070099

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008067871 A1	12-06-2008	AR 063392 A1	28-01-2009
		AU 2007328052 A1	12-06-2008
		CA 2667382 A1	12-06-2008
		CN 101631785 A	20-01-2010
		CR 10750 A	16-09-2009
		DE 102006050516 A1	30-04-2008
		EP 2084151 A1	05-08-2009
		EP 2383269 A2	02-11-2011
		JP 2010507602 A	11-03-2010
		JP 2011006486 A	13-01-2011
		KR 20090074811 A	07-07-2009
		MA 30914 B1	02-11-2009
		PE 08952008 A1	05-09-2008
		SV 2009003236 A	19-01-2010
		TW 200833330 A	16-08-2008
		US 2010305085 A1	02-12-2010
		UY 30663 A1	31-05-2008
		WO 2008067871 A1	12-06-2008
		ZA 200902705 A	30-06-2010

97

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2012/065967
PCT/EP2011/070099

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION, OBTENTION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
Creative Campus Monheim
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)* 12 April 2013 (12.04.2013)	
Applicant's or agent's file reference BHC101047-WO	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/EP2011/070099	International filing date *(day/month/year)* 15 November 2011 (15.11.2011)
International publication date *(day/month/year)* 24 May 2012 (24.05.2012)	Priority date *(day/month/year)* 18 November 2010 (18.11.2010)
Applicant BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH et al	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-*bis*)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
18 November 2010 (18.11.2010)	10 2010 044 131.7	DE	20 February 2012 (20.02.2012)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-*bis*). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-*bis*) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-*bis*)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-*bis*), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Authorized officer
Agnès Wittmann-Regis
e-mail pt06.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 06

98

PATENT COOPERATION TREATY PCT/EP2011/070099

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
Creative Campus Monheim
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)*
01 October 2012 (01.10.2012)

Applicant's or agent's file reference
BHC101047-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2011/070099

International filing date *(day/month/year)*
15 November 2011 (15.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
Müller Strasse 178
13353 Berlin
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The common representative has also changed, as indicated in the addressee box at the top of this form.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Nissen Diana
e-mail diana.nissen@wipo.int
Telephone No. +4122 338 8054

99

WIPO
WORLD
INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:		**PCT/EP2011/070099**
International filing date:		**15 November 2011 (15.11.2011)**
Document type:		**Certified copy of priority document**
Document details:	Country/Office:	**DE**
	Number:	**10 2010 044 131.7**
	Filing date:	**18 November 2010 (18.11.2010)**
Date of receipt at the International Bureau:		**20 February 2012 (20.02.2012)**

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-*bis*)

34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
www.wipo.int

100

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP11/070099

Prioritätsbescheinigung
DE 10 2010 044 131.7
über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:	10 2010 044 131.7
Anmeldetag:	18. November 2010
Anmelder/Inhaber:	Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft, 13353 Berlin, DE
Bezeichnung:	Substituiertes Natrium-1H-pyrazol-5-olat
IPC:	C07D 413/14; A61K 31/5377; A61P 9/00; A61P 13/12

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 18. November 2010 eingereichten elektronischen Dokumente dieser Patentanmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Druckverfahren bedingten Farbabweichungen.

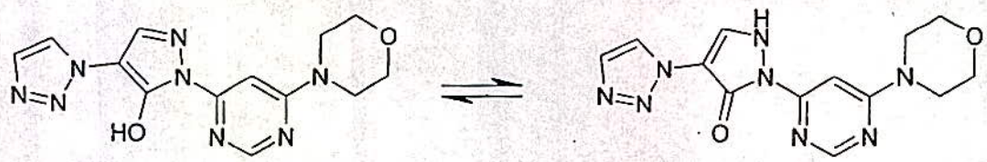
München, den 5. Oktober 2011
Deutsches Patent- und Markenamt
Die Präsidentin
Im Auftrag

Rüschenschmidt

Substituiertes Natrium-1H-pyrazol-5-olat

Die vorliegende Anmeldung betrifft Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat, Verfahren zu dessen Herstellung, dessen Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie dessen Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen, von Nierenerkrankungen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Die Verbindung der Formel (I), 1-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-ol (Enol-Form; Formel (Ia)) bzw. 2-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on (Keto-Form; Formel (Ib)), ist aus WO 2008/067871 bekannt.



(Ia) (I) (Ib)

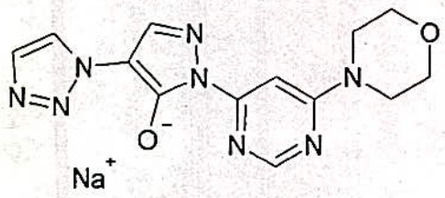
Die Verbindung der Formel (I) wirkt als Hemmstoff der HIF-Prolyl-4-Hydroxylasen und führt aufgrund dieses spezifischen Wirkmechanismus *in vivo* nach parenteraler oder oraler Verabreichung die Induktion von HIF-Zielgenen, wie z.B. Erythropoetin, und der hierdurch verursachten biologischen Prozesse, wie z.B. Erythropoese, herbei.

Die Verbindung der Formel (I) ist hygroskopisch und nimmt bei üblichen Umgebungsbedingungen (20-35°C, Normaldruck) bereits oberhalb einer relativen Luftfeuchtigkeit von 20 %rF bis zu etwa 6 Gew% Wasser auf. Die Aufnahme von 6 Gew% Wasser ist bei einer Luftfeuchte von 30 %rF nahezu erreicht. Eine Wasser enthaltende Verbindung der Formel (I) gibt bei abnehmender Luftfeuchte unterhalb von 30 %rF Teile des enthaltenen Wassers wieder ab. Diese Wasseraufnahme beziehungsweise Wasserabgabe erschweren den Umgang mit der Verbindung der Formel (I), z. B. Wägeprozesse, und die Herstellung der Verbindung der Formel (I) in einer gleichbleibenden, stabilen und definierten Form für den Einsatz in Arzneimitteln beziehungsweise die Herstellung von Arzneimitteln enthaltend die Verbindung der Formel (I). Insbesondere erhöht sich dadurch der technische Aufwand bei der Herstellung von Applikationsformen enthaltend die Verbindung der Formel (I), wie z.B. Tabletten, Granulaten oder Trinklösungen, da für eine gleichbleibende Konzentration der Verbindung der Formel (I) Maßnahmen zur Kontrolle und zur Regelung der Luftfeuchtigkeit erforderlich sind.

DRN:20101119990000020EP AKZ:102010044131.7 Eingangsdatum:18.11.2010

Es wurde nun überraschend gefunden, dass aus der Verbindung der Formel (I) ein Natriumsalz hergestellt werden kann, das gegenüber der Verbindung der Formel (I) entscheidende Vorteile aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat entsprechend der Verbindung der Formel (II)



(II)

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) in kristalliner Form vor.

Durch den erfindungsgemäßen Einsatz der Verbindung der Formel (II) wird sichergestellt, dass eine im Vergleich zur bekannten Verbindung der Formel (I) signifikant höhere Stabilität gegenüber der Aufnahme beziehungsweise Abgabe von Wasser bei schwankender Luftfeuchtigkeit erreicht wird. Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) enthält weniger als 0,5 Gew% Wasser, ist nicht hygroskopisch und ändert unter üblichen Umgebungsbedingungen (20-35°C, Normaldruck) auch bei erhöhter Luftfeuchte bis zu 90 %rF seinen Wassergehalt nur minimal, d. h. weniger als 0,5 Gew%. Die Verbindung der Formel (II) ist technisch deutlich leichter handhabbar, d. h. bei Wägeprozessen, und insbesondere wenn es darum geht, eine gleichbleibende Konzentration der Verbindung der Formel (II) in einer Applikationsform, wie z.B. einem Granulat, einer Trinklösung oder einer Tablette, zu gewährleisten. Darüber hinaus weist die Verbindung der Formel (II) gegenüber der Verbindung der Formel (I) eine erhöhte Löslichkeit in Wasser auf.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II), dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I)

DRN:20101119990000020EP AKZ:102010044131.7 Eingangsdatum:18.11.2010



(Ia) (I) (Ib)

in einem Lösungsmittel mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umsetzt wird.

Bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II), dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umsetzt wird.

Die Umsetzung mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmittel, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 20°C bis 120°C, besonders bevorzugt in einem Temperaturbereich von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck. Die Verbindung der Formel (II) wird aus der erhaltenen Suspension bei einer Temperatur zwischen -20°C und 80°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C, bei Normaldruck durch Filtration isoliert und anschließend getrocknet.

Findet die Umsetzung unter Zusatz einer Base statt, wird die Verbindung der Formel (I) im Allgemeinen zunächst unter Zugabe einer organischen Base in einem Lösungsmittel bei einer Temperatur von 20°C bis 120°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck gelöst und anschließend die Verbindung der Formel (II) durch Zugabe von Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz bei einer Temperatur von 20°C bis 120°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 40°C bis 70°C, bei Normaldruck gefällt. Die Verbindung der Formel (II) wird aus der erhaltenen Suspension bei einer Temperatur zwischen -20°C und 80°C, bevorzugt bei einer Temperatur von 0°C bis 20°C, bei Normaldruck durch Filtration isoliert und anschließend getrocknet.

Natriumhydroxid und wässrige Natronlauge und das Natrium-Salz werden in einem Molverhältnis von 0,8 bis 2 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt. Bevorzugt werden Natriumhydroxid und wässrige Natronlauge und das Natrium-Salz in einem Molverhältnis von 1,0 bis 1,4 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt.

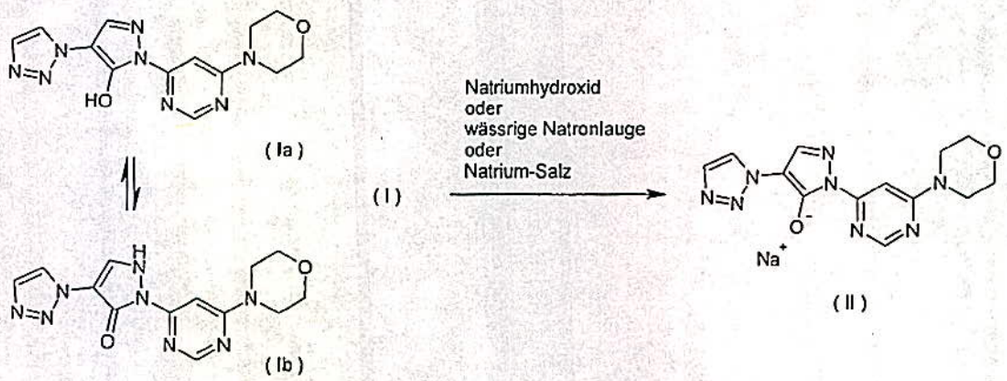
Als Natrium-Salz eigenen sich beispielsweise Salze organischer Säuren wie Natriumcarboxylate, wie beispielsweise Natriumacetat oder Natriumcitrat, oder Salze anorganischer Säuren wie beispielsweise Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumphosphat, Natriumhydrogenphosphat oder Natriumchlorid.

Als Lösungsmittel eignen sich niedere Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, n-Propanol, iso-Propanol, n-Butanol, sec-Butanol, iso-Butanol, 1-Pentanol, oder Tetrahydrofuran, oder Acetonitril, oder Toluol, oder 1,4-Dioxan oder Gemische der genannten Lösungsmittel, oder Gemische der genannten Lösungsmittel mit Wasser. Bevorzugt sind Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Tetrahydrofuran oder Gemische der genannten Lösungsmittel mit Wasser. Besonders bevorzugt sind Mischungen von Methanol oder Ethanol mit Wasser in einem Verhältnis zwischen 1 : 1 und 50 : 1 (v/v), ganz besonders bevorzugt sind Mischungen von Methanol mit Wasser in einem Verhältnis zwischen 7 : 3 und 30 : 1 (v/v).

Als organische Basen eignen sich tertiäre Amine wie beispielsweise Triethylamin oder Diisopropylethylamin. Bevorzugt ist Triethylamin. Die organische Base wird in einem Verhältnis von 0 bis 4 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt. Bevorzugt wird die organische Base in einem Verhältnis von 0,7 bis 1,5 Moläquivalenten bezüglich der Verbindung der Formel (I) eingesetzt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) kann durch das folgende Reaktionsschema veranschaulicht werden:

Schema



Erklärungen zu den Abbildungen:

Abbildung 1: IR-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 2: Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 3: UV/VIS Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 4: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

DRN:20101119990000020EP AKZ:102010044131.7 Eingangsdatum:18.11.2010

Abbildung 5: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 6: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 7: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 8: Massenspektrum der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 9: Massenspektrum der Verbindung der Formel (I)

Abbildung 10: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (II)

Abbildung 11: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (I)

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zeigt ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum. Sie eignet sich daher zur Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten bei Menschen und Tieren.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zeichnet sich als spezifischer Hemmstoff der HIF-Prolyl-4-Hydroxylasen aus.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften zur Behandlung und/oder Prophylaxe von kardiovaskulären Krankheiten, insbesondere von Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit, Angina pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Arteriosklerose, essentieller, pulmonaler und maligner Hypertonie sowie peripherer arterieller Verschlusskrankheit eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich weiterhin zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Störungen der Blutbildung, wie z.B. idiopathischen Anämien, renaler Anämie und Anämien in Begleitung einer Tumor-Erkrankung (insbesondere einer Chemotherapie-induzierten Anämie), einer Infektion (insbesondere HIV-Infektion) oder einer anderen entzündlichen Erkrankung wie z.B. rheumatoider Arthritis. Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist darüber hinaus geeignet zur unterstützenden Behandlung von Anämien infolge Blutverlust, Eisenmangel-Anämie, Vitaminmangel-Anämie (z.B. infolge Vitamin B12-Mangel oder infolge Folsäure-Mangel), hypoplastischer und aplastischer Anämie, hämolytischer Anämie oder zur unterstützenden Behandlung von Anämien in Folge von Eisenverwertungsstörungen (sideroachrestische Anämie) oder Anämien infolge anderer endokriner Störungen (z.B. Hypothyreose).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist ferner geeignet zur Steigerung des Hämatokrits mit dem Ziel der Gewinnung von Blut zur Eigenblutspende vor Operationen.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann außerdem zur Behandlung und/oder Prophylaxe von operationsbedingten Ischämiezuständen und deren Folgeerscheinungen nach chirurgischen Eingriffen, insbesondere Eingriffen am Herzen unter Verwendung einer Herz-Lungenmaschine (z.B. Bypass-Operationen, Herzklappen-Implantationen), Eingriffen an den Halsschlagadern, Eingriffen an der Körperschlagader (Aorta) und Eingriffen mit instrumenteller Öffnung oder Durchdringung der Schädelkalotte verwendet werden. Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich ferner zur allgemeinen Behandlung und/oder Prophylaxe bei chirurgischen Eingriffen mit dem Ziel einer Beschleunigung der Wundheilung und Verkürzung der Rekonvaleszenzzeit.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) ist darüber hinaus zur Behandlung und Prophylaxe von Folgeerscheinungen akuter und protrahierter Ischämiezustände des Gehirns geeignet (z.B. Schlaganfall, Geburtsasphyxie).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann ferner zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs und zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer im Zuge der Behandlung von Krebs auftretenden Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes insbesondere nach Therapie mit Zytostatika, Antibiotika und Bestrahlungen eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eignet sich ferner zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und anderen den Autoimmunerkrankungen zuzurechnenden Krankheitsformen und insbesondere zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer im Zuge der medikamentösen Behandlung derartiger Erkrankungen auftretenden Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) eingesetzt werden zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen des Auges (z.B. Glaukom), des Gehirns (z.B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Demenz, chronisches Schmerzempfinden), von chronischen Nierenerkrankungen, Niereninsuffizienz und akutem Nierenversagen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Weiterhin eignet sich erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe einer insbesondere im höheren Lebensalter gehäuft auftretenden allgemeinen körperlichen Schwäche bis hin zur Kachexie.

Ferner eignet sich erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe sexueller Dysfunktion.

Außerdem ist die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen, wie z.B. diabetischer Makro- und Mikroangiopathie, diabetischer Nephropathie und Neuropathie, geeignet.

Weiterhin eignet sich die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen z.B. des Herzens, der Lunge und der Leber.

Insbesondere ist die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) auch zur Prophylaxe und Behandlung der Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum) geeignet.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen, unter Verwendung einer wirksamen Menge der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (II).

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann allein oder bei Bedarf in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt werden. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, enthaltend die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, insbesondere zur Behandlung und/oder Prävention der zuvor genannten Erkrankungen. Als geeignete Kombinationswirkstoffe seien beispielhaft und vorzugsweise genannt: ACE-Inhibitoren, Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten, Beta-Rezeptor-Blocker, Calcium-Antagonisten, PDE-Inhibitoren, Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, Diuretika, Aspirin, Eisen-Supplements, Vitamin B12- und Folsäure-Supplements, Statine, Digitalis (Digoxin)-Derivate, Tumor-Chemotherapeutika sowie Antibiotika.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem ACE-Inhibitor, wie beispielhaft und vorzugsweise Enalapril, Captopril, Lisinopril, Ramipril, Delapril, Fosinopril, Quinopril, Perindopril oder Trandopril, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Angiotensin AII-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Losartan, Candesartan, Valsartan, Telmisartan oder Embusartan, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem beta-Rezeptoren-Blocker, wie beispielhaft und vorzugsweise Propranolol, Atenolol, Timolol, Pindolol, Alprenolol, Oxprenolol, Penbutolol, Bupranolol, Metipranolol, Nadolol, Mepindolol, Carazalol, Sotalol, Metoprolol, Betaxolol, Celiprolol, Bisoprolol, Carteolol, Esmolol, Labetalol, Carvedilol, Adaprolol, Landiolol, Nebivolol, Epanolol oder Bucindolol, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Calcium-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Nifedipin, Amlodipin, Verapamil oder Diltiazem, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor, wie beispielhaft und vorzugsweise Milrinone, Amrinone, Pimobendan, Cilostazol, Sildenafil, Vardenafil oder Tadalafil, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, wie beispielhaft und vorzugsweise Spironolacton, Eplerenon, Canrenon oder Kalium-Canrenoat, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Diuretikum, wie beispielhaft und vorzugsweise Furosemid, Bumetanid, Torsemid, Bendroflumethiazid, Chlorthiazid, Hydrochlorthiazid, Hydroflumethiazid, Methyclothiazid, Polythiazid, Trichlormethiazid, Chlorthalidon, Indapamid, Metolazon, Quinethazon, Acetazolamid, Dichlorphenamid, Methazolamid, Glycerin, Isosorbid, Mannitol, Amilorid oder Triamteren, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor aus der Klasse der Statine, wie beispielhaft und vorzugsweise Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, Rosuvastatin, Cerivastatin oder Pitavastatin, verabreicht.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Tumor-Chemotherapeutikum verabreicht, beispielhaft und vorzugsweise aus der Gruppe der Platin-Komplexe, wie z.B. Cisplatin und Carboplatin, der Alkylantien, wie z.B. Cyclophosphamid und Chlorambucil, der Antimetabolite, wie z.B. 5-Fluoruracil und Methotrexat, der Topoisomerase-Hemmer, wie z.B. Etoposid und Camptothecin, der Antibiotika, wie z.B. Doxorubicin und Daunorubicin, oder der Kinase-Inhibitoren, wie z.B. Sorafenib und Sunitinib.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in Kombination mit einem Antibiotikum verabreicht, beispielhaft und vorzugsweise aus der Gruppe der Penicilline, Cephalosporine oder Chinolone, wie z.B. Ciprofloxacin und Moxifloxacin.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II), üblicherweise zusammen mit einem oder mehreren inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen enthalten, sowie deren Verwendung zu den zuvor genannten Zwecken.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck kann sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie z.B. oral, parenteral, pulmonal, nasal, sublingual, lingual, buccal, rectal, dermal, transdermal, conjunctival, otisch oder als Implantat bzw. Stent.

Für diese Applikationswege kann die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) in geeigneten Applikationsformen verabreicht werden.

Für die orale Applikation eignen sich nach dem Stand der Technik funktionierende, die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) schnell und/oder modifiziert abgebende Applikationsformen, wie z.B. Tabletten (nicht-überzogene oder überzogene Tabletten, beispielsweise mit magensaftresistenten oder sich verzögert auflösenden oder unlöslichen Überzügen, die die Freisetzung der erfindungsgemäßen Verbindung kontrollieren), in der Mundhöhle schnell zerfallende Tabletten oder Filme/Oblaten, Filme/Lyophylisate, Kapseln (beispielsweise Hart- oder Weichgelatinekapseln), Dragees, Granulate, Pellets, Pulver, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole oder Lösungen.

Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. intramuskulär, subcutan, intracutan, percutan oder intraperitoneal). Für die parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Lyophilisaten oder sterilen Pulvern.

Für die sonstigen Applikationswege eignen sich z.B. Inhalationsarzneiformen (u.a. Pulverinhalatoren, Nebulizer), Nasentropfen, -lösungen oder -sprays, lingual, sublingual oder buccal zu applizierende Tabletten, Filme/Oblaten oder Kapseln, Suppositorien, Ohren- oder Augenpräparationen, Vaginalkapseln, wäßrige Suspensionen (Lotionen, Schüttelmixturen), lipophile Suspensionen, Salben, Cremes, transdermale therapeutische Systeme (z.B. Pflaster), Milch, Pasten, Schäume, Streupuder, Implantate oder Stents.

Bevorzugt sind die orale oder parenterale Applikation, insbesondere die orale und die intravenöse Applikation.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) kann in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch Mischen mit inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen geschehen. Zu diesen Hilfsstoffen zählen u.a. Trägerstoffe (beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Lactose, Mannitol), Lösungsmittel (z.B. flüssige Polyethylenglycole), Emulgatoren und Dispergier- oder Netzmittel (beispielsweise Natriumdodecylsulfat, Polyoxysorbitanoleat), Bindemittel (beispielsweise Polyvinylpyrrolidon), synthetische und natürliche Polymere (beispielsweise Albumin), Stabilisatoren (z.B. Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure), Farbstoffe (z.B. anorganische Pigmente wie beispielsweise Eisenoxide) und Geschmacks- und/oder Geruchskorrigentien.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei parenteraler Applikation Mengen von etwa 0,001 bis 1 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 0,5 mg/kg Körpergewicht zur Erzielung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen. Bei oraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 100 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 20 mg/kg und ganz besonders bevorzugt 0,1 bis 10 mg/kg Körpergewicht.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten gegenüber dem Wirkstoff, Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Applikation erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung. Die Erfindung ist nicht auf die Beispiele beschränkt.

Die Prozentangaben in den folgenden Tests und Beispielen sind, sofern nicht anders angegeben, Gewichtsprozente; Teile sind Gewichtsteile. Lösungsmittelverhältnisse, Verdünnungsverhältnisse und Konzentrationsangaben von flüssig/flüssig-Lösungen beziehen sich jeweils auf das Volumen.

A. **Beispiele**

Abkürzungen:

ACN	Acetonitril
bS	breites Singulett
D	Dublett
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry)
Gew%	Gewichtsprozent
n.d.	nicht detektiert
NMR	Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
rF	relative Feuchte
S	Singulett
sec	Sekunden
T	Triplett
v/v	Volumen/Volumen
δ	Deformationsschwingungen
ν	Streckschwingungen

Ausgangsverbindungen:

Beispiel 1A

2-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)acrylsäuremethylester

450 g 2-(1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)essigsäureethylester wurden in 3,5 l Methanol gelöst, mit 30 g Triethylamin versetzt und 16 h bei 22°C gerührt. Anschließend wurden im Vakuum alle Lösungsmittel abdestilliert. Man erhielt 410 g der Titelverbindung als Öl.

Beispiel 2A

3-(Dimethylamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäuremethylester

400 g 2-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)acrylsäuremethylester wurden mit 522 g Dimethylformamid-dimethylacetal versetzt und zum Sieden erhitzt. Entstehende Leichtsieder wurden abdestilliert. Nach 4 h wurde auf 55°C abgekühlt und 1050 ml Methyl-tert-butylether / 2-Propanol (3 : 1 v/v) wurden zudosiert. Die erhaltene Suspension wurde auf 22°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrfach mit Methyl-tert-butylether gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Man erhielt 493 g der Titelverbindung als Feststoff.

Beispiel 3A

1-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-ol (Enol-Form; Formel (Ia)) bzw. 2-[6-(Morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on (Keto-Form; Formel (Ib))

20 g 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin und 24,6 g (2E/Z)-3-(Dimethylamino)-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäuremethylester in 210 ml Ethylacetat wurden mit 5,84 g Trifluoressigsäure versetzt und 24 h unter Rückfluss gerührt. Die erhaltene Suspension wurde auf 0°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat gewaschen, scharf abgesaugt und anschließend in 160 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde durch Zugabe von 4,5 ml Essigsäure auf etwa pH 5 eingestellt, weitere 15 Minuten gerührt und filtriert. Der Filterkuchen wurde zweimal mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 26,0 g (79,4 % d. Th.) der Titelverbindung.

Die Herstellung der Verbindungen 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin (Beispiel Nr. 16A), 2-(1*H*-1,2,3-Triazol-1-yl)essigsäureethylester (Beispiel Nr. 39A) und 3-(Dimethylamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäureethylester (Beispiel Nr. 3A) wurde bereits in WO 2008/067871 beschrieben.

Die Herstellung der Verbindung 2-(6-Morpholin-4-ylpyrimidin-4-yl)-4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-on aus 4-(6-Hydrazinopyrimidin-4-yl)morpholin und 3-(Dimethylamino)-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acrylsäureethylester wurde ebenfalls in WO 2008/067871 beschrieben (Beispiel Nr. 71).

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II))

Beispiel 1.1

10 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 50 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) suspendiert. Zu der Suspension wurden 3,4 g 45%ige Natronlauge unter Rühren gegeben und weitere 50 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) hinzugefügt. Die Suspension wurde auf 50°C erwärmt und 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurde auf 0°C abgekühlt, 1 h bei 0°C nachgerührt und filtriert. Der

erhaltene Filterkuchen wurde mit Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 10,1 g der Verbindung der Formel (II); 6,8 Gew% Na

Beispiel 1.2

5 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 60 ml Ethanol/Wasser (1 : 1 v/v) suspendiert und bei 22°C mit 1,41 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die Suspension wurde 3 Tage bei 50°C und 2 h bei 20°C gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit 10 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4 g der Verbindung der Formel (II).

Beispiel 1.3

30,25 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 150 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) bei 22°C suspendiert. 13,3 ml Triethylamin wurden zugegeben und die Mischung wurde auf 60°C erwärmt. Nach 15 min. wurde die erhaltene fast klare Lösung filtriert, der Filter mit 10 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) nachgewaschen und das gesammelte Filtrat bei 60°C langsam mit 10,3 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die erhaltene Suspension wird mit wenigen Kristallen der Verbindung der Formel (II) versetzt, 1 h bei 60°C nachgerührt, anschließend langsam auf 0°C abgekühlt und filtriert. Der Filterkuchen wird mit 15 ml Methanol/Wasser (9 : 1 v/v) gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 25,1 g der Verbindung der Formel (II).

Beispiel 1.4

25 g der Verbindung aus Beispiel 3A wurden in 150 ml Methanol/Wasser (1 : 1 v/v) suspendiert und mit 11 ml Triethylamin versetzt. Die erhaltene Lösung wurde auf 60°C erwärmt und mit 8,5 g 45%iger Natronlauge versetzt. Die erhaltene Suspension wurde langsam auf 22°C abgekühlt, 2 h bei 22°C und anschließend 1 h bei 0-5°C gerührt. Nach Filtration wurde der Filterkuchen mit 15 ml Methanol/Wasser (1 : 1 v/v) gewaschen und im Vakuum bei 40°C getrocknet. Ausbeute: 26 g der Verbindung der Formel (II).

Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC):

Die Thermogramme wurden unter Verwendung eines Differential Scanning Calorimeters DSC 7 bzw. Pyris-1 und Thermogravimetric Analyser TGA 7 der Fa. Perkin-Elmer erhalten.

Differential Scanning Calorimeter DSC 7 bzw. Pyris-1; Hersteller: Perkin-Elmer; Heizrate: 2 und 20 K/min: Spülgas: Stickstoff; Tiegel: nicht gasdichte Aluminium-Tiegel; Probenvorbereitung: keine.

Thermogravimetric Analyzer TGA 7; Hersteller: Perkin-Elmer; Heizrate: 10 $Kmin^{-1}$; Spülgas: Stickstoff, 20-30 ml/min; Tiegel: offener Platin-Tiegel; Probenvorbereitung: keine.

Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II)) zersetzt sich oberhalb von 300°C ohne zu schmelzen.

Wasserdampfadsorption und Wasserdampfdesorption:

Die Feuchtesorptionsisotherme wurde mit einem Dynamic Vapour Sorption Analyzer IGA Sorp der Fa. Hiden Analytical aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 25°C. Es gab keine Probenvorbereitung.

Tabelle 1: Wasserdampfadsorption und Wasserdampfdesorption von Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat (Verbindung der Formel (II))

	Verbindung der Formel (II)		Verbindung der Formel (I)	
Relative	Adsorption	Desorption	Adsorption	Desorption
0 %rF	0 %	0 %	0,1 %	0,1 % (5 %rF)
10 %rF	0 %	0 %	0,2 %	0,1 %
20 %rF	0,1 %	0 %	0,3 %	0,2 %
30 %rF	0,1 %	0,1 %	4,8 %	4,7 %
40 %rF	0,2 %	0,2 %	5,1 %	5,2 %
50 %rF	0,2 %	0,3 %	5,3 %	5,4 %
60 %rF	0,2 %	0,3 %	5,4 %	5,6 %
70 %rF	0,4 %	0,4 %	5,6 %	5,6 %
80 %rF	0,4 %	0,5 %	5,7 %	5,7 %
90 %rF	0,8 %	0,8 %	5,9 %	5,9 %

Löslichkeitsdaten:

Methode: Gesättigte Lösungen der Prüfsubstanz wurden durch 16stündiges Rühren einer Suspension in Wasser bei 25°C hergestellt. Die erhaltenen Suspensionen wurden anschließend filtriert und der Gehalt im Filtrat wurde mittels HPLC-Messung bestimmt.

Tabelle 2: Löslichkeiten in Wasser

	Verbindung der Formel (II)	Verbindung der Formel (I)
Löslichkeit in Wasser bei 25°C [mg/100ml]	2800	14,3

IR and Raman Spektroskopie:

Für die Messung von IR- und Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) wurden Bruker FT/IR-Spektrometer IFS 66v und Bruker FT/Raman-Spektrometer MultiRAM mit folgenden Parametern verwendet:

	IR	Raman
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Anzahl der Einzelmessungen (Scans)	32	64
Wellenzahlbereich	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 200 cm^{-1}
Probenvorbereitung	KBr Pressling	keine

Tabelle 3: Zuordnung charakteristischer Schwingungsbanden in den IR- bzw. Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II)

Strukturelement	IR–Bandenlage (cm^{-1})	Raman-Bandenlage (cm^{-1})
ν =C-H	3153 – 3006	3153 – 3010
ν C-H	2976 – 2855	2978 – 2856
ν C=C, ν C=N	1630 – 1439	1623 – 1401
ν C-N	1241	1244
ν C-O	1112	1118
δ =C-H $_{in\ phase}$	987	988

Für die Messung von IR- und Raman-Spektren der Verbindung der Formel (I) wurden Bruker FT/IR-Spektrometer Vertex 80v und Bruker FT/Raman-Spektrometer MultiRAM mit folgenden Parametern verwendet:

	IR	Raman
Spektrale Auflösung	2 cm^{-1}	2 cm^{-1}
Anzahl der Einzelmessungen (Scans)	32	64
Wellenzahlbereich	4000 - 500 cm^{-1}	3500 - 100 cm^{-1}
Probenvorbereitung	KBr disc	non

Tabelle 4: Zuordnung charakteristischer Schwingungsbanden in den IR- bzw. Raman-Spektren der Verbindung der Formel (I)

Strukturelement	IR–Bandenlage (cm^{-1})	Raman-Bandenlage (cm^{-1})
ν O-H	3441	-
ν =C-H	3135 – 3108	3134 – 3006
ν C-H	2965 – 2884	2967 – 2884
ν C=C, ν C=N, δ C-H	1636 – 1345	1650 – 1345
ν C-O_{Ether}	1257	1259

UV/VIS-Spektroskopie:

UV/VIS-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer Spektrometer (Lambda 40P) mit den folgenden Bedingungen bzw. Parametern gemessen:

Küvette: Durchgangslänge 1cm; Quartzglas
Wellenzahlbereich: 200 - 800 nm
Öffnungsspalt: 1 nm
Probenvorbereitung: Ca. 1 mg/100ml Acetonitril/Wasser 1:1
Banden: 285; 249 nm Verbindung der Formel (II) und 289,3; 248,2 nm Verbindung der Formel (I)

Tabelle 5: Berechnung der spezifischen Absorption und des molaren Absorptionskoeffizienten

Verbindung der Formel	Lösungsmittel	Wellenlänge (nm)	Spezifische Absorption $A^{1\%}_{1cm}$ (liter/g * cm)	Molarer Absorptionskoeffizent ε (liter/mol * cm)
(I)	Acetonitril/ Wasser 1:1	249	1111	34928
(II)	Acetonitril/ Wasser 1:1	284	501.2	16855

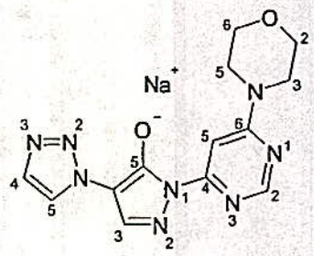
NMR-Spektroskopie:

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker NMR-Spektrometer (Advance) mit folgenden Bedingungen bzw. Parametern aufgenommen:

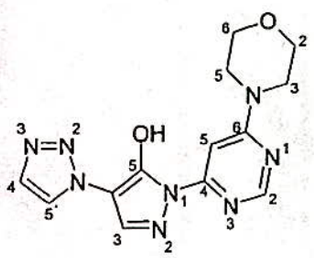
Verbindung der Formel (II)	^{1}H-NMR-Spektrum	^{13}C-NMR-Spektrum
Arbeitsfrequenz	500.13 MHz	125.76 MHz
Lösungsmittel	Trifluoressigsäure	Trifluoressigsäure
Konzentration	6.84 mg/ml	42.7 mg/ml
Interner Standard	Tetramethylsilan (TMS)	Tetramethylsilan (TMS)
Probenröhrchen-Durchmesser	5 mm	5 mm
Temperatur	25°C	25°C
Technik	Fouriertransformationstechnik	Fouriertransformationstechnik
Spektrale Breite	20.65 ppm	245.41 ppm
Digitale Auflösung	0.079 Hz/Pt	0.4710 Hz/Pt
Pulsdauer	2.83 µsec, 30° Anregungswinkel	9.1 µsec, 90° Anregungswinkel
Aufnahmedauer	6.399 sec	1.06 sec
Relaxationszeit	0.5 sec	4 sec
No. of free induction decays	32	128

Verbindung der Formel (I)	^{1}H-NMR-Spektrum	^{13}C-NMR-Spektrum
Arbeitsfrequenz	500.13 MHz	125.76 MHz
Lösungsmittel	Dimelhylsufoxid-d_6 (DMSO)	Dimethylsulfoxid-d_6 (DMSO)
Konzentration	6.3 mg/ml	35.8 mg/ml
Interner Standard	Tetramethylsilan (TMS)	Tetramethylsilan (TMS)
Probenröhrchen-Durchmesser	5 mm	5 mm
Temperatur	25°C	27°C
Technik	Fouriertransformationstechnik	Fouriertransformationstechnik
Spektrale Breite	20.65 ppm	240.89 ppm
Digitale Auflösung	0.079 Hz/Pt	0.9248 Hz/Pt
Pulsdauer	3.1 µsec, 30° Anregungswinkel	7.0 µsec, 90° Anregungswinkel
Aufnahmedauer	6.344 sec	1.08 sec
Relaxationszeit	0.5 sec	4 sec
No. of free induction decays	32	1024

Strukturformeln der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I) mit Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale



(II)



(I)

Tabelle 6: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative Protonenanzahl (Nummerierung der H-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

H-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der Protonen /Molekül
Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)			
H-2; H-3; H-5; H-6	4.00-4.25	M	8
pyrimidin-4-yl]-			
H-2	8.72	S	1
H-5	7.77	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
H-4	8.64	D J= 1.4 Hz	1
H-5	8.98	D J= 1.4 Hz	1
1H-pyrazol-5-olat			
H-3	8.68	S	1

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative Protonenanzahl (Nummerierung der H-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

H-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der Protonen /Molekül
1-[6-(morpholin-4-yl)			
H-2; H-3; H-5; H-6	3.71	S	8
pyrimidin-4-yl]-			
H-2	8.55	S	1
H-5	7.42	S	1

4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
H-4	7.86	D (0.6Hz)	1
H-5	8.38	D (0.6Hz)	1
1H-pyrazol-5-ol			
H-3	8.27	S	1
5-OH	n.d (c)	n.d.	1

Tabelle 8: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative C-Kernzahl in der Verbindung der Formel (II) (Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

C-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der C-Kerne /Molekül
Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)			
C-2; C-6	67.80	T	2
C-3; C-5	48.21	T	2
pyrimidin-4-yl]-			
C-2	151.65	D	1
C-4	152.01	S	1
C-5	91.48	D	1
C-6	159.90	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
C-4	130.93	D	1
C-5	129.57	D	1
1H-pyrazol-5-olat			
C-3	138.03	D	1
C-4	106.99	S	1
C-5	157.43	S	1

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I) - Chemische Verschiebung, Signalmultiplizität, relative C-Kernzahl in der Verbindung der Formel (I) (Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Strukturformel zur Zuordnung der jeweiligen NMR-Signale)

C-Atome	Chem. Verschiebung δ (ppm)	Multiplizität und Kopplungskonstanten	Anzahl der C-Kerne /Molekül
1-[6-(morpholin-4-yl			
C-2; C-6	65.56	T	2
C-3, C-5	44.29	T	2
pyrimidin-4-yl]-			
C-2	154.08	D	1
C-4	152.43	S	1
C-5	85.62	D	1
C-6	161.99	S	1
4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-			
C-4	132.94	D	1
C-5	123.68	D	1
1H-pyrazol-5-ol			
C-3	135.84	D	1
C-4	102.82	S	1
C-5	154.70	S	1

Massenspektroskopie:

Das Massenspektrum wurde auf einem Waters Massenspektrometer (ZQ) mit den nachfolgend aufgeführten Bedingungen bzw. Parametern aufgenommen:

Ionisationsmethode	ESI (Electronic Spray Ionization)
Lösungsmittel	Acetonitril/Wasser

Tabelle 10: Interpretation des Massenspektrums der Verbindung der Formel (II)

		Massenzahl (MZ)
Ionenbildung M+H	C13H14N8O2 + H	315
Ionenbildung M+Na	C13H14N8O2 + Na	337

Tabelle 11: Interpretation des Massenspektrums der Verbindung der Formel (I)

		Massenzahl (MZ)
Ionenbildung M+H	C13H15N8O2	315

Elementaranalyse:

Tabelle 12: Ergebnisse der Elementanalyse der Verbindung der Formel (II)

Element	gemessen (%)	berechnet (%)	Differenz (%)
C	46.1	46.4	0.3
H	4.0	3.9	0.1
N	33.1	33.3	0.2

Tabelle 13: Ergebnisse der Elementanalyse der Verbindung der Formel (I)

Element	gemessen (%)	berechnet (%)	Differenz (%)
C	49.5	49.7	0.2
H	4.4	4.5	0.1
N	35.5	35.7	0.2
O	12.6	10.2	2.4

Röntgendiffraktometrie:

Transmissionsdiffraktometer PANalytical X'Pert PRO mit PIXcel-Zähler (Multichannel):

Strahlung:	Kupfer, K alpha
Primär-Monochromator:	fokussierender Röntgenspiegel
Wellenlänge (K1):	1,5406 Å
Wellenlänge (K2):	1,5444 Å
Generatorparameter:	40 kV, 40 mA
Messbereich:	2-38°
Raumbedingungen:	25°C, 40 – 60 %rF

bzw.

STOE Pulver Diffraktions-System:

Diffraktometer :	Transmission
Monochromator :	Curved Germanium (111)
Generator :	45 kV, 35 mA
Wellenlänge :	1.540598 Cu
Detektor :	Linear PSD
Scan Mode :	Transmission / Moving PSD / Fixed omega
Scan Type :	2Theta:Omega
Raumbedingungen:	25°C, 40 – 60 %rF

Tabelle 13: Pulverröntgendiffraktometrie der Verbindung der Formel (II)

Verbindung der Formel (II) Reflexe [2 Theta]	
5,7	23,6
11,5	25,3
13,2	26,4
13,7	26,9
15,8	27,7
16,4	27,7
18,4	29,4
18,9	29,9
19,3	30,0
21,0	30,7
22,0	31,5
23,1	31,6

Tabelle 14: Pulverröntgendiffraktometrie der Verbindung der Formel (I)

Verbindung der Formel (I) Reflexe [2 Theta]	
5,6	24,6
14,4	24,8
14,9	25,1
16,3	26,3
16,5	26,8
17,6	28
17,8	28,5
18,2	29
18,5	29,9
19	32,4
19,7	32,7
21,6	33,2
22	33,8
22,4	34,7
22,9	35,7
24	36,4
24,5	36,7

B. **Bewertung der pharmakologischen Wirksamkeit**

Die pharmakologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen können in folgenden Assays gezeigt werden:

Abkürzungen:

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Calf Serum
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. ***In vitro*-Tests zur Bestimmung der Aktivität und Selektivität von HIF-Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitoren**

1.a) Hemmung der Aktivität von HIF-Prolylhydroxylase:

Hydroxylierter HIF bindet spezifisch an den von Hippel-Lindau Protein-Elongin B-Elongin C-Komplex (VBC-Komplex). Diese Interaktion tritt nur auf, wenn HIF an einem konservierten Prolylrest hydroxyliert ist. Sie ist die Grundlage für die biochemische Bestimmung der HIF-Prolylhydroxylase-Aktivität. Der Test wird wie beschrieben durchgeführt [Oehme F., Jonghaus W., Narouz-Ott L., Huetter J., Flamme I., *Anal. Biochem.* **330** (1), 74-80 (2004)]:

Eine klare, mit NeutrAvidin HBC beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte (Fa. Pierce) wird für 30 Minuten mit Blocker-Casein inkubiert. Anschließend wird die Platte dreimal mit je 200 µl Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Blocker-Casein, 0.05% (v/v) Tween 20) pro Loch gewaschen. Das Peptid Biotin-DLDLEMLAPYIPMDDDFQL (Fa. Eurogentec, 4102 Seraing, Belgien) wird in einer Konzentration von 400 nM in 100 µl Waschpuffer zugegeben. Dieses Peptid dient als Substrat für die Prolylhydroxylierung und wird an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach 60 Minuten Inkubation wird die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten mit 1 mM Biotin in Blocker-Casein inkubiert und dann erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Durchführung der Prolylhydroxylase-Reaktion wird das an die Platte gebundene Peptidsubstrat 1 bis 60 Minuten mit einem Prolylhydroxylase-haltigen Zelllysat inkubiert. Die Reaktion findet in 100 µl Reaktionspuffer (20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 µM–1 mM 2-Oxoglutarat, 10 µM $FeSO_4$, 2 mM Ascorbat) bei Raumtemperatur statt. Die Reaktionsmischung enthält außerdem den zu testenden Hemmstoff der Prolylhydroxylase in verschiedenen Konzentrationen. Die Testsubstanz wird bevorzugt, aber nicht ausschließlich bei Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 µM eingesetzt. Durch dreimaliges Waschen der Platte mit Waschpuffer wird die Reaktion gestoppt.

Zur quantitativen Bestimmung der Prolylhydroxylierung wird ein Fusionsprotein, das sowohl Thioredoxin aus E. coli als auch den VBC-Komplex enthält, in 80 µl Bindungspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 120 mM NaCl) zugegeben. Nach 15 Minuten werden 10 µl einer Lösung von polyklonalem Anti-Thioredoxin-Antikörper aus Kaninchen in Bindungspuffer zugefügt. Nach weiteren 30 Minuten setzt man 10 µl einer Lösung von mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Anti-Kaninchen-Immunglobulin in Bindungspuffer hinzu. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundenen VBC-Komplex und Antikörper zu entfernen. Um die Menge an gebundenem VBC-Komplex zu bestimmen, wird 15 Minuten mit TMB inkubiert. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure beendet. Durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm wird die Menge an gebundenem VBC-Komplex bestimmt. Sie ist proportional zur Menge an hydroxyliertem Prolin im Peptidsubstrat.

Zur Detektion der Prolylhydroxylierung kann alternativ ein mit Europium (Fa. Perkin Elmer) gekoppelter VBC-Komplex verwendet werden. In diesem Fall wird die Menge an gebundenem VBC-Komplex durch zeitaufgelöste Fluoreszenz bestimmt. Außerdem ist die Verwendung von mit [^{35}S]-Methionin markiertem VBC-Komplex möglich. Hierfür kann der radioaktiv markierte VBC-Komplex durch *in vitro*-Transkription-Translation in Retikulozytenlysat hergestellt werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) hemmt die Aktivität der HIF-Prolylhydroxylase in diesem Test mit einem IC_{50}-Wert von 0,47 µM (Mittelwert für EGLN2/PHD1) bzw. 0,14 µM (Mittelwert für EGLN1/PHD2).

1.b) Zellulärer, funktioneller *in vitro*-Test:

Die Quantifizierung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt mit Hilfe einer rekombinanten Zelllinie. Die Zelle leitet sich ursprünglich von einer humanen Lungencarcinom-Zelllinie ab (A549, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, USA). Die Testzelllinie wird stabil mit einem Vektor transfiziert, der das Reportergen der *Photinus pyralis*-Luciferase (im folgenden Luciferase genannt) unter der Kontrolle eines artifiziellen Minimalpromotors enthält. Der Minimalpromotor besteht aus zwei Hypoxie-responsiblen Elementen stromaufwärts einer TATA-Box [Oehme F., Ellinghaus P., Kolkhof P., Smith T.J., Ramakrishnan S., Hütter J., Schramm M., Flamme I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296** (2), 343-9 (2002)]. Unter Einwirkung von Hypoxie (z.B. Kultivierung in Gegenwart von 1% Sauerstoff für 24 Stunden) oder unter Einwirkung unselektiver Dioxygenase-Inhibitoren (z.B. Desferroxamin in einer Konzentration von 100 µM, Cobaltchlorid in einer Konzentration von 100 µM oder *N*-Oxalylglycindiethylester in einer Konzentration von 1 mM) produziert die Testzelllinie Luciferase, die mit Hilfe geeigneter Biolumineszenz-Reagenzien (z.B. Steady-Glo® Luciferase Assay System, Promega Corporation,

Madison, WI 53711, USA) und eines geeigneten Luminometers detektiert und quantifiziert werden kann.

Testablauf: Die Zellen werden am Tag vor dem Test in einer exakt bemessenen Menge Kulturmedium (DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin) in 384- oder 1536-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert und in einem Zellinkubator (96% Luftfeuchtigkeit, 5% v/v CO_2, 37°C) gehalten. Am Testtag werden dem Kulturmedium die Testsubstanzen in abgestuften Konzentrationen zugesetzt. In als Negativkontrolle dienenden Ansätzen wird den Zellen keine Testsubstanz zugesetzt. Als Positivkontrolle zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Zelle für Inhibitoren wird z.B. Desferroxamin in einer Endkonzentration von 100 µM zugesetzt. Sechs bis 24 Stunden nach Übertragung der Testsubstanzen in die Löcher der Mikrotiterplatten wird das resultierende Lichtsignal im Luminometer gemessen. Anhand der Meßwerte wird eine Dosiswirkungsbeziehung aufgestellt, die als Grundlage für die Ermittlung der halbmaximalen Wirkkonzentration (als EC_{50}-Wert bezeichnet) dient.

Die erfindungsgemäße Verbindung der Formel (II) weist in dem hier beschriebenen Test einen EC_{50}-Wert von 7 µM auf.

1.c) Zellulärer, funktioneller *in vitro*-Test zur Veränderung der Genexpression:

Um die Veränderung der Expression spezifischer mRNAs in menschlichen Zelllinien nach Behandlung mit Testsubstanzen zu untersuchen, werden folgende Zelllinien auf 6- oder 24-Lochplatten kultiviert: humane Hepatomzellen (HUH, JCRB Cell Bank, Japan), humane embryonale Nierenfibroblasten (HEK/293, ATCC, Manassas, VA 20108, USA), humane Cervixcarcinomzellen (HeLa, ATCC, Manassas, VA 20108, USA), humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC, Cambrex, East Rutherford, New Jersey 07073, USA). 24 Stunden nach Zugabe der Testsubstanzen werden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Saline gewaschen und aus ihnen die Gesamt-RNA unter Verwendung einer geeigneten Methode gewonnen (z.B. Trizol®-Reagenz, Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland).

Für ein typisches Analyseexperiment wird je 1 µg der so gewonnenen Gesamt-RNA mit DNase I verdaut und unter Verwendung einer geeigneten Reversen-Transkriptase-Reaktion (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega Corporation, Madison, WI 53711, USA) in eine komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. 2.5% des so gewonnenen cDNA-Ansatzes werden jeweils für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Das Expressionsniveau der mRNA der zu untersuchenden Gene wird mittels der *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* 6 (10), 986-94 (1996)] unter Verwendung eines ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionsinstruments (Fa. Applied Biosystems, Inc.) untersucht. Die hierbei benutzten Primer-Sonden-Kombinationen werden mittels der Primer Express 1.5 Software (Fa.

Applied Biosystems, Inc.) generiert. Im einzelnen werden die mRNAs von Erythropoetin, Carboanhydrase IX, Lactatdehydrogenase A und vaskulärem Endothelzellwachstumsfaktor untersucht.

2. *In vivo*-Tests zum Nachweis der Wirkung im Kardiovaskularsystem

2.a) *In vivo*-Test zur Veränderung der Genexpression:

Mäusen oder Ratten werden die in geeigneten Lösungsmitteln gelösten Prüfverbindungen entweder oral durch Schlundsonden-Applikation, intraperitoneal oder intravenös verabfolgt. Typische Dosierungen sind 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. 4, 8 oder 24 Stunden nach Gabe der Prüfsubstanz werden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran und anschließendem Genickbruch getötet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Teile der Organe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus den Organteilen wird wie unter B.1.a) beschrieben Gesamt-RNA gewonnen und diese in eine cDNA übersetzt. Das Expressionsniveau der mRNA der zu untersuchenden Gene wird mittels der *real time quantitative polymerase chain reaction* [TaqMan-PCR; Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., *Genome Res.* 6 (10), 986-94 (1996)] unter Verwendung eines ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionsinstruments (Fa. Applied Biosystems, Inc.) untersucht.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt im Vergleich mit der Placebo-Kontrolle nach oraler oder parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der mRNA des Erythropoetins in der Niere.

2.b) Bestimmung des Erythropoetin-Spiegels im Serum:

Mäusen oder Ratten wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel entweder intraperitoneal oder oral einmal oder zweimal täglich verabreicht. Typische Dosierungen sind 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Placebo-Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. Vor der Applikation und vier Stunden nach der letzten Substanzgabe wird den Tieren in Kurznarkose aus dem retroorbitalen Venenplexus oder der Schwanzvene Blut entnommen. Das Blut wird durch Zusatz von Lithium-Heparin ungerinnbar gemacht. Durch Zentrifugieren wird das Blutplasma gewonnen. In dem Blutplasma wird mit Hilfe eines Erythropoetin-ELISA (Quantikine® mouse Epo Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) entsprechend der Anleitung des Herstellers der Gehalt an Erythropoetin bestimmt. Die Meßwerte werden anhand einer für Maus-Erythropoetin erhobenen Referenzmessung in pg/ml umgerechnet.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt nach oraler und parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg des Plasma-Erythropoetins gegenüber dem Ausgangswert und der Placebo-Kontrolle.

2.c) Bestimmung der zellulären Zusammensetzung des peripheren Blutes:

Mäusen oder Ratten wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel entweder intraperitoneal oder oral einmal oder zweimal täglich über mehrere Tage verabreicht. Typische Dosierungen sind z.B. 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 300 mg Substanz pro kg Körpergewicht und Verabfolgung. Kontrolltiere erhalten nur Lösungsmittel. Am Versuchsende wird den Tieren in Kurznarkose aus dem Venenplexus des Augenwinkels oder der Schwanzvene Blut entnommen und durch Zusatz von Natriumcitrat ungerinnbar gemacht. In einem geeigneten elektronischen Messgerät werden in den Blutproben die Konzentrationen von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten bestimmt. Die Konzentration der Retikulozyten wird anhand von Blutausstrichen, die mit einer dafür geeigneten Farblösung (Fa. KABE Labortechnik, Nümbrecht) gefärbt werden, durch mikroskopische Durchmusterung von je 1000 Erythrozyten bestimmt. Für die Bestimmung des Hämatokrits wird Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer Hämatokritkapillare entnommen und der Hämatokritwert nach Zentrifugieren der Kapillare in einer dafür geeigneten Zentrifuge manuell abgelesen.

Die Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung führt nach oraler und parenteraler Verabreichung zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg des Hämatokrits, der Erythrozytenzahl und der Retikulozyten gegenüber dem Ausgangswert und der Placebo-Kontrolle.

C. **Ausführungsbeispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen**

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können folgendermaßen in pharmazeutische Zubereitungen überführt werden:

Tablette:

Zusammensetzung:

100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 50 mg Lactose (Monohydrat), 50 mg Maisstärke (nativ), 10 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP 25) (Fa. BASF, Ludwigshafen, Deutschland) und 2 mg Magnesiumstearat.

Tablettengewicht 212 mg. Durchmesser 8 mm, Wölbungsradius 12 mm.

Herstellung:

Die Mischung aus erfindungsgemäßer Verbindung, Lactose und Stärke wird mit einer 5%-igen Lösung (m/m) des PVPs in Wasser granuliert. Das Granulat wird nach dem Trocknen mit dem Magnesiumstearat 5 Minuten gemischt. Diese Mischung wird mit einer üblichen Tablettenpresse verpresst (Format der Tablette siehe oben). Als Richtwert für die Verpressung wird eine Presskraft von 15 kN verwendet.

Oral applizierbare Suspension:

Zusammensetzung:

1000 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 1000 mg Ethanol (96%), 400 mg Rhodigel® (Xanthan gum der Fa. FMC, Pennsylvania, USA) und 99 g Wasser.

Einer Einzeldosis von 100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung entsprechen 10 ml orale Suspension.

Herstellung:

Das Rhodigel wird in Ethanol suspendiert, die erfindungsgemäße Verbindung wird der Suspension zugefügt. Unter Rühren erfolgt die Zugabe des Wassers. Bis zum Abschluß der Quellung des Rhodigels wird ca. 6 h gerührt.

Oral applizierbare Lösung:

Zusammensetzung:

500 mg der erfindungsgemäßen Verbindung, 2.5 g Polysorbat und 97 g Polyethylenglycol 400. Einer Einzeldosis von 100 mg der erfindungsgemäßen Verbindung entsprechen 20 g orale Lösung.

Herstellung:

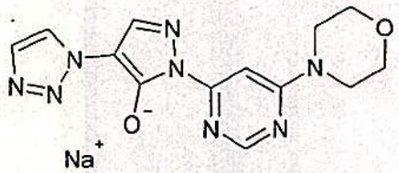
Die erfindungsgemäße Verbindung wird in der Mischung aus Polyethylenglycol und Polysorbat unter Rühren suspendiert. Der Rührvorgang wird bis zur vollständigen Auflösung der erfindungsgemäßen Verbindung fortgesetzt.

i.v.-Lösung:

Die erfindungsgemäße Verbindung wird in einer Konzentration unterhalb der Sättigungslöslichkeit in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel (z.B. isotonische Kochsalzlösung, Glucoselösung 5% und/oder PEG 400-Lösung 30%) gelöst. Die Lösung wird steril filtriert und in sterile und pyrogenfreie Injektionsbehältnisse abgefüllt.

Patentansprüche

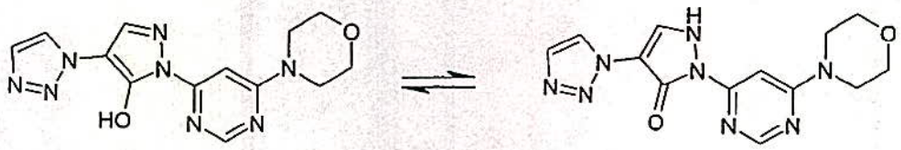
1. Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat entsprechend der Verbindung der Formel (II)



(II)

2. Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (II) in kristalliner Form vorliegt.

3. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I)



(Ia) (I) (Ib)

in einem Lösungsmittel mit Natriumhydroxid oder wässriger Natronlauge oder einem Natrium-Salz, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umsetzt wird.

4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel (II) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) in einem Lösungsmittel mit wässriger Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz einer Base, umsetzt wird.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

6. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

7. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Herzinsuffizienz, Anämie, chronischen Nierenerkrankungen und Niereninsuffizienz.

8. Arzneimittel enthaltend die Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in Kombination mit einem inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff..

9. Arzneimittel enthaltend die Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in Kombination mit einem weiteren Wirkstoff.

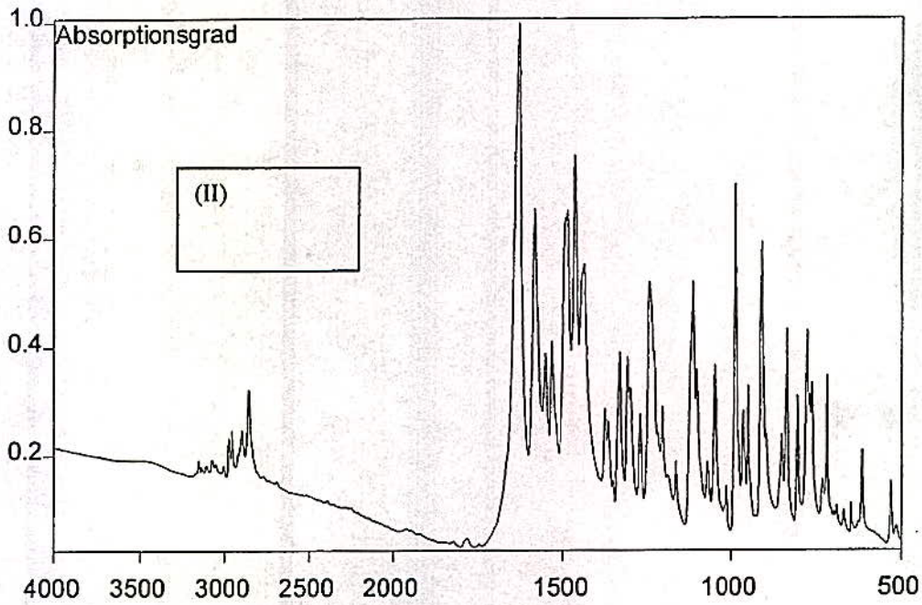
10. Arzneimittel nach Anspruch 8 oder 9 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Herzinsuffizienz, Anämie, chronischen Nierenerkrankungen und Niereninsuffizienz.

Substituiertes Natrium-1H-pyrazol-5-olat

Zusammenfassung

Die vorliegende Anmeldung betrifft Natrium-1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrazol-5-olat, Verfahren zu dessen Herstellung, dessen Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie dessen Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen, von Nierenerkrankungen sowie zur Förderung der Wundheilung.

Abb. 1 **IR-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)**



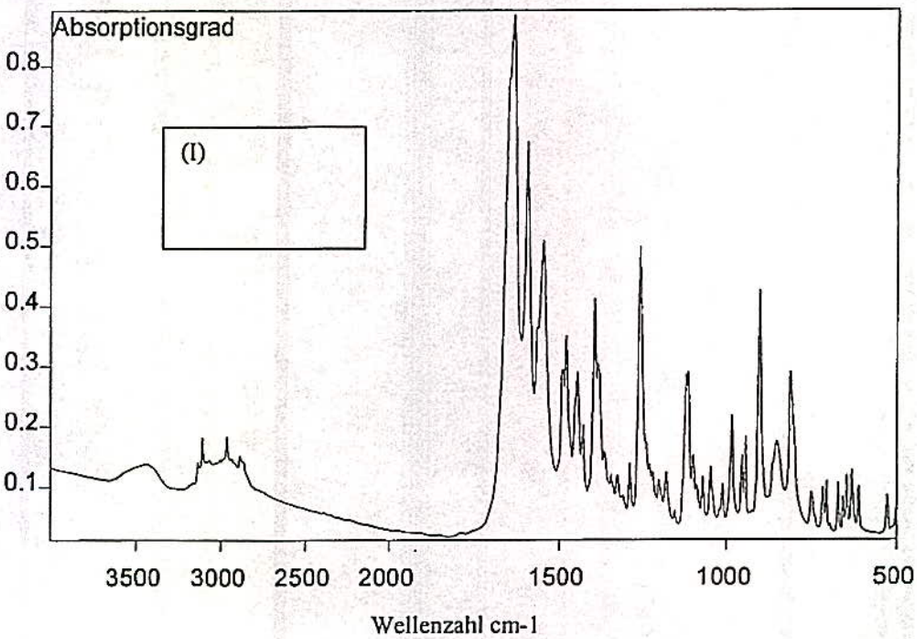
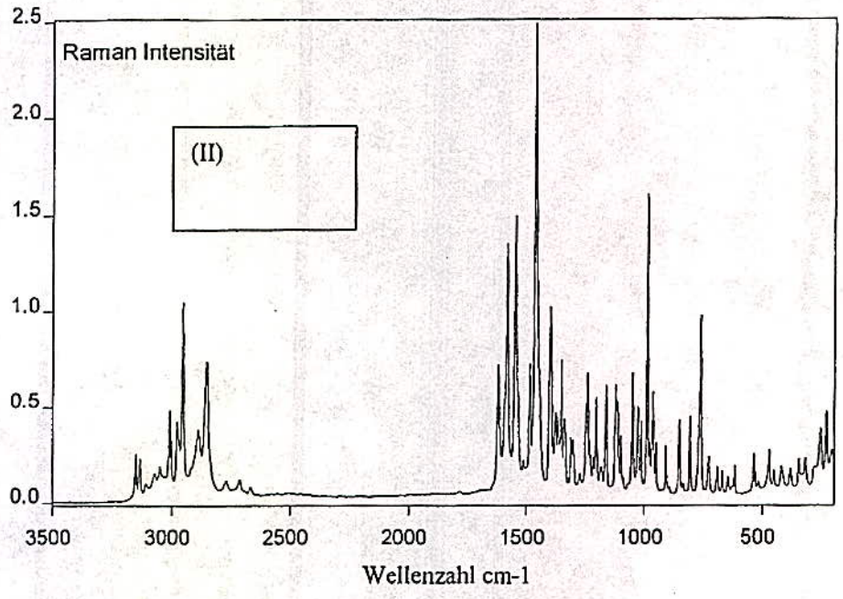


Abb. 2 Raman-Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)



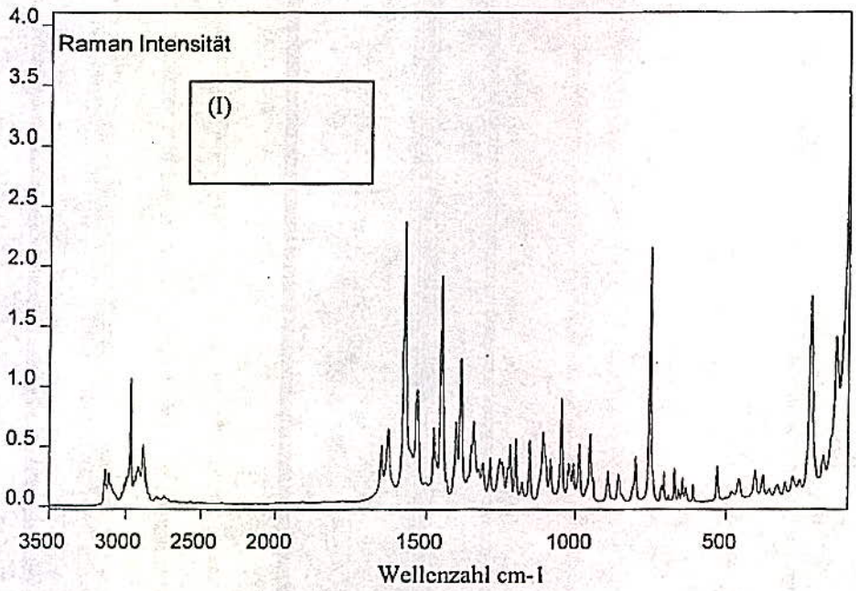
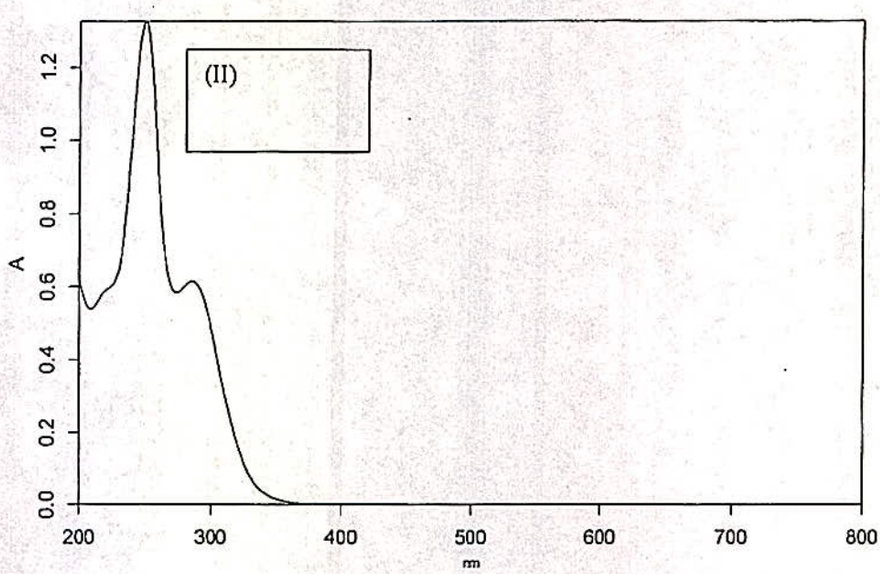


Abb. 3 UV/VIS Spektren der Verbindung der Formel (II) und der Verbindung der Formel (I)



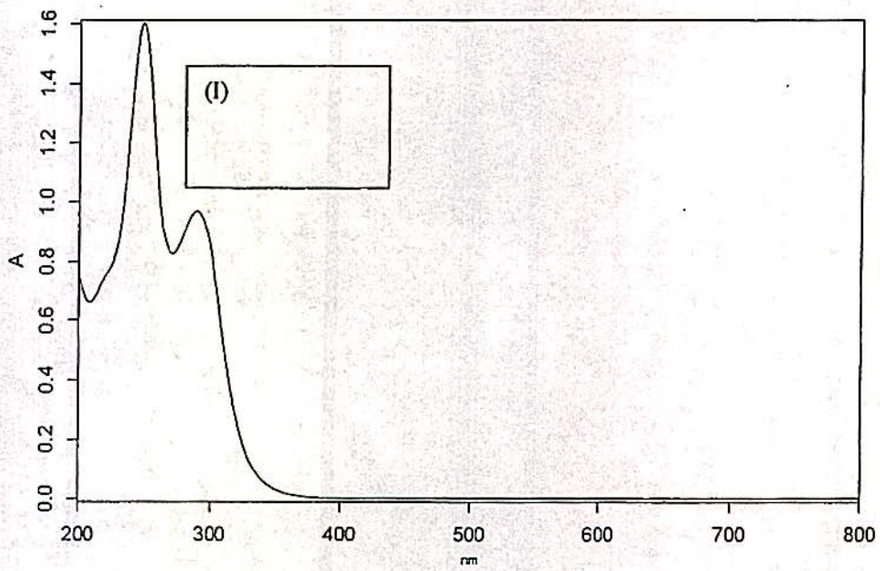


Abb. 4: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

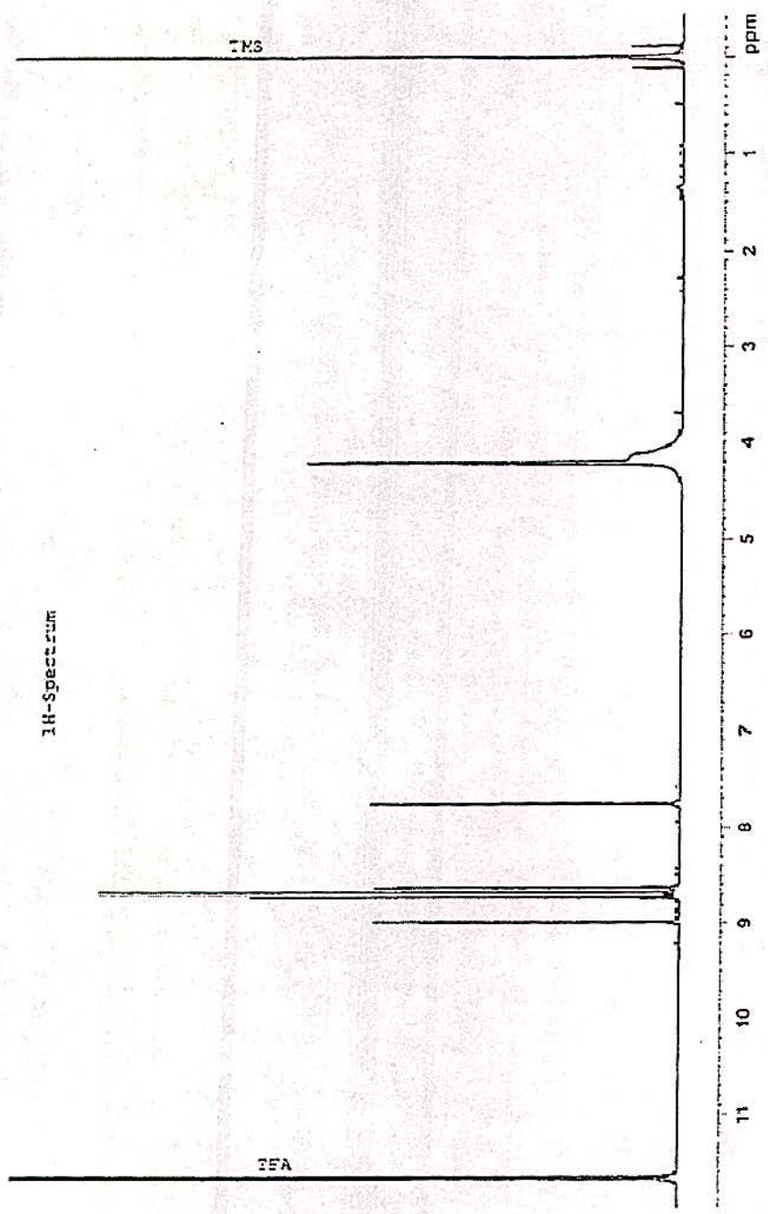


Abb. 5: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)

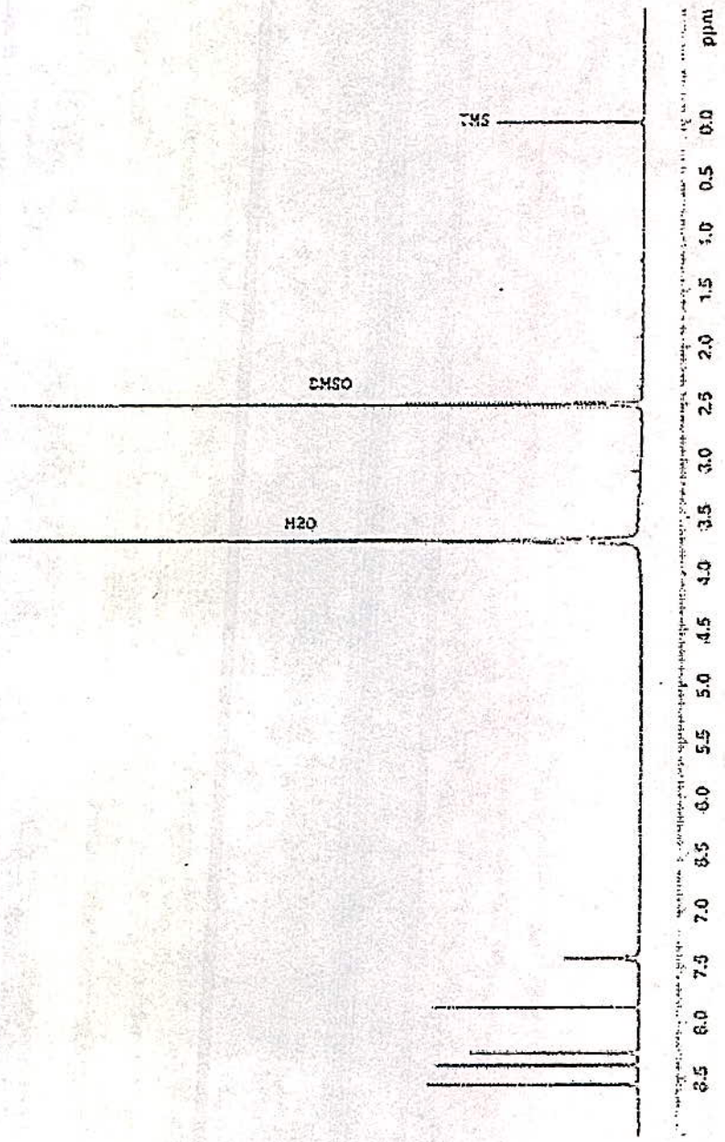


Abb. 6: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (II)

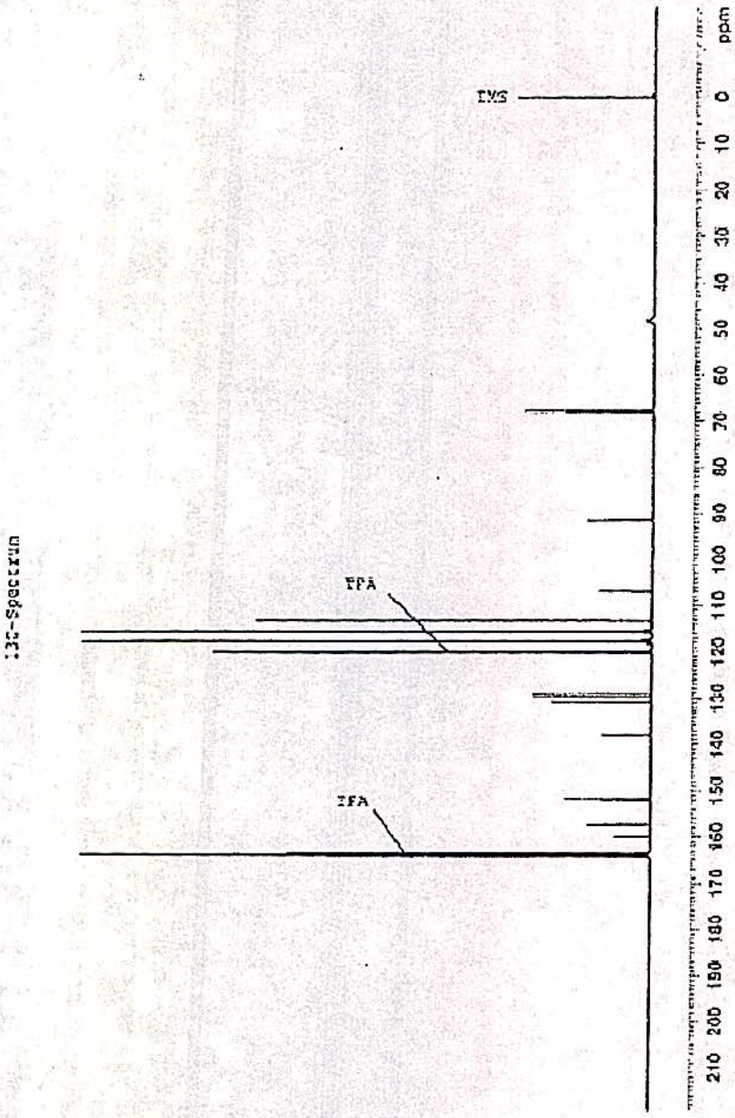


Abb. 7: **^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung der Formel (I)**

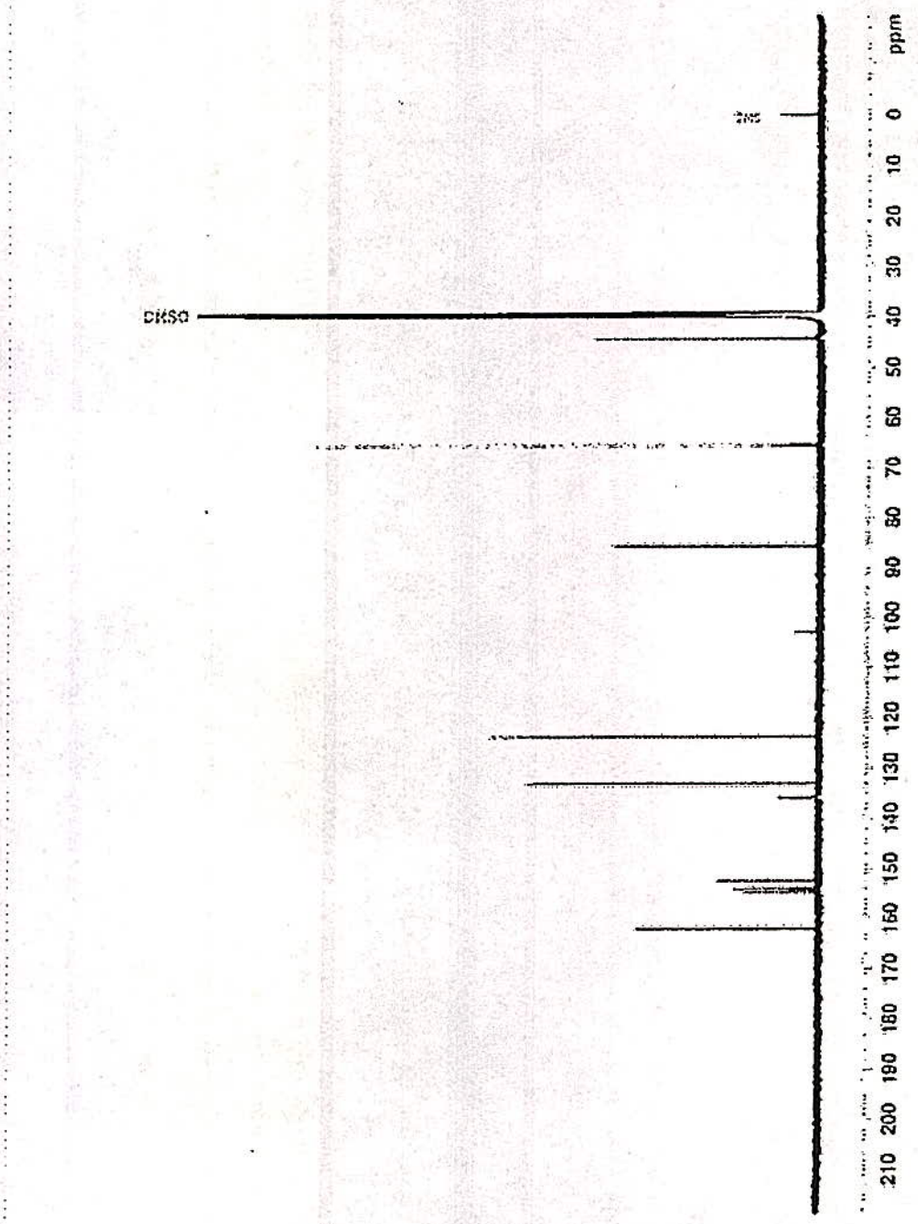


Abb. 8: Massenspektrum der Verbindung der Formel (II)

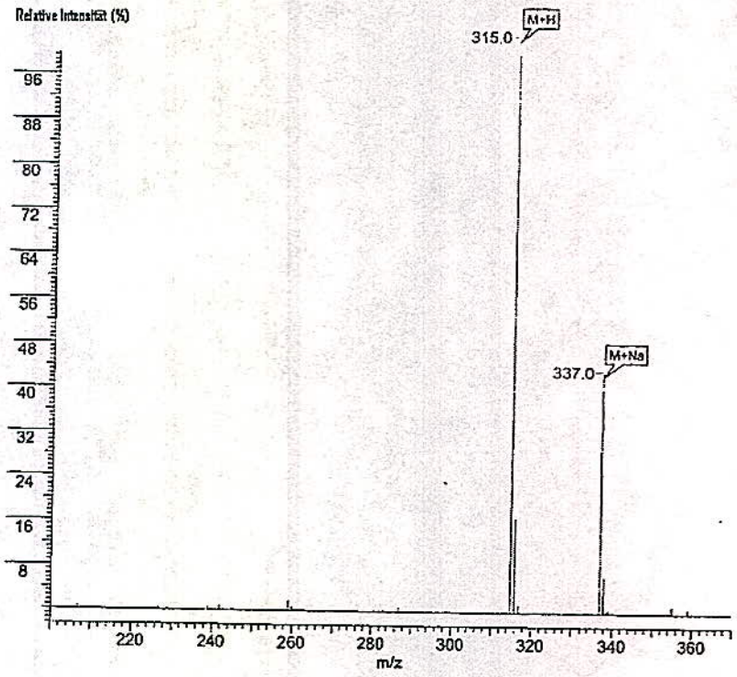


Abb. 9: Massenspektrum der Verbindung der Formel (I)

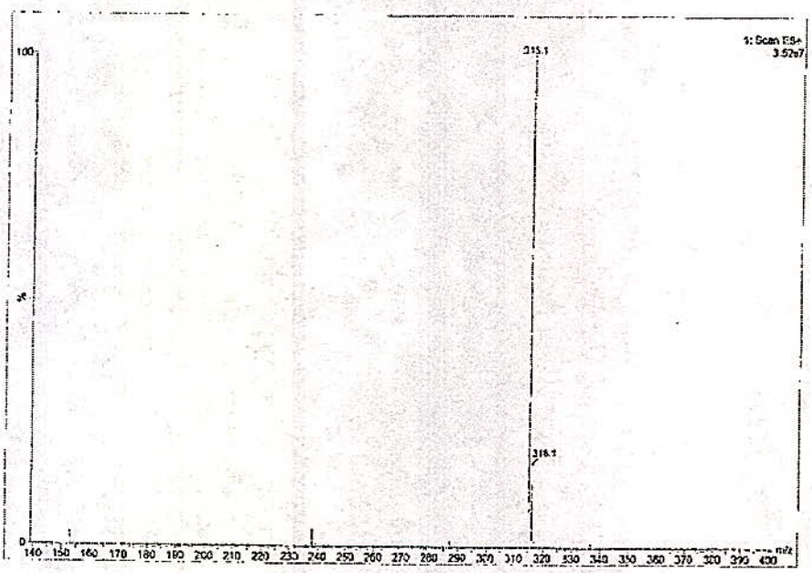


Abb. 10: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (II)

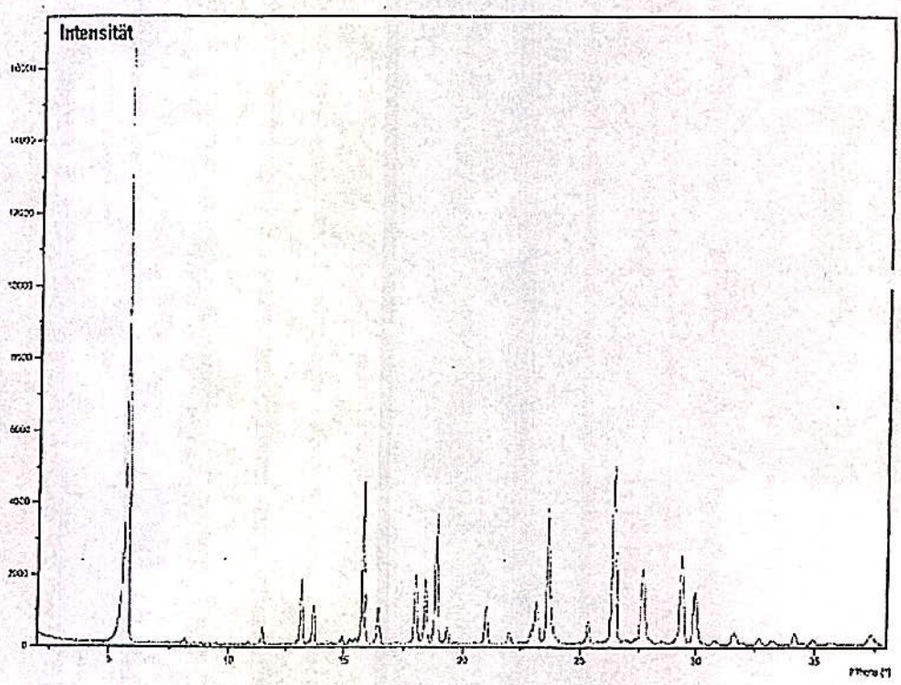
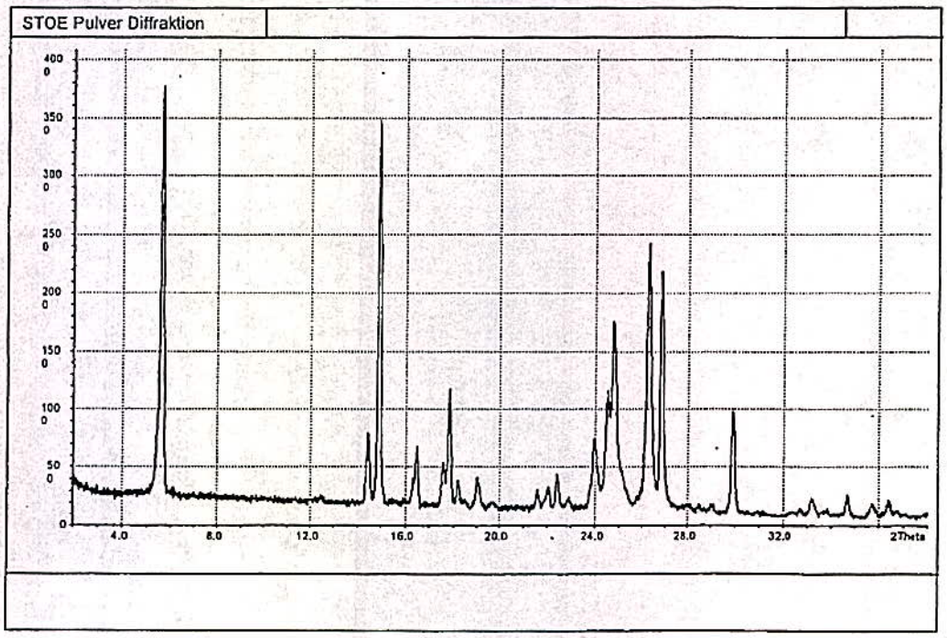


Abb. 11: Röntgendiffraktogramm der Verbindung der Formel (I)



194

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0040803

Bogotá D.C., Abril 30 de 2013 - 14:33:12

RECIBIDO DE : POSSE HERRERA & RUIZ S.A. NI 830.022.196

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	194828760	26/04/2013	6.836.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-109274- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 14:42:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

145

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0040804

Bogotá D.C., Abril 30 de 2013 - 14:33:12

RECIBIDO DE : POSSE HERRERA & RUIZ S.A. NI 830.022.196

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	194828760	26/04/2013	6.836.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
				$150.000.00

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-109274- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 14:42:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

AI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-109274- -00000-0000
Fecha: 2013-04-30 14:42:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILI

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada Inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐