

ÁCIDO (2S,4R)-5-(5'-CLORO-2'-FLUOROBIFENIL-4-IL)-4-
(ETOXIOXALILAMINO)-2-HIDROXIMETIL-2-METILPENTANOICO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

CAMPO DE LA INVENCION

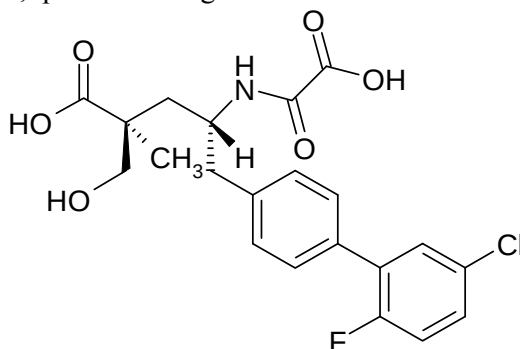
La presente invención se refiere a un compuesto novedoso y a una forma cristalina del mismo, que son metabolizados *in vivo* para formar un compuesto que tiene utilidad como inhibidor de la neprilisina. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, a procesos para preparar este compuesto, y a los métodos de uso del compuesto para tratar enfermedades tales como hipertensión, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, y enfermedad renal.

ESTADO DEL ARTE

La neprilisina (endopeptidasa neutra, EC 3,4,24,11) (NEP), es una Zn²⁺metalopeptidasa unida a membrana endotelial que se encuentra en muchos órganos y tejidos, incluidos cerebro, riñones, pulmones, tracto gastrointestinal, corazón, y vasculatura periférica. La NEP degrada e inactiva un número de péptidos endógenos, tales como encefalinas, bradiquinina circulante, péptidos angiotensina, y péptidos natriuréticos. Estos últimos poseen varios efectos que incluyen, por ejemplo, vasodilatación y natriuresis/diuresis, así como también inhibición de hipertrofia cardíaca y fibrosis ventricular. Por ende, la NEP desempeña un papel importante en la homeostasis de la presión arterial y la salud cardiovascular.

Los inhibidores de la NEP –tales como tiorfán, candoxatril y candoxatrilat– han sido estudiados como potenciales terapéuticos. Los compuestos que inhiben tanto la NEP como la enzima convertidora de angiotensina I (ACE, por sus siglas en inglés *Angiotensin Converting Enzyme*) también son conocidos, e incluyen omapatrilat, gempatrilat y sampatrilat. Bajo el nombre de “inhibidores de la vasopeptidasa”, ésta última clase de compuestos se describe en Robl y colaboradores (1999) *Exp. Opin. Ther. Patents* 9(12): 1665-1677.

Numerosos inhibidores de la NEP se describen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2013/0109639 a nombre de Hughes y colaboradores. Un compuesto de este estilo es el ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metil-4-(oxalilamino)pentanoico, que tiene la siguiente estructura:



5

Este compuesto exhibe una potente actividad de inhibición de la NEP ($pK_i \geq 9$). No obstante, también se ha encontrado que este compuesto tiene biodisponibilidad oral muy baja en especies preclínicas, lo cual lo torna inadecuado o indeseable para la administración oral.

Un método para incrementar la biodisponibilidad oral de un compuesto es formar una prodroga del compuesto. Cuando se administra oralmente, una prodroga debería tener absorción oral aceptable, y ser escindida *in vivo* para generar el compuesto activo. Para los inhibidores de la NEP, puede ser preferible que una prodroga de este estilo se escinda rápidamente (por ej., dentro de la primera hora después de la administración oral) y completamente de modo tal que se provea un bolo inicial del compuesto activo para desencadenar una respuesta de guanosín monofosfato cíclico (cGMP, por sus siglas en inglés *Cyclic Guanosine Monophosphate*). También puede ser deseable que la prodroga propiamente dicha tenga actividad de inhibición de la NEP para que la prodroga pueda contribuir a la actividad farmacológica antes de escindirse. Asimismo, una prodroga como ésta debería ser estable químicamente cuando se almacena durante un período de tiempo prolongado.

20

Por lo tanto, existe la necesidad de una prodroga de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metil-4-(oxalilamino)pentanoico que tenga absorción oral aceptable y que se escinda rápidamente *in vivo* para generar el compuesto activo. La

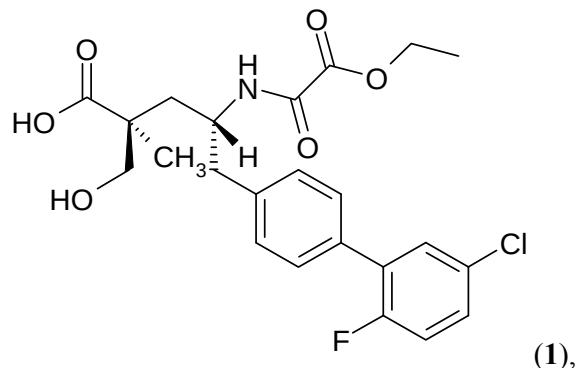
prodroga también puede tener cierto nivel de actividad inhibitoria de la NEP. Esta invención aborda esta necesidad.

En forma adicional, para usar efectivamente un compuesto inhibidor de la NEP como agente terapéutico, sería deseable tener una forma en estado sólido que pueda fabricarse con
5 facilidad y que tenga estabilidad física y química aceptable. Por ejemplo, sería en gran medida deseable tener una forma física que fuera térmicamente estable a una temperatura razonablemente alta, lo que facilitaría el procesamiento y almacenamiento del material. Los sólidos cristalinos se prefieren generalmente por sobre las formas amorfas, para reforzar la pureza y estabilidad del producto fabricado. No obstante, la formación de las formas
10 cristalinas de los compuestos orgánicos es altamente impredecible. No existen métodos confiables para predecir cuál forma (si es que la hay) de un compuesto orgánico será cristalina. Asimismo, no existen métodos para predecir cuál forma cristalina (si es que la hay) tendrá las propiedades físicas deseadas para uso como agentes farmacéuticos. Por consiguiente, es necesaria una forma cristalina estable que tenga un punto de fusión
15 razonablemente alto.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención provee un Compuesto (1) novedoso que es convertido *in vivo* para formar un compuesto que posee actividad de inhibición de la enzima neprilisina (NEP).
20 Por consiguiente, se espera que este compuesto sea útil y ventajoso como agente terapéutico para tratar afecciones tales como hipertensión e insuficiencia cardíaca.

Un aspecto de la invención se refiere al ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (1):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Otro aspecto de la invención se refiere a una forma cristalina del Compuesto **1**. En una forma de realización, la forma cristalina (**1'**) es una sal hemi-cálcica del Compuesto **1**.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y el Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo. Dichas composiciones pueden contener opcionalmente otros agentes terapéuticos que incluyen, a modo no taxativo, un antagonista de los receptores AT₁, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un inhibidor de la fosfodiesterasa
 10 (PDE, por sus siglas en inglés *Phosphodiesterase*), un inhibidor de la renina, un diurético, o combinaciones de los mismos.

El Compuesto **1** posee actividad de inhibición de la enzima NEP, y por lo tanto se espera que sea útil como agente terapéutico para tratar pacientes que padecen de una enfermedad o un trastorno que se trata al inhibir la enzima NEP o al incrementar los niveles
 15 de sus substratos peptídicos. Por ende, un aspecto de la invención se refiere a un método para tratar pacientes que padecen de una enfermedad o un trastorno que se trata al inhibir la enzima NEP, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1**. Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca, o enfermedad renal, que comprende administrar a un
 20 sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1**. Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para inhibir una enzima NEP en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad que inhibe la enzima NEP del Compuesto **1**.

Como el Compuesto **1** posee actividad de inhibición de la NEP, también es útil como

herramienta de investigación. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un método para usar el Compuesto **1** como herramienta de investigación, en donde el método comprende llevar a cabo un ensayo biológico usando el Compuesto **1**. El Compuesto **1** también puede usarse para evaluar nuevos compuestos químicos. Por ende, otro aspecto de la invención se refiere a un método para evaluar un compuesto de ensayo en un ensayo biológico, que comprende: (a) llevar a cabo un ensayo biológico con un compuesto de ensayo para arrojar un primer valor de ensayo; (b) llevar a cabo el ensayo biológico con el compuesto de la invención para arrojar un segundo valor de ensayo; en donde el paso (a) se realiza ya sea antes, después, o en forma concurrente con el paso (b); y (c) comparar el primer valor de ensayo del paso (a) con el segundo valor de ensayo del paso (b). Los ensayos biológicos de ejemplo incluyen un ensayo de inhibición de la enzima NEP. Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para estudiar un sistema biológico o una muestra biológica que comprende una enzima NEP, en donde el método comprende: (a) poner en contacto el sistema biológico o la muestra biológica con el compuesto de la invención; y (b) determinar los efectos causados por el compuesto sobre el sistema biológico o la muestra biológica.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a procesos útiles para preparar el Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo para la fabricación de un medicamento; en especial, para la fabricación de un medicamento útil para tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca, o enfermedad renal. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del Compuesto **1** o forma cristalina del mismo para inhibir una enzima NEP en un mamífero. En la presente se describen otros aspectos y formas de realización de la invención.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Diversos aspectos de la presente invención son ilustrados por referencia a los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD, por sus siglas en inglés *Powder X-Ray Diffraction*) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**).

5 La FIG. 2 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**).

La FIG. 3 muestra un gráfico del análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en
10 inglés *Thermal Gravimetric Analysis*) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**).

La FIG. 4 muestra una isoterma de sorción dinámica de humedad (DMS, por sus siglas en inglés *Dynamic Moisture Sorption*) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-
15 2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**).

La FIG. 5 es una imagen microscópica de luz polarizada (PLM, por sus siglas en inglés *Polarized Light Microscopic*) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio
20 (**1'**).

La FIG. 6 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de arginina (**1''**).

La FIG. 7 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la
25 forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de arginina (**1''**).

La FIG. 8 muestra un gráfico del análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina del (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-

2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de arginina (**1''**).

La FIG. 9 es una imagen microscópica de luz polarizada (PLM) de la forma cristalina del (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de arginina (**1''**).

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere al ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (**1**), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 El Compuesto **1** de la invención contiene dos centros quirales y, por lo tanto, este compuesto puede prepararse y usarse en diversas formas estereoisoméricas. Específicamente, los átomos de carbono tienen una configuración particular (*R,R*), (*S,S*), (*S,R*), o (*R,S*) o están enriquecidos en una forma estereoisomérica que tiene dicha configuración. El Compuesto **1**, tal como se ilustra y menciona, se encuentra en la
15 configuración (*S,R*). Aquellos versados en el arte entenderán que es posible que cantidades menores de otros estereoisómeros estén presentes en las composiciones de la invención a menos que se indique lo contrario, siempre que la utilidad de la composición en su totalidad no sea eliminada por la presencia de dichos otros isómeros. Los estereoisómeros individuales pueden ser obtenidos mediante numerosos métodos que son ampliamente conocidos en el
20 arte, incluida la cromatografía quiral usando un soporte o una fase estacionaria quiral adecuada, o al convertirlos químicamente en diastereoisómeros, separando los diastereoisómeros con medios convencionales, tales como cromatografía o recristalización, y luego regenerando el estereoisómero original.

El Compuesto **1** es una prodroga de éster etílico, donde el resto etilo sirve para
25 mejorar la lipofilidad del compuesto y, por lo tanto, mejorar la permeabilidad de la membrana pasiva del compuesto activo al enmascarar el ácido carboxílico. Una vez en el cuerpo, se cree que este enlace éster es hidrolizado por las esterasas que se encuentran en la sangre, el hígado, y otros órganos y tejidos.

Se ha encontrado que el Compuesto **1** de la invención inhibe la enzima neprilisina (NEP). Asimismo, el compuesto posee mayor potencia para la inhibición de la NEP una vez que es metabolizado *in vivo*. Por ende, cuando se describe la actividad del compuesto de la invención, se entiende que el compuesto puede exhibir cierto nivel de actividad en un ensayo y un nivel mejorado de actividad una vez metabolizado en su forma activa. Una medida de la capacidad de un compuesto para inhibir la actividad de la NEP es la constante de inhibición (pK_i). El valor de pK_i es el logaritmo negativa a base 10 de la constante de disociación (K_i), que se informa típicamente en unidades molares. El Compuesto **1**, cuando se metaboliza, forma ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metil-4-(oxalilamino)pentanoico (el “agente activo” o “metabolito activo”), que de acuerdo con lo divulgado en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2013/0109639 tiene un valor de pK_i para NEP ≥ 9 . Otras propiedades y utilidades del Compuesto **1** pueden demostrarse usando ensayos *in vitro* e *in vivo* que son ampliamente conocidos para aquellos versados en el arte, e incluyen, *inter alia*, los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2013/0109639.

El Compuesto **1**, así como también aquellos compuestos usados en su síntesis, también pueden incluir compuestos marcados isotópicamente; es decir, en donde uno o más átomos han sido enriquecidos con átomos que tienen una masa atómica diferente de la masa atómica predominantemente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de fórmula I, por ejemplo, incluyen, a modo no taxativo, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{36}Cl , y ^{18}F . De particular interés es el Compuesto **1** enriquecido en tritio o carbono-14, que se puede usar, por ejemplo, en estudios de distribución en tejidos; el Compuesto **1** enriquecido en deuterio, especialmente en un sitio de metabolismo que forma, por ejemplo, un compuesto que tiene mayor estabilidad metabólica; y el Compuesto **1** enriquecido en un isótopo emisor de positrones, tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , que se puede usar, por ejemplo, en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés *Positron Emission Topography*).

Las estructuras químicas se denominan en la presente de acuerdo con la

convenciones IUPAC tal como se implementan en el programa informático ChemDraw (Perkin Elmer, Inc., Cambridge, MA).

DEFINICIONES

5 Al describir el compuesto, las composiciones, los métodos y los procesos de la invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. En forma adicional, tal como se usan en la presente, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las correspondientes formas en plural, a menos que el contexto en que se usan claramente dicte lo contrario. Los términos “comprender”, “incluir” y “tener”
10 están destinados a ser inclusivos e implican que pueden existir elementos adicionales distintos de los elementos enunciados. Ha de entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usados en la presente están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario. Por consiguiente, los números
15 establecidos en la presente son aproximaciones que pueden variar dependiendo las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la presente invención. Por lo menos, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance las reivindicaciones, cada número debería al menos considerarse a la luz de los dígitos significativos informados y aplicando técnicas comunes de redondeo.

20 El término “alrededor de” o “aproximadamente”, cuando se usa en el contexto del comportamiento térmico del Compuesto **1**, se define como $\pm 1-3$ °C. El término “aproximado”, cuando se usa en el contexto del % de dosis del Compuesto **1** excretado en la orina se define mediante un margen de error que típicamente es aproximadamente el doble de la desviación estándar o el semi-rango de un intervalo de confianza del 95%. El término
25 “aproximado”, en otras áreas de la descripción pueden, usarse para indicar desviación estándar o la cantidad de variación o dispersión de un conjunto de valores de datos.

El término “liberación controlada” tal como se usa en la presente, funciona como sinónimo de “liberación sostenida” y “liberación extendida”, y se refiere a la cantidad de

droga suministrada en un período prolongado de tiempo en un sujeto. Por lo general, los comprimidos y cápsulas de liberación controlada liberan el compuesto activo en el sujeto en un período de tiempo de aproximadamente 8, 12, 16, y 24 horas. Por otro lado, la expresión “liberación inmediata” hace referencia a que el compuesto activo es liberado en un sujeto
5 dentro de un período reducido de tiempo; típicamente, inferior a aproximadamente 30 minutos. La expresión “liberación retardada” está dirigida a comprimidos y cápsulas que liberan la dosis farmacéutica después de un período de tiempo determinado. Estas formas farmacéuticas usualmente tienen un recubrimiento entérico a fin de prevenir la liberación en el estómago pero permitir la liberación en el tracto intestinal.

10 Tal como se usa en la presente, la frase “de la fórmula”, “que tiene la fórmula” o “que tiene la estructura” no está destinada a ser limitativa, y se usa de la misma manera en la que comúnmente se emplea la expresión “que comprende”. Por ejemplo, si se ilustra una estructura, se entiende que todas las formas estereoisoméricas y tautoméricas están contempladas, a menos que se establezca lo contrario.

15 En general, al describir los sólidos farmacéuticos, el término “(2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio” implica una cantidad estequiométrica aproximada de 2:1 del anión carboxilato del Compuesto **1** respecto del contraion calcio. La expresión “sal hemi-cálcica del Compuesto **1**” es equivalente a “la sal de calcio del Compuesto **1**”. En una forma de realización de la
20 invención, la forma cristalina del Compuesto **1'** es un sólido no higroscópico.

El término “punto de fusión”, tal como se usa en la presente, hace referencia a la temperatura a la cual el flujo de calor endotérmico máximo es observado mediante calorimetría diferencial de barrido, para la transición térmica que corresponde al cambio de fase sólida a líquida.

25 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material que no es biológicamente inaceptable, o de otra manera inaceptable, cuando se usa en la invención. Por ejemplo, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material que puede ser incorporado en una composición y administrado a un paciente sin causar

efectos biológicos inaceptables o interactuar de manera inaceptable con otros componentes de la composición. Dichos materiales farmacéuticamente aceptables típicamente han cumplido con las normas requeridas de evaluación toxicológica y de fabricación, e incluyen aquellos materiales identificados como ingredientes inactivos inadecuados por la U.S. Food and Drug Administration.

La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” hace referencia a una sal preparada a partir de una base o de un ácido que es aceptable para su administración a un paciente, tal como un mamífero (por ejemplo, sales que tienen seguridad aceptable para el mamífero para un determinado régimen de dosificación). Sin embargo, se entiende que no es necesario que las sales cubiertas por la invención sean sales farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de los compuestos intermediarios que no están destinadas para la administración a un paciente. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden derivar de bases orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables y de ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Asimismo, cuando un compuesto contiene tanto un resto básico, tal como una amina, piridina o imidazol, como un resto ácido, tal como un ácido carboxílico o tetrazol, es posible que se formen zwitteriones, que están incluidos dentro del término “sal”, tal como se usa en la presente. Las sales derivadas de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, sodio y zinc, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, con inclusión de aminas sustituidas, aminas cíclicas, aminas de origen natural y similares, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, *N,N'*-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, *N*-etilmorfolina, *N*-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperadina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos bórico, carbónico, halhídrico

(bromhídrico, clorhídrico, fluorhídrico o yodhídrico), nítrico, fosfórico, sulfámico y sulfúrico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos hidroxilo alifáticos (por ejemplo, ácidos cítrico, glucónico, glicólico, láctico, lactobiónico, málico y tartárico), ácidos monocarboxílicos alifáticos (por ejemplo, ácidos
5 acético, butírico, fórmico, propiónico y trifluoroacético), aminoácidos (por ejemplo, ácidos aspártico y glutámico), ácidos carboxílicos aromáticos (por ejemplo, ácidos benzoico, *p*-clorobenzoico, difenilacético, gentísico, hipúrico y trifenilacético), ácidos hidroxilo aromáticos (por ejemplo, ácidos *o*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzoico, 1-hidroxinaftaleno-2-carboxílico y 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico), ascórbico, ácidos dicarboxílicos (por
10 ejemplo, ácidos fumárico, maleico, oxálico y succínico), glucorónico, mandélico, mícico, nicotínico, orótico, pamoico, pantoténico, ácidos sulfónicos (por ejemplo, ácidos bencenosulfónico, canfosulfónico, edisílico, etanosulfónico, isetiónico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, naftaleno-2,6-disulfónico y *p*-toluensulfónico), ácido xinafoico, y similares.

15 La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente que lo necesita; es decir, la cantidad de droga necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar hipertensión es una cantidad de compuesto necesaria, por ejemplo, para reducir, suprimir, eliminar o prevenir los síntomas de
20 hipertensión, o para tratar la causa subyacente de hipertensión. En una forma de realización, una cantidad terapéuticamente efectiva es aquella cantidad de droga necesaria para reducir la presión arterial o la cantidad de droga necesaria para mantener la presión arterial normal. Por otro lado, la expresión “cantidad efectiva” hace referencia a una cantidad suficiente para obtener un resultado deseado, que puede no necesariamente ser un resultado terapéutico. Por
25 ejemplo, cuando se estudia un sistema que comprende una enzima NEP, una “cantidad efectiva” puede ser la cantidad necesaria para inhibir la enzima.

El término “tratar” o “tratamiento”, tal como se usa en la presente, se refiere al tratamiento de una enfermedad o condición médica (tal como hipertensión) en un paciente,

tal como un mamífero (particularmente un humano) que incluye una o más de la siguientes opciones: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o condición médica; a saber, prevenir la reaparición de la enfermedad o condición médica o tratamiento profiláctico de un paciente es propenso a la enfermedad o condición médica; (b) mejorar la enfermedad o condición

5 médica; es decir, eliminar o causar la regresión de la enfermedad o condición médica en un paciente; (c) suprimir la enfermedad o condición médica; es decir, ralentizar o arrestar el desarrollo de la enfermedad o condición médica en un paciente; o (d) aliviar los síntomas de la enfermedad o condición médica en un paciente. Por ejemplo, la expresión “tratar la hipertensión” incluiría evitar que ocurra la hipertensión, mejorar la hipertensión, suprimir la

10 hipertensión, y aliviar los síntomas de la hipertensión (por ejemplo, disminuir la presión arterial). El término “sujeto” o “paciente” está destinado a incluir aquellos mamíferos, tales como humanos, que necesitan tratamiento o prevención de la enfermedad, o que actualmente están siendo tratados para prevenir la enfermedad, o bajo tratamiento de una enfermedad o condición médica específica, así como también los sujetos de ensayo en los cuales el

15 compuesto cristalino está siendo evaluado o está siendo usado en un ensayo; por ejemplo, un modelo animal.

Todos los otros términos usados en la presente están destinados a tener su significado habitual, tal como lo entienden las personas medianamente versadas en el arte al cual pertenecen.

20

PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS GENERALES

El Compuesto **1** y su forma de sal de calcio cristalina pueden sintetizarse a partir de materiales de inicio fácilmente disponibles, tal como se describe a continuación, y en los Ejemplos. Ha de advertirse que, cuando se dan las condiciones típicas o preferidas del

25 proceso (por ejemplo, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), también se pueden usar otras condiciones del proceso, a menos que se establezca lo contrario. Debe entenderse que, si bien se dan condiciones específicas del proceso (es decir, temperaturas de cristalización, tiempos, relaciones molares de

reactivos, solventes, presiones, etc.) también se pueden usar otras condiciones del proceso, a menos que se establezca lo contrario. En algunos casos, las reacciones o cristalizaciones se realizaron a temperatura ambiente y no se tomó ninguna medición de temperatura real. Se entiende que la temperatura ambiente puede significar una temperatura dentro del rango
5 comúnmente asociado con la temperatura ambiente en el ámbito del laboratorio, y típicamente se encuentra en el rango de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, tal como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. En otros casos, las reacciones o cristalizaciones se realizaron a temperatura ambiente, y la temperatura sí fue medida y registrada.

10 Cualesquiera relaciones molares descritas en los métodos de la invención pueden ser fácilmente determinadas mediante diversos métodos disponibles para aquellos versados en el arte. Por ejemplo, dichas relaciones molares pueden ser fácilmente determinadas mediante ¹H RMN. En forma alternativa, es posible usar métodos de análisis elemental y HPLC para determinar la relación molar.

15 En una forma de realización, la invención se refiere al ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (**1**), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra forma de realización, el Compuesto **1** puede prepararse al mezclar etanol y cloruro de oxalilo para formar una solución, hacer reaccionar éster bencílico del ácido
20 (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico con la solución, y combinar la mezcla resultante con paladio sobre carbono bajo hidrógeno.

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** puede prepararse al (a) disolver etanol en diclorometano; (b) agregar cloruro de oxalilo para formar una solución y agitar a temperatura ambiente; (c) evaporar el solvente de la solución; (d) agregar la solución restante
25 al éster bencílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico que se disolvió primero en diclorometano; (e) agregar *N,N*-diisopropiletilamina y agitar a temperatura ambiente; (f) evaporar el solvente para formar un sólido; (g) combinar el sólido con paladio al 10% en peso sobre carbono en el solvente para

formar una mezcla; (h) colocar la mezcla bajo hidrógeno con agitación; y (i) filtrar paladio sobre carbono y secar al vacío para formar el Compuesto **1** sólido. Los sólidos resultantes en los pasos (f) y (i) también pueden purificarse mediante cromatografía.

La preparación de la sal hemi-cálcica cristalina del Compuesto **1** se realiza
5 generalmente en un diluyente inerte adecuado, cuyos ejemplos incluyen, a modo no taxativo, acetona, acetonitrilo, etil acetato, metil etil cetona, metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, diclorometano, metil *t*-butil éter, ciclopentil metil éter, hexanos, y similares, y sus mezclas; opcionalmente, que contienen agua. Las mezclas de diluyentes inertes (también denominados “sistemas solventes”) incluyen acetona con agua, acetonitrilo con agua, etanol
10 y etil acetato, etil acetato y hexanos, y alcoholes inferiores (alquiloC₁₋₆-OH) con agua; por ejemplo, metanol y agua, e isopropanol y agua. Los sistemas solventes particularmente adecuados incluyen etanol, etanol:agua y etil acetato:etanol que contienen propionato de calcio u otras sales de calci. Al completar la cristalización, el compuesto cristalino puede aislarse de la mezcla de reacción mediante cualquier medio convencional tal como
15 precipitación, filtración, concentración, centrifugación, secado *in vacuo*, y similares.

En una forma de realización, la invención se refiere a una forma cristalina del ácido
(2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-
metilpentanoico. En otra forma de realización, la forma cristalina es (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-
fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato
20 de calcio (**1'**).

En otra forma de realización, la forma cristalina **1'** puede prepararse al (a) disolver
ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-
metilpentanoico en etanol y *N,N*-diisopropiletilamina para formar la solución A; (b) disolver
trifluorometanosulfonato de calcio en etanol para formar la solución B; (c) agregar a gotas
25 la solución B a la solución A para formar una suspensión; (d) agitar a temperatura ambiente;
y (e) aislar los sólidos resultantes para obtener el Compuesto **1'**. Otra forma de realización
incluye un segundo paso de cristalización. Aquí, el segundo proceso de recristalización
además comprende (f) enfriar el Compuesto **1'** a aproximadamente 5 °C y agregar una

mezcla fría de etanol:agua bajo agitación vigorosa; y (g) filtrar y secar a temperatura ambiente para obtener el Compuesto **1'**.

PROPIEDADES CRISTALINAS

5 Como es sabido en el campo del análisis de difracción de rayos X en polvo (PXRD), las alturas de los picos relativas de los patrones de PXRD dependen de un número de factores relacionados con la preparación de la muestra y la geometría del instrumento, mientras que las posiciones de los picos son relativamente insensibles a los detalles experimentales. Los análisis de PXRD, de calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico
10 (TGA), y la evaluación mediante sorción dinámica de humedad (DMS) (también conocida como análisis de sorción-desorción de humedad) se llevaron a cabo tal como se describe en la presente.

En un aspecto, la invención se refiere al ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico en forma cristalina. En otro
15 aspecto, la forma cristalina es (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**). Esta forma cristalina **1'** se caracteriza por un patrón de PXRD en el cual las posiciones de los picos concuerdan sustancialmente con las ilustradas en la FIG. 1. Los picos con intensidades relativas superiores al 0,1% en el área se enuncian en la tabla que sigue. Este patrón muestra picos
20 agudos de difracción en el rango de 3-25° en 2θ.

2θ*	d (Å)	Área	Área (%)
3,47	25,45	1577,40	16,30
3,98	22,20	2084,20	21,50
5,00	17,67	2012,20	20,70
7,18	12,31	7729,90	79,70
7,38	11,97	9698,10	100,00
7,97	11,08	4616,90	47,60

2θ*	d (Å)	Área	Área (%)
8,57	10,32	318,10	3,30
8,87	9,96	1860,30	19,20
9,42	9,38	708,30	7,30
9,99	8,85	876,80	9,00
10,60	8,34	333,50	3,40
10,91	8,11	2013,70	20,80
11,58	7,63	22,40	0,20
11,95	7,40	194,00	2,00
12,19	7,25	269,10	2,80
14,86	5,96	297,90	3,10
15,74	5,63	1294,90	13,40
15,98	5,54	1659,40	17,10
16,31	5,43	235,70	2,40
17,29	5,13	264,50	2,70
18,98	4,67	394,80	4,10
19,75	4,49	295,50	3,00
20,83	4,26	255,70	2,60
22,69	3,92	276,20	2,80
23,58	3,77	279,20	2,90

*valores 2θ informados como valor $\pm 0,20$.

Por ende, en una forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza por un patrón PXRD que comprende picos de difracción a valores 2θ de $7,18 \pm 0,2$, $7,38 \pm 0,2$ y $7,97 \pm 0,2$.

En otra forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza por un patrón PXRD

que comprende picos de difracción a valores 2θ de $3,98\pm0,2$, $5,00\pm0,2$, $7,18\pm0,2$, $7,38\pm0,2$, $7,97\pm0,2$, $8,87\pm0,2$, y $10,91\pm0,2$.

En otra forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza además por tener uno o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre $3,47\pm0,2$, $9,99\pm0,2$, $15,74\pm0,2$, $15,98\pm0,2$, y $18,98\pm0,2$; y, en otra forma de realización más, la forma cristalina **1'** se caracteriza además por tener tres o más picos de difracción adicionales de este estilo.

En una forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza por el termograma de DSC que concuerda sustancialmente con lo ilustrado en la FIG. 2. La forma cristalina **1'** se caracteriza por una traza de DSC registrada a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto que muestra un valor máximo en el flujo de calor endotérmico a una temperatura de entre aproximadamente $237\text{ }^{\circ}\text{C}$ y aproximadamente $241\text{ }^{\circ}\text{C}$. El termograma de DSC ilustra una endoterma de fusión con un pico a aproximadamente $239\text{ }^{\circ}\text{C}$, inicio a $233\text{ }^{\circ}\text{C}$, y con una entalpía de $\sim 67\text{ J/g}$. Una segunda endoterma representa la descomposición y otros eventos térmicos desconocidos.

En una forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza por el gráfico del TGA en la FIG. 3. El gráfico del TGA muestra el inicio de descomposición a una temperatura de aproximadamente $225\text{ }^{\circ}\text{C}$. El compuesto cristalino se descompone después de la fusión, como se observa ante la pérdida de peso significativa luego de $\sim 250^{\circ}\text{C}$, que también corresponde a una segunda endoterma en el gráfico del DSC.

En una forma de realización, la forma cristalina **1'** se caracteriza por la isoterma de DMS en la FIG. 4. Esta forma es un sólido no higroscópico. La ganancia total de humedad observada es menor al 1% en peso cuando se expone a una humedad relativa de entre 5% y 90%. No se encuentra histéresis significativa entre los ciclos consecutivos de sorción-desorción. El sólido obtenido después de los ciclos de sorción-desorción mostraron el mismo patrón de PXRD que el material de inicio, lo que indica que no hubo cambio en la forma después de este experimento.

La forma cristalina **1'** puede caracterizarse mediante la imagen PLM en la FIG. 5,

que muestra esta forma como cristales birrefringentes delgados.

También se prepararon cristales de (2S,4R)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de L-arginina (**1''**). No obstante, la exposición de estos cristales a condiciones ambiente provocó deliquesencia
5 lenta. La forma cristalina **1''** se caracteriza por una traza de PXRD y DSC en las FIGS. 6 y 7, respectivamente. La traza de DSC se registró a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto y muestra un valor máximo en el flujo de calor endotérmico a una temperatura de entre aproximadamente 113 °C y aproximadamente 117 °C. El termograma de DSC ilustra una endoterma de fusión con un pico a aproximadamente 116,9 °C, inicio a 106,8 °C,
10 y con una entalpía de ~70,3 J/g. La forma cristalina **1''** también se caracteriza por el gráfico del TGA en la FIG. 8, donde se observó una pérdida de peso del ~ 6,5% hasta una temperatura 140 °C, y se observa una pérdida de masa continua después de una temperatura 140 °C. La forma cristalina **1''** puede caracterizarse por la imagen PLM en la FIG. 9, que muestra esta forma como cristales birrefringentes delgados.

15

UTILIDAD

La extrapolación *in vitro* a *in vivo* del comportamiento de la droga en un sujeto continúa mejorando (ver, por ej., Chiba y colaboradores, AAPS J., 2009 Junio; 11(2): 262-276). En la presente invención, se evaluó la actividad inhibitoria de la neprilisina humana
20 *in vitro* (Ensayo 1) con el objeto de determinar la actividad inhibitoria de la neprilisina del Compuesto **1**. Se alcanzó un umbral de $pK_i \geq 9,0$ para este compuesto. No obstante, también se realizaron experimentos *in vivo* adicionales a fin de predecir con mayor certeza el comportamiento del Compuesto **1** en un sujeto.

Un parámetro crítico para evaluar si una prodroga es adecuada es la determinación
25 de con cuánta rapidez la prodroga se convierte en el agente activo o metabolito activo. En la presente invención, el Compuesto **1**, que es una prodroga de éster, se convierte en el agente activo o metabolito activo, el Compuesto de Comparación **C2**, mediante una reacción enzimática, por ej., hidrólisis de esterasa, que puede depender en gran medida de la especie.

Por esa razón, es preferible evaluar las tasas de conversión en múltiples especies al momento de la extrapolación a sujetos humanos. En forma adicional, existen varias propiedades que son útiles al evaluar si una cantidad suficiente de la droga será suministrada al plasma a fin de alcanzar el beneficio terapéutico necesario; por ejemplo, biodisponibilidad oral alta y depuración renal baja para aquellos sujetos cuya función renal está afectada.

Para la presente invención, se realizaron estudios farmacocinéticos orales e intravenosos en ratas, perros y monos a fin de determinar la biodisponibilidad oral del Compuesto **1** en comparación con el metabolito activo: el Compuesto de Comparación **C2** (Ensayo 2). En forma adicional, se realizaron estudios farmacocinéticos orales e intravenosos en ratas y perros para comparar el Compuesto **1** con otras prodrogas de éster o compuestos químicamente similares (Ensayo 3).

El Compuesto **1** inhibe la enzima NEP y, por lo tanto, se espera que sea útil para el tratamiento y/o la prevención de condiciones médicas que responden a la inhibición de la NEP. Por ende, se espera que los pacientes que padecen de una enfermedad o un trastorno que se trata al inhibir la enzima NEP o al incrementar los niveles de sus substratos peptídicos, puedan ser tratados al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1**. Por ejemplo, al inhibir la NEP, se espera que el Compuesto **1** potencie los efectos biológicos de los péptidos endógenos que son metabolizados por la NEP, tales como los péptidos natriuréticos, bombesina, bradiquininas, calcitonina, endotelinas, encefalinas, neurotensina, sustancia P y péptido intestinal vasoactivo. Por ende, se espera que este compuesto tenga otras acciones fisiológicas, por ejemplo, sobre el sistema renal, nervioso central, reproductivo, y gastrointestinal.

Los drogas son depuradas del cuerpo de un sujeto mediante diversos procesos de eliminación que se categorizan generalmente como excreción y biotransformación. La excreción se refiere a la eliminación de la droga no volátil intacta principalmente por el riñón a la vejiga a la orina mientras que otras vías de excreción incluyen la bilis (hígado), el sudor, la saliva, la leche (a través de la lactancia) u otros fluidos corporales. Las drogas volátiles como el alcohol y los anestésicos gaseosos son excretados a través de los pulmones en el

aire expirado. Por otro lado, la biotransformación, o metabolismo de la droga, se refiere a que una droga es convertida químicamente en el cuerpo en un metabolito y es usualmente un proceso enzimático. Una excepción a esto es cuando una droga es químicamente alterada a nivel no enzimático; por ej., hidrólisis estérica. Las enzimas que participan en la biotransformación de las drogas se encuentran principalmente en el hígado. Otros tejidos, tales como el riñón, pulmón, intestino delgado, y la piel, también contienen enzimas metabólicas.

Los estudios farmacocinéticos también se pueden usar para investigar las vías de eliminación en un sujeto, por ej., depuración renal mediante excreción de la droga administrada en la orina en el tiempo. La excreción renal del Compuesto **1** en un modelo de perro tuvo lugar para evaluar la excreción de los riñones como vía de eliminación (Ensayo 4). Esta vía de eliminación es importante para los sujetos cuya función renal está afectada y necesitan tratamientos que sean mínimamente depurados mediante la excreción de los riñones. En una forma de realización, la excreción renal del Compuesto **1** o la forma cristalina del mismo en el sujeto es aproximadamente $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$ o $\leq 0,5\%$ de la dosis administrada en 24 horas.

Tal como se describe en la sección de los ensayos a continuación, se incluyeron junto con el Compuesto **1** en un ensayo con enzimas NEP *in vitro*, y en determinaciones *in vivo* de la biodisponibilidad oral y excreción renal en múltiples especies animales, compuestos de comparación de similar estructura química. En forma sorprendente, se observaron diferencias significativas en los resultados. Si bien los compuestos de comparación individuales exhibieron propiedades similares a las del Compuesto **1** en uno o más ensayos, solamente el Compuesto **1** exhibió, al mismo tiempo, actividad inhibitoria alta de la neprilisina humana, biodisponibilidad oral alta, y excreción renal baja, que se espera provean una utilidad particular en el tratamiento de la enfermedad.

En forma adicional, para usar efectivamente el Compuesto **1** como agente terapéutico, es deseable tener una forma en estado sólido de este compuesto que pueda ser fácilmente fabricada y que tenga estabilidad química y física aceptable, incluido un punto de

fusión alto. Los cristales del ácido libre del Compuesto **1** no pudieron obtenerse. Los cristales de arginina y calcio del Compuesto **1** finalmente fueron elaborados pero los cristales de arginina resultaron delicuescentes en condiciones ambiente y fueron difíciles de desarrollar en mayor medida. Por otro lado, los cristales de calcio fueron estables y se fundieron a aproximadamente 239 °C, y pueden usarse para un mayor desarrollo como agente terapéutico.

Enfermedades cardiovasculares

Al potenciar los efectos de los péptidos vasoactivos como los péptidos natriuréticos y bradiquinina, se espera que el Compuesto **1** encuentre utilidad en el tratamiento y/o la prevención de condiciones médicas tales como enfermedades cardiovasculares. Ver, por ejemplo, Roques y colaboradores (1993) *Pharmacol. Rev.* 45:87-146 y Dempsey y colaboradores (2009) *Amer. J. of Pathology* 174(3):782-796. Las enfermedades cardiovasculares de interés particular incluyen hipertensión e insuficiencia cardíaca. La hipertensión incluye, a modo de ilustración y no de limitación, lo siguiente: hipertensión primaria, que también se conoce como hipertensión esencial o hipertensión idiopática; hipertensión secundaria; hipertensión con enfermedad renal acompañante; hipertensión severa con o sin enfermedad renal acompañante; hipertensión pulmonar, incluida hipertensión arterial pulmonar; e hipertensión resistente. La insuficiencia cardíaca incluye, a modo de ilustración y no de limitación, lo siguiente: insuficiencia cardíaca congestiva; insuficiencia cardíaca aguda; insuficiencia cardíaca crónica, por ejemplo, con fracción de eyección reducida del ventrículo izquierdo (también conocida como insuficiencia cardíaca sistólica) o con fracción de eyección conservada del ventrículo izquierdo (también conocida como insuficiencia cardíaca diastólica); e insuficiencia cardíaca descompensada aguda y crónica. Por ende, una forma de realización de la invención se refiere a un método para tratar hipertensión; particularmente, hipertensión primaria o hipertensión arterial pulmonar, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1**.

Para el tratamiento de hipertensión primaria, la cantidad terapéuticamente efectiva es

típicamente la cantidad que es suficiente para disminuir la presión arterial del paciente. Esto incluiría tanto la hipertensión leve a moderada como la hipertensión severa. Cuando se usa para tratar la hipertensión, el Compuesto 1 se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos tales como antagonistas de aldosterona, inhibidores de la aldosterona sintasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina e inhibidores de enzima convertidora de la angiotensina/neprilisina de doble acción, activadores y estimuladores de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2), vacunas de angiotensina II, agentes antidiabéticos, agentes antilipídicos, agentes antitrombóticos, antagonistas de los receptores AT₁ y antagonistas de los receptores AT₁/inhibidores de neprilisina de doble acción, antagonistas de los receptores β_1 -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β -adrenérgicos/antagonistas de los α_1 -receptores de doble acción, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, antagonistas de los receptores de la endotelina, inhibidores de la enzima convertidora de la endotelina, inhibidores de neprilisina, péptidos natriuréticos y sus análogos, antagonistas de los receptores de depuración de péptidos natriuréticos, donantes de óxido nítrico, agentes antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la fosfodiesterasa (específicamente, inhibidores de PDE-V), agonistas de los receptores de la prostaglandina, inhibidores de la renina, estimuladores y activadores de la guanilato ciclasa soluble, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular de la invención, el compuesto de la invención se combina con un antagonista de los receptores AT₁, un bloqueador de los canales de calcio, un diurético, o una combinación de los mismos, y se usa para tratar hipertensión primaria. En otra forma de realización particular de la invención, el compuesto de la invención se combina con un antagonista de los receptores AT₁, y se usa para tratar hipertensión acompañada de enfermedad renal. Cuando se usa para tratar hipertensión resistente, el compuesto se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como inhibidores de la aldosterona sintasa.

Para el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar, la cantidad terapéuticamente efectiva es típicamente la cantidad que es suficiente para disminuir la resistencia vascular pulmonar. Otros objetivos del tratamiento son mejorar la capacidad de ejercicio del paciente.

Por ejemplo, en un ámbito clínico, la cantidad terapéuticamente efectiva puede ser la cantidad que mejora la capacidad del paciente para caminar cómodamente durante un período de 6 minutos (cubriendo una distancia de aproximadamente 20 a 40 metros). Cuando se usa para tratar hipertensión arterial pulmonar, el compuesto se puede administrar en
5 combinación con otros agentes terapéuticos tales como antagonistas de los receptores α -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β_1 -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β_2 -adrenérgicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, anticoagulantes, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, antagonistas de los receptores de la endotelina, inhibidores de PDE-V, análogos de la prostaglandina, inhibidores selectivos de
10 la recaptación de la serotonina, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular de la invención, el Compuesto **1** se combina con un inhibidor de PDE-V o un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina y se usa para tratar hipertensión arterial pulmonar.

Otra forma de realización de la invención se refiere a un método para tratar
15 insuficiencia cardíaca, en particular insuficiencia cardíaca congestiva (que incluye tanto insuficiencia cardíaca congestiva sistólica y diastólica), que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1**. Típicamente, la cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad que es suficiente para disminuir la presión arterial y/o mejorar las funciones renales. En un ámbito clínico, la cantidad terapéuticamente
20 efectiva puede ser la cantidad que es suficiente para mejorar la hemodinamia cardíaca como, por ejemplo, la reducción en la presión de enclavamiento, presión atrial derecha, presión de llenado, y resistencia vascular. En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra como una forma farmacéutica intravenosa. Cuando se usa para tratar insuficiencia cardíaca, el compuesto se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, tales
25 como antagonistas de los receptores de la adenosina, agentes de ruptura de los productos finales de glicación avanzada, antagonistas de aldosterona, antagonistas de los receptores AT₁, antagonistas de los receptores β_1 -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β -adrenérgicos/antagonistas de los α_1 -receptores de doble acción, inhibidores de las quimasas,

digoxina, diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de la endotelina (ECE, por sus siglas en inglés *Endothelin Converting Enzyme*), antagonistas de los receptores de la endotelina, péptidos natriuréticos y sus análogos, antagonistas de los receptores de depuración de péptidos natriuréticos, donantes de óxido nítrico, análogos de la
5 prostaglandina, inhibidores de PDE-V, activadores y estimuladores de la guanilato ciclasa soluble, y antagonistas de los receptores de la vasopresina. En una forma de realización particular de la invención, el Compuesto **1** se combina con un antagonista de aldosterona, un antagonista de los receptores β_1 -adrenérgicos, un antagonista de los receptores AT₁, o un diurético, y se usan para tratar insuficiencia cardíaca congestiva.

10

Diarrea

Como inhibidor de la NEP, se espera que el Compuesto **1** inhiba la degradación de las encefalinas endógenas y, por ende, dichos compuestos también pueden encontrar utilidad para el tratamiento de diarrea, incluida la diarrea infecciosa y secretora/acuosa. Ver, por ejemplo, Baumer y colaboradores (1992) *Gut* 33:753-758; Farthing (2006) *Digestive*
15 *Diseases* 24:47-58; y Marçais-Collado (1987) *Eur. J. Pharmacol.* 144(2):125-132. Cuando se usa para tratar diarrea, el Compuesto **1** puede combinarse con uno o más agentes antidiarreicos adicionales.

Enfermedades renales

20

Al potenciar los efectos de los péptidos vasoactivos como los péptidos natriuréticos y la bradiquinina, se espera que el Compuesto **1** mejore la función renal (ver Chen y colaboradores (1999) *Circulation* 100:2443-2448; Lipkin y colaboradores (1997) *Kidney Int.* 52:792-801; y Dussaule y colaboradores (1993) *Clin. Sci.* 84:31-39) y encuentren utilidad en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades renales en un sujeto que padece de
25 insuficiencia renal. Los enfermedades renales de interés particular incluyen nefropatía diabética, enfermedad renal crónica, proteinuria, y particularmente lesión renal aguda (causada, por ejemplo, por cirugía cardiovascular, quimioterapia, o el uso de tintes de contraste en toma de imágenes médicas) o insuficiencia renal aguda (ver Sharkovska y

colaboradores (2011) *Clin. Lab.* 57:507-515 y Newaz y colaboradores (2010) *Renal Failure* 32:384-390).

Un sujeto que padece de insuficiencia renal, que tiene enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés *Chronic Kidney Disease*) puede clasificarse de acuerdo con
5 los lineamientos de la Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) de la National Kidney Foundation (NKF). Una vez establecida la enfermedad renal crónica, es decir, daño en los riñones o tasa de filtración glomerular (GFR, por sus siglas en inglés *Glomerular Filtration Rate*) <60 mL/min/1,73 m² durante ≥ 3 meses, la etapa de la enfermedad puede asignarse de acuerdo con la clasificación KDOQI CKD. Éstas incluyen *Etapa 1* (daño en los
10 riñones con GFR normal o incrementada): GFR ≥ 90 ; *Etapa 2* (daño en los riñones con GFR disminuida leve): GFR 60-89; *Etapa 3* (GFR disminuida moderada): GFR 30-59; *Etapa 4* (GFR disminuida severa): GFR 15-29; y *Etapa 5* (insuficiencia renal): GFR <15 (o diálisis). La GFR se define en unidades de mL/min/1,73 m².

Una forma de realización incluye un método para tratar un sujeto que padece de
15 insuficiencia renal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo; específicamente, la forma cristalina **1'**. Este método además incluye tratar un sujeto que padece de insuficiencia renal con hipertensión o insuficiencia cardíaca. Cuando se usa para tratar enfermedad renal, el Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo, específicamente la forma cristalina **1'**, se puede administrar en
20 combinación con otros agentes terapéuticos, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores AT₁, y diuréticos.

Otra forma de realización incluye un método para tratar un sujeto que padece de insuficiencia renal que tiene enfermedad renal crónica con una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR, por sus siglas en inglés *estimated Glomular Filtration Rate*) de entre 60
25 mL/min/1,73 m² y 15 mL/min/1,73 m², que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo; específicamente, la forma cristalina **1'**. Otra forma de realización incluye un método para tratar un sujeto que padece de insuficiencia renal que tiene enfermedad renal crónica con una

tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) de ≥ 90 mL/min/1,73 m² (Etapa 1) o una eGFR de <15 mL/min/1,73 m² (Etapa 5), que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo; específicamente, la forma cristalina **1'**. A los efectos de esta invención, la enfermedad renal
5 severa puede clasificarse como una eGFR de <30 mL/min/1,73 m². En otra forma de realización más, se provee un método para tratar un sujeto que padece de insuficiencia renal que tiene enfermedad renal crónica clasificada como Etapa 1, Etapa 2, Etapa 3, Etapa 4, Etapa 5 o con rangos de eGFR que cubren una o más de estas etapas con el Compuesto **1** o una forma cristalina del mismo; específicamente, la forma cristalina **1'**.

10

Tratamiento preventivo

Al potenciar los efectos de los péptidos natriuréticos, también se espera que el Compuesto **1** sea útil en el tratamiento preventivo, debido a los efectos antihipertróficos y antifibróticos de los péptidos natriuréticos (ver Potter y colaboradores (2009) *Handbook of Experimental Pharmacology* 191:341-366), por ejemplo en la prevención del avance de la
15 insuficiencia cardíaca luego de infarto del miocardio, prevención de restenosis arterial después de angioplastia, prevención del engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos después de operaciones vasculares, prevención de aterosclerosis, y prevención de angiopatía diabética.

Glaucoma

20

Al potenciar los efectos de los péptidos natriuréticos, se espera que el Compuesto **1** sea útil para tratar glaucoma. Ver, por ejemplo, Diestelhorst y colaboradores (1989) *International Ophthalmology* 12:99-101. Cuando se usa para tratar glaucoma, el Compuesto **1** puede combinarse con uno o más agentes antiglaucoma adicionales.

Alivio del dolor

25

Como inhibidor de la NEP, se espera que el Compuesto **1** inhiba la degradación de las encefalinas endógenas y, por ende, dichos compuestos también pueden encontrar utilidad como analgésicos. Ver, por ejemplo, Roques y colaboradores (1980) *Nature* 288:286-288 y Thanawala y colaboradores (2008) *Current Drug Targets* 9:887-894. Cuando se usa para

tratar el dolor, el Compuesto **1** puede combinarse con una o más drogas antinociceptivas adicionales, tales como inhibidores de la aminopeptidasa N o dipeptidil peptidasa III, agentes antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la recaptación de la monoamina, relajantes musculares, antagonistas de los receptores de NMDA, agonistas de los receptores opioides, 5 agonistas de los receptores de la serotonina 5-HT_{1D}, y antidepresivos tricíclicos.

Otras utilidades

Debido a sus propiedades de inhibición de la NEP, también se espera que el Compuesto **1** sea útil como agente antitussivo, así como también que encuentre utilidad en el tratamiento de hipertensión portal asociada con cirrosis hepática (véase Sansoe y 10 colaboradores (2005) *J. Hepatol.* 43:791-798), cáncer (véase Vesely (2005) *J. Investigative Med.* 53:360-365), depresión (véase Noble y colaboradores (2007) *Exp. Opin. Ther. Targets* 11:145-159), trastornos menstruales, parto prematuro, pre-eclampsia, endometriosis, trastornos reproductivos (por ejemplo, infertilidad masculina y femenina, síndrome de ovario poliquístico, fallo de implantación), y disfunción sexual masculina y femenina, con 15 inclusión de disfunción eréctil masculina y trastorno de excitación sexual femenina. Más específicamente, se espera que el Compuesto **1** sea útiles para tratar la disfunción sexual femenina (ver Pryde y colaboradores (2006) *J. Med. Chem.* 49:4409-4424), que, con frecuencia, se define como la incapacidad o dificultad de un paciente femenino en encontrar satisfacción en su expresión sexual. Esto cubre una variedad de diversos trastornos sexuales 20 femeninos que incluyen, a modo de ilustración mas no de limitación, trastorno de deseo sexual hipoactivo, trastorno de excitación sexual, trastorno orgásmico y trastorno de dolor sexual. Cuando se usa para tratar dichos trastornos, especialmente la disfunción sexual femenina, el compuesto de la invención puede combinarse con uno o más de los siguientes agentes secundarios: inhibidores de PDE-V, agonistas de dopamina, agonistas y/o 25 antagonistas de los receptores de estrógenos, andrógenos, y estrógenos. Debido a su propiedad de inhibición de la NEP, también se espera que el Compuesto **1** tenga propiedades antiinflamatorias, y se espera que tenga utilidad como tal, en particular cuando se usa en combinación con estatinas.

Los estudios recientes sugieren que la NEP participa en la regulación de la función nerviosa en la diabetes insulino-deficiente y en la obesidad inducida por la dieta. Coppey y colaboradores (2011) *Neuropharmacology* 60:259-266. Por lo tanto, debido a su propiedad de inhibición de la NEP, también se espera que el Compuesto **1** sea útil para brindar
5 protección contra el deterioro de la función nerviosa causado por la diabetes o la obesidad inducida por la dieta.

La cantidad del Compuesto **1** administrada por dosis, o la cantidad total administrada por día, puede ser predeterminada o puede ser determinada sobre la base de un paciente individual al tener en cuenta numerosos factores, que incluyen la naturaleza y la severidad
10 de la afección del paciente, la afección que está siendo tratada, la edad, el peso y la salud general del paciente, la tolerancia del paciente al agente activo o metabolito activo, la vía de administración, las consideraciones farmacológicas tales como la actividad, la eficacia, la farmacocinética y los perfiles toxicológicos del compuesto y cualesquiera agentes secundarios que estén siendo administrados, y similares. El tratamiento de un paciente que
15 padece de una enfermedad o condición médica (tal como hipertensión) puede comenzar con una dosis predeterminada o una dosis determinada por el médico responsable, y continuará durante un período de tiempo necesario para prevenir, mejorar, suprimir o aliviar los síntomas de la enfermedad o condición médica. Los pacientes que se someten a dicho tratamiento típicamente serán controlados en forma rutinaria para determinar la efectividad
20 de la terapia. Por ejemplo, al tratar la hipertensión, es posible utilizar las mediciones de la presión arterial para determinar la efectividad del tratamiento. Otros indicadores similares para otras enfermedades y afecciones descritas en la presente son ampliamente conocidos y están fácilmente disponibles para el médico a cargo del tratamiento. El chequeo continuo por parte del médico asegurará que se administre la cantidad óptima del Compuesto **1** en
25 cualquier momento dado, así como también facilitará la determinación de la duración del tratamiento. Esto tiene un valor particular cuando también se administran agentes secundarios, ya que su selección, dosis y duración del tratamiento también pueden requerir de ajuste. De este modo, el régimen de tratamiento y el plan de dosificación se pueden ajustar

en el transcurso del tratamiento de tal manera que se administre la menor cantidad de agente activo o metabolito activo que exhibe la efectividad deseada y, además, que la administración continúe solamente el tiempo que sea necesario para tratar de manera exitosa la enfermedad o la condición médica.

- 5 El Compuesto **1** también encuentra utilidad como intermediario útil para la preparación de las formas cristalinas del Compuesto **1**, que incluyen, por ejemplo, la forma cristalina **1'**.

Herramientas de investigación

- Como el Compuesto **1** posee actividad de inhibición de la enzima NEP, también es
10 útil como herramienta de investigación para estudiar o investigar muestras biológicas o sistemas biológicos que tienen una enzima NEP; por ejemplo, para estudiar enfermedades donde participa la enzima NEP o sus sustratos peptídicos. Cualquier sistema biológico o muestra biológica adecuada que tiene una enzima NEP puede ser empleado en dichos estudios, que se pueden llevar a cabo ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las muestras biológicas o
15 sistemas biológicos representativos adecuados para dichos estudios incluyen, mas no se limitan a los siguientes: células, extractos celulares, membranas plasmáticas, muestras de tejidos, órganos aislados, mamíferos (tales como ratones, ratas, cobayos, conejos, perros, cerdos, humanos y demás), y similares, en donde los mamíferos son de particular interés. En una forma de realización particular de la invención, la actividad de la enzima NEP en un
20 mamífero es inhibida al administrar una cantidad inhibitoria de la NEP del Compuesto **1**.

- Cuando se usa como herramienta de investigación, un sistema biológico o una muestra biológica que comprende una enzima NEP se pone en contacto típicamente con una cantidad que inhibe la enzima NEP del Compuesto **1**. Después de que el sistema biológico o la muestra biológica se expone al compuesto, los efectos de inhibición de la enzima NEP se
25 determinan usando procedimientos y equipos convencionales, por ejemplo, al medir la unión de los receptores en un ensayo de unión o al medir los cambios mediados por ligandos en un ensayo funcional. La exposición abarca poner en contacto las células o el tejido con el compuesto, administrar el compuesto a un mamífero, por ejemplo mediante administración

i.p., p.o, i.v., s.c., o inhalación, y demás. Este paso de determinación puede comprender medir una respuesta (un análisis cuantitativo) o puede comprender realizar una observación (un análisis cualitativo). La medición de una respuesta implica, por ejemplo, determinar los efectos del compuesto sobre la muestra biológica o el sistema biológico usando
5 procedimientos y equipos convencionales, tales como ensayos de la actividad enzimática, y medir los cambios mediados por el producto o sustrato enzimático en los ensayos funcionales. Los resultados de los ensayos se pueden usar para determinar el nivel de actividad así como también la cantidad de compuesto necesaria para alcanzar el resultado deseado; es decir, la cantidad que inhibe la enzima NEP. Típicamente, el paso de
10 determinación implicará determinar los efectos de la inhibición de la enzima NEP.

En forma adicional, el Compuesto **1** puede usarse como herramienta de investigación para evaluar otros compuestos químicos y, por ende también es útil en ensayos de detección para descubrir, por ejemplo, nuevos compuestos que tienen actividad inhibitoria de la NEP. De este modo, el Compuesto **1** se usa como un estándar en un ensayo para permitir la
15 comparación de los resultados obtenidos con un compuesto de ensayo y con el Compuesto **1** para identificar aquellos compuestos de ensayo que tienen una actividad aproximadamente igual o superior (de tenerla). Por ejemplo, los datos de pK_i para un compuesto de ensayo o un grupo de compuestos de ensayo se comparan con los datos de pK_i para el Compuesto **1** a fin de identificar aquellos compuestos de ensayo que tienen las propiedades deseadas; por
20 ejemplo, compuestos de ensayo que tienen un valor pK_i igual o superior al compuesto de la invención. Este aspecto de la invención incluye, como formas de realización separadas, tanto la generación de datos de comparación (usando los ensayos apropiados) como el análisis de datos de ensayo para identificar los compuestos de ensayo de interés. Por ende, un compuesto de ensayo puede ser evaluado en un ensayo biológico mediante un método que comprende
25 los pasos de: (a) llevar a cabo un ensayo biológico con un compuesto de ensayo para arrojar un primer valor de ensayo; (b) llevar a cabo el ensayo biológico con el Compuesto **1** para arrojar un segundo valor de ensayo; en donde el paso (a) se realiza ya sea antes, después, o en forma concurrente con el paso (b); y (c) comparar el primer valor de ensayo del paso (a)

con el segundo valor de ensayo del paso (b). Los ensayos biológicos de ejemplo incluyen un ensayo de inhibición de la enzima NEP.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un método de estudio de un sistema biológico o una muestra biológica que comprende una enzima NEP, en donde el método
5 comprende: (a) poner en contacto el sistema biológico o la muestra biológica con el Compuesto **1**; y (b) determinar los efectos causados por el compuesto sobre el sistema biológico o la muestra biológica.

COMPOSICIONES Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

10 El Compuesto **1** se administra típicamente a un paciente en la forma de una formulación o composición farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente mediante cualquier vía de administración aceptable que incluye, a modo no taxativo, los modos de administración oral, rectal, vaginal, nasal, inhalada, tópica (incluida la administración transdérmica), ocular y parenteral. Asimismo, el Compuesto **1** se
15 puede administrar, por ejemplo, oralmente, en múltiples dosis al día (por ej., dos veces, tres veces o cuatro veces al día), en una única dosis diaria o en una única dosis semanal. Ha de entenderse que cualquier forma del Compuesto **1**, (es decir, base libre, ácido libre, sal farmacéuticamente aceptable, solvato, etc.) que sea adecuada para el modo de administración particular puede ser utilizada en las composiciones farmacéuticas reveladas
20 en la presente.

Por consiguiente, en una forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y el Compuesto **1**. La composición puede contener otros agentes terapéuticos y/o agentes de formulación, si se desea. Cuando se describen las composiciones, el “Compuesto **1**” también
25 puede denominarse en la presente como el “agente activo”, para distinguirlo de los otros componentes de la formulación, tales como el portador. Por ende, ha de entenderse que el término “agente activo” incluye los compuestos de la invención, así como también sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente contienen una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1. Aquellos versados en el arte reconocerán, no obstante, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente efectiva, tal como en composiciones a granel, o menos de una cantidad terapéuticamente efectiva; es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para administración múltiple a fin de alcanzar una cantidad terapéuticamente efectiva. Típicamente, la composición contendrá de aproximadamente 0,01-95% en peso de agente activo, incluyendo, de aproximadamente 0,01-30% en peso, tal como de aproximadamente 0,01-10% en peso, donde la cantidad real depende de la formulación propiamente dicha, la vía de administración, la frecuencia de dosificación, y otros factores. En una forma de realización, una composición adecuada para una forma farmacéutica oral, por ejemplo, puede contener de aproximadamente 5-70% en peso, o de aproximadamente 10-60% en peso de agente activo.

Es posible utilizar cualquier portador o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de la invención. La elección de un portador o excipiente particular, o las combinaciones de portadores o excipientes, dependerá del modo de administración que se está usando para tratar un paciente particular o tipo de condición médica o estado de la enfermedad. Al respecto, la preparación de una composición adecuada para un modo de administración particular se encuentra en gran medida dentro del alcance de las personas versadas en las artes farmacéuticas. En forma adicional, los portadores o excipientes usados en dichas composiciones están disponibles a nivel comercial. Para mayor ilustración, las técnicas de formulación convencionales se describen en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ma Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); y H. C. Ansel y colaboradores, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ma Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Los ejemplos representativos de los materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo no taxativo, los siguientes: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa;

celulosa, tal como celulosa microcristalina, y sus derivados, tales como carboximetil
celulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; sales de ácidos grasos, tales como
estearato de magnesio; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como
manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de
5 semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y
aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol,
manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar;
tampones (*buffers*), tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido
algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol
10 etílico; soluciones tamponadas con fosfato; gases propelentes comprimidos, tales como
clorofluorocarbonos e hidrofluorocarbonos; y otras sustancias compatibles no tóxicas
empleadas en composiciones farmacéuticas.

En una forma de realización de la invención, el portador farmacéuticamente
aceptable es estearato de magnesio. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede
15 comprender el Compuesto **1** o una forma cristalina **1'** y estearato de magnesio en una relación
de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1 del Compuesto **1** o una forma cristalina
1' respecto del estearato de magnesio. Otras relaciones del Compuesto **1** o una forma
cristalina **1'** respecto del estearato de magnesio incluyen, a modo no taxativo, 1:1, 5:1, 15:1,
20:1, 25:1, 30:1 y 50:1.

20 Las composiciones farmacéuticas se preparan típicamente al mezclar o combinar
completa e íntimamente el agente activo con un portador farmacéuticamente aceptable y uno
o más ingredientes opcionales. La mezcla combinada en forma uniforme resultante puede
luego ser modelada o cargada en comprimidos, cápsulas, píldoras, cartuchos, ampollas,
dispensadores y similares, usando procedimientos y equipos convencionales.

25 En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para
administración oral. Las composiciones adecuadas para administración oral pueden estar en
forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas, obleas, grageas, polvos, gránulos;
soluciones o suspensiones en un líquido acuoso o no acuoso; emulsiones líquidas agua en

aceite o aceite en agua; elíxires o jarabes; y similares; cada uno con una cantidad predeterminada del agente activo.

Cuando se destina para la administración oral en una forma farmacéutica sólida (cápsulas, comprimidos, píldoras, y similares), la composición típicamente comprende el

5 agente activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio, fosfato dicálcico o estearato de magnesio. Las formas farmacéuticas sólidas también pueden comprender lo siguiente: agentes de relleno o carga, tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; agentes aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o

10 acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegradores, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y/o carbonato de sodio; agentes retardadores de solución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes de humedecimiento, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; agentes absorbentes, tales como caolín y/o

15 arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes reguladores del pH. A los efectos de esta invención, el término “portadores farmacéuticamente aceptables” incluye todos los términos tales como “portadores”, “rellenos”, “cargas”, “aglutinantes”, “humectantes”, “agentes retardadores de

20 solución”, “agentes de humedecimiento”, “absorbentes”, “lubricantes”, “agentes colorantes” y “agentes reguladores del pH”, tal como se describieron con anterioridad.

Los agentes de liberación, agentes de humedecimiento, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes, y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas. Los agentes de recubrimiento de

25 ejemplo para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen los usados para recubrimientos entéricos, tales como acetato ftalato de celulosa, acetato ftalato de polivinilo, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico y éster del ácido metacrílico, acetato trimelitato de celulosa, carboximetil etil celulosa, acetato succinato de

hidroxipropil metil celulosa, y similares. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, 5 hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilenediaminotetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las composiciones también pueden formularse para proveer la liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropil metil celulosa en 10 diversas proporciones u otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener agentes opacificantes y pueden estar formuladas de tal manera que liberan solamente el agente activo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incorporación que se pueden usar incluyen 15 sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede estar en forma microencapsulada; opcionalmente, con uno o más de los excipientes descritos con anterioridad.

Una forma de realización de la invención incluye una forma farmacéutica oral que comprende el Compuesto **1** o la forma cristalina **1'** en una cápsula, comprimido, líquido o 20 suspensión. Otra forma de realización de la invención se refiere a una forma farmacéutica oral en donde la liberación del Compuesto **1** o la forma cristalina **1'** en un sujeto es una liberación inmediata, controlada o retardada. Si se usa una cápsula como forma farmacéutica oral, otra forma de realización incluye el hecho de que la cápsula esté conformada por gelatina, polisacáridos o polímeros sintéticos. En una forma de realización particular, la 25 cápsula comprende hidroxipropil metilcelulosa.

Los materiales de cápsulas adecuados de acuerdo con la invención se seleccionan entre gelatina, derivados de celulosa, almidón, derivados de almidón, quitosano y plásticos sintéticos. Si se usa gelatina como el material de la cápsula, puede usarse en una mezcla con

otros aditivos seleccionados entre polietilenglicol (PEG), glicerol, sorbitol, polipropilenglicol, copolímeros en bloque de PEO-PPO y otros polialcoholes y poliéteres. Cuando se usa un derivado de celulosa como el material de la cápsula, los polímeros preferidos son hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, 5 hidroximetilcelulosa y hidroxietilcelulosa. Si se usan plásticos sintéticos como el material de la cápsula, los materiales preferidos son polietileno, policarbonato, poliéster, polipropileno y tereftalato de polietileno. Se prefieren particularmente el polietileno, el policarbonato o el tereftalato de polietileno.

Las formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración oral incluyen, a 10 modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires farmacéuticamente aceptables. Las formas farmacéuticas líquidas típicamente comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, 15 propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa 20 microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Cuando se destinan a la administración oral, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden envasar en una forma farmacéutica unitaria. El término “forma farmacéutica unitaria” se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada para la 25 administración a un paciente; es decir, cada unidad contiene una cantidad predeterminada del agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea en forma individual o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas farmacéuticas unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras, y similares.

En otra forma de realización, las composiciones de la invención son adecuadas para administración por inhalación, y típicamente se encuentran en forma de aerosol o polvo. Dichas composiciones por lo general se administran usando dispositivos de suministro ampliamente conocidos, tales como un nebulizador, inhalador de polvo seco o inhalador de 5 dosis medidas. Los dispositivos nebulizadores producen una corriente de aire de alta velocidad que causa que la composición se rocíe como una bruma que es llevada a las vías respiratorias de un paciente. Una formulación para nebulizador de ejemplo comprende el agente activo disuelto en un portador para formar una solución, o micronizado y combinado con un portador para formar una suspensión de partículas micronizadas de tamaño respirable.

10 Los inhaladores de polvo seco administran el agente activo como polvo de flujo libre que se dispersa en el torrente aéreo del paciente durante la inspiración. Una formulación en polvo seco de ejemplo comprende el agente activo combinado en seco con un excipiente, tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico, poliláctido-co-glicólido, y combinaciones de los mismos. Los inhaladores de dosis medidas descargan una cantidad 15 medida del agente activo usando gas propelente comprimido. Una formulación de dosis medidas de ejemplo comprende una solución o suspensión del agente activo en un propelente licuado, tal como un clorofluorocarbono o hidrofluoroalcano. Los componentes opcionales de dichas formulaciones incluyen co-solventes, tales como etanol o pentano, y agentes tensoactivos, tales como trioleato de sorbitán, ácido oleico, lecitina y glicerina, y lauril 20 sulfato de sodio. Dichas composiciones son preparadas típicamente al agregar hidrofluoroalcano helado o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente activo, etanol (de estar presente) y el agente tensoactivo (de estar presente). Para preparar una suspensión, el agente activo es micronizado y luego combinado con el propelente. En forma alternativa, una formulación en suspensión puede prepararse al secar por aspersión un 25 recubrimiento de agente tensoactivo sobre partículas micronizadas del agente activo. La formulación luego se carga en un cartucho de aerosol, que forma una porción del inhalador.

El Compuesto **1** y las composiciones que lo comprenden también se pueden administrar por vía parenteral; por ej., mediante inyección subcutánea, intravenosa,

intramuscular o intraperitoneal. Para dicha administración, el agente activo es provisto en una solución estéril, suspensión o emulsión. Los solventes de ejemplo para preparar dichas formulaciones incluyen agua, solución salina, electrolitos, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol y polietilenglicol, aceites, aminoácidos, gelatina, azúcares, ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más antioxidantes, solubilizantes, estabilizadores, conservantes, agentes de humedecimiento, emulsionantes y agentes dispersantes. Los agentes tensoactivos, agentes estabilizadores adicionales o agentes de ajuste del pH (ácidos, bases o tampones) y antioxidantes son particularmente útiles para brindar estabilidad a la formulación, por ejemplo, para minimizar o evitar la hidrólisis de los enlaces éster y amida que pueden estar presentes en el compuesto. Estas formulaciones se pueden tornar estériles mediante el uso de un medio inyectable estéril, un agente de esterilización, filtración, irradiación, o calor.

Los portadores acuosos fisiológicamente aceptables representativos incluyen, a modo de ejemplo, agua estéril para inyección, USP; inyección de dextrosa, USP (por ej., dextrosa al 2,5, 5,0, 10, 20%, incluyendo inyección de dextrosa al 5% (D5/W)); inyección de dextrosa y cloruro de sodio, USP (por ej., dextrosa que varía del 2,5 al 10% y cloruro de sodio que varía del 0,12 (19 mEq de sodio) al 0,9% (154 mEq de sodio)); inyección de manitol, USP, (por ej., manitol al 5, 10, 15, 20 y 25%); inyección de Ringer, USP (por ej., 147 mEq de sodio, 4 mEq de potasio, 4,5 mEq de calcio y 156 mEq de cloruro por litro); inyección de lactato de Ringer, USP (por ej., 2,7 mEq de calcio, 4 mEq de potasio, 130 mEq de sodio, y 28 mEq de lactato por litro); inyección de cloruro de sodio, USP (por ej., cloruro de sodio al 0,9%) y similares.

Cuando se administra a un paciente, el Compuesto **1** será típicamente diluido en aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 10 mL del portador acuoso por mg del Compuesto **1**; tal como aproximadamente de 0,6 a aproximadamente 8 mL por mg.

En una forma de realización particular, la formulación parenteral comprende una solución acuosa de ciclodextrina como el portador farmacéuticamente aceptable. Las

ciclodextrinas adecuadas incluyen moléculas cíclicas que contienen seis o más unidades α -D-glucopiranosas ligadas en las posiciones 1,4 por un enlace, tal como en amilasa, β -ciclodextrina o cicloheptaamilosa. Las ciclodextrinas de ejemplo incluyen derivados de ciclodextrina tales como hidroxipropil y sulfobutil éter ciclodextrinas tales como
5 hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutil éter β -ciclodextrina. Los tampones de ejemplo para tales formulaciones incluyen tampones basados en ácido carboxílico tales como soluciones tampones de citrato, lactato y maleato. En una forma de realización de la invención, una forma farmacéutica intravenosa comprende el Compuesto **1** o la forma cristalina **1'** en una solución tampón.

10 En una forma de realización, el Compuesto **1** o una composición farmacéutica que lo comprende es un polvo liofilizado. Típicamente, el polvo liofilizado es estéril y se envasa en un vial sellado herméticamente, o una ampolla, o un recipiente similar.

El Compuesto **1** también se puede administrar por vía transdérmica usando excipientes y sistemas de suministro transdérmico conocidos. Por ejemplo, el Compuesto **1**
15 se puede mezclar con agentes potenciadores de la permeación, tales como propilenglicol, polietilenglicol monolaurato, azacicloalcan-2-onas, y similares, e incorporarse en un parche o sistema de suministro similar. Es posible usar excipientes adicionales, que incluyen agentes gelificantes, emulsionantes y tampones, en dichas composiciones transdérmicas, si se desea.

20 *Agentes secundarios*

El Compuesto **1** puede ser útil como el único tratamiento de una enfermedad, o puede combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales a fin de obtener el efecto terapéutico deseado. Por ende, en una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen otras drogas que son co-administradas con el Compuesto **1**. Por
25 ejemplo, la composición puede comprender, además, una o más drogas (también conocidas como “agente(s) secundario(s)”). Dichos agentes terapéuticos son ampliamente conocidos en el arte, e incluyen antagonistas de los receptores de adenosina, antagonistas de los receptores α -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β_1 -adrenérgicos, agonistas de los

receptores β_2 -adrenérgicos, antagonistas de los receptores β -adrenérgicos/ α_1 -adrenérgicos de doble acción, agentes de ruptura de productos finales de glicación avanzada, antagonistas de la aldosterona, inhibidores de la aldosterona sintasa, inhibidores de la aminopeptidasa N, andrógenos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina e inhibidores de la neprilisina/enzima convertidora de angiotensina de doble acción, activadores y estimuladores de la enzima convertidora de angiotensina 2, vacunas contra la angiotensina-II, anticoagulantes, agentes antidiabéticos, agentes antidiarreicos, agentes antiglaucoma, agentes antilipídicos, agentes antinociceptivos, agentes antitrombóticos, antagonistas de los receptores AT₁ y antagonistas de los receptores AT₁/inhibidores de la neprilisina de doble acción y bloqueadores de los receptores de angiotensina multifuncionales, antagonistas de los receptores de la bradiquinina, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la quimasa, digoxina, diuréticos, agonistas de dopamina, inhibidores de la enzima convertidora de la endotelina, antagonistas de los receptores de la endotelina, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, estrógenos, agonistas y/o antagonistas de los receptores de estrógenos, inhibidores de la recaptación de monoamina, relajantes musculares, péptidos natriuréticos y sus análogos, antagonistas de los receptores de depuración de péptidos natriuréticos, inhibidores de la neprilisina, donantes de óxido nítrico, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antagonistas de los receptores de N-metil d-aspartato, agonistas de los receptores opioides, inhibidores de la fosfodiesterasa, análogos de la prostaglandina, agonistas de los receptores de la prostaglandina, inhibidores de la renina, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, bloqueador de los canales de sodio, estimuladores y activadores de la guanilato ciclasa soluble, antidepresivos tricíclicos, antagonistas de los receptores de la vasopresina, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de estos agentes se detallan en la presente.

Una forma de realización específica incluye una composición farmacéutica que comprende el Compuesto **1**, o la forma cristalina del mismo, y un antagonista de los receptores AT₁, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE), un inhibidor de la renina, un diurético, o combinaciones de los

mismos y, opcionalmente, uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Por consiguiente, en otro aspecto adicional de la invención, una composición farmacéutica comprende Compuesto **1**, un segundo agente activo, y un portador farmacéuticamente aceptable. Es posible incluir terceros, cuartos, etc., agentes activos en la
5 composición. En la terapia combinada, la cantidad del Compuesto **1** que es administrada, así como también la cantidad de agentes secundarios, puede ser menor a la cantidad típicamente administrada en monoterapia.

El Compuesto **1** se puede mezclar físicamente con el segundo agente activo para formar una composición que contiene ambos agentes; o cada agente puede estar presente en
10 composiciones separadas y distintas que se administran al paciente en forma simultánea o en momentos separados. Por ejemplo, el Compuesto **1** se puede combinar con un segundo agente activo usando equipos y procedimientos convencionales para formar una combinación de agentes activos que comprende el Compuesto **1** y un segundo agente activo. En forma adicional, los agentes activos pueden combinarse con un portador
15 farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica que comprende el Compuesto **1**, un segundo agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. En esta forma de realización, los componentes de la composición son típicamente mezclados o combinados para crear una mezcla física. La mezcla física luego se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva usando cualquiera de las vías descritas en la presente.

En forma alternativa, los agentes activos pueden permanecer separados y distintos
20 antes de la administración al paciente. En esta forma de realización, los agentes no se mezclan físicamente juntos antes de la administración sino que se administran en forma simultánea o en momentos separados como composiciones separadas. Dichas composiciones se pueden envasar por separado, o se pueden envasar juntas en un kit. Cuando se administran
25 en momentos separados, el agente secundario típicamente se administra menos de 24 horas después de la administración del Compuesto **1**, en un período que oscila entre la administración concurrente con la administración del compuesto de la invención y aproximadamente 24 horas después de la dosis. Esto también se denomina “administración

secuencial”. Por ende, el Compuesto **1** se puede administrar por vía oral en forma simultánea o secuencial con otro agente activo usando dos comprimidos –un comprimido por cada agente activo– donde “secuencial” puede significar ser administrado inmediatamente después de la administración del Compuesto **1** o en algún momento posterior predeterminado
5 (por ej., una hora después o tres horas después). También se contempla que el agente secundario se pueda administrar más de 24 horas después de la administración del Compuesto **1**. En forma alternativa, la combinación se puede administrar mediante diferentes vías de administración, es decir, una por vía oral y la otra por inhalación.

En una forma de realización, el kit comprende una primera forma farmacéutica que
10 comprende el Compuesto **1** y al menos una forma farmacéutica adicional que comprende uno o más de los agentes secundarios establecidos en la presente, en cantidades suficientes para llevar a cabo los métodos de la invención. La primera forma farmacéutica y la segunda (o tercera, etc.) forma farmacéutica, juntas, comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de agentes activos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o
15 condición médica en un paciente.

El o los agentes secundarios, cuando se incluyen, están presentes en una cantidad terapéuticamente efectiva, de tal manera que se administran típicamente en una cantidad que produce un efecto terapéuticamente beneficioso cuando se co-administra con el Compuesto **1** de la invención. El agente secundario puede estar en forma de sal farmacéuticamente
20 aceptable, solvato, estereoisómero ópticamente puro, y similares. El agente secundario también puede estar en forma de prodroga; por ejemplo, un compuesto que tiene un grupo de ácido carboxílico que ha sido esterificado. Por ende, los agentes secundarios enunciados en la presente están destinados a incluir todas estas formas, y se encuentran disponibles a nivel comercial o se pueden preparar usando procedimientos y reactivos convencionales.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un
25 antagonista de los receptores de adenosina, cuyos ejemplos representativos incluyen naxifilina, rolofilina, SLV-320, teofilina y tonapofilina.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un

antagonista de los receptores α -adrenérgicos, cuyos ejemplos representativos incluyendo xazosina, prazosina, tamsulosina y terazosina.

El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con un antagonista de los receptores β_1 -adrenérgicos (“ β_1 -bloqueador”), cuyos ejemplos incluyen acebutolol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, bubridina, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol, indenolol, labetolol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol tal como metoprolol succinato y metoprolol tartrato, moprolol, nadolol, nadoxolol, nebivalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, perbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propranolol, sotalol, sufinalol, talindol, tertatolol, tilisolol, timolol, toliprolol, xibenolol, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el β_1 -antagonista se selecciona entre atenolol, bisoprolol, metoprolol, propranolol, sotalol, y combinaciones de los mismos. Típicamente, el β_1 -bloqueador se administra en una cantidad suficiente brindar desde aproximadamente 2 hasta 900 mg por dosis.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agonista de los receptores β_2 -adrenérgicos, cuyos ejemplos incluyen albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, indacaterol, isoetarina, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, salmefamol, salmeterol, terbutalina, vilanterol, y similares. Típicamente, el agonista de los receptores β_2 -adrenérgicos se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 0,05 hasta 500 μ g por dosis.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agente de ruptura de productos finales de glicación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés *Advanced Glycation End Product*), cuyos ejemplos incluyen alagebrijo (o ALT-711), y TRC4149.

En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de aldosterona, cuyos ejemplos incluyen eplerenona, espironolactona, y combinaciones de los mismos. Típicamente, el antagonista de aldosterona se administra en

una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 5 hasta 300 mg por día.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de la aminopeptidasa N o dipeptidil peptidasa III, cuyos ejemplos incluyen bestatina y PC18 (2-amino-4-metilsulfonil butano tiol, metionina tiol).

5 El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), cuyos ejemplos incluyen accupril, alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceranapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, fosinoprilat, imidapril, lisinopril, moexipril, monopril, moveltipril, pentopril, perindopril, quinapril, quinaprilat, ramipril, ramiprilat, acetato de saralasina,
10 spirapril, temocapril, trandolapril, zofenopril, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el inhibidor de la ACE se selecciona entre: benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, ramipril, y combinaciones de los mismos. Típicamente, el inhibidor de la ACE se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 1 hasta 150 mg por día.

15 En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina/neprilisina (ACE/NEP) de doble acción, cuyos ejemplos incluyen: AVE-0848 (ácido (4*S*,7*S*,12*bR*)-7-[3-metil-2(*S*)-sulfanilbutiramido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahidropirido[2,1-*a*][2]-benzazepina-4-carboxílico); AVE-7688 (ilepatril) y su compuesto madre; BMS-182657 (ácido 2-[2-oxo-
20 3(*S*)-[3-fenil-2(*S*)-sulfanilpropionamido]-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-1-benzazepin-1-il]acético); CGS-35601 (N-[1-[4-metil-2(*S*)-sulfanilpentanamido]ciclopentil-carbonil]-L-triptófano); fasidotril; fasidotrilato; enalaprilat; ER-32935 (ácido (3*R*,6*S*,9*aR*)-6-[3(*S*)-metil-2(*S*)-sulfanilpentanamido]-5-oxoperhidrotiazolo[3,2-*a*]azepina-3-carboxílico); gempatrilat; MDL-101264 (ácido (4*S*,7*S*,12*bR*)-7-[2(*S*)-(2-morfolinoacetiltio)-3-fenilpropionamido]-6-
25 oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahidropirido[2,1-*a*][2]benzazepina-4-carboxílico); MDL-101287 (ácido [4*S*-[4*α*,7*α*(*R**),12*bβ*]]-7-[2-(carboximetil)-3-fenilpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahidropirido[2,1-*a*][2]benzazepina-4-carboxílico); omapatrilat; RB-105 (N-[2(*S*)-(mercaptometil)-3(*R*)-fenilbutil]-L-alanina); sampatrilat; SA-898 ((2*R*,4*R*)-N-

[2-(2-hidroxifenil)-3-(3-mercaptopropionil)thiazolidin-4-ilcarbonil]-L-fenilalanina); Sch-50690 (N-[1(S)-carboxi-2-[N2-(metanosulfonil)-L-lisilamino]etil]-L-valil-L-tirosina); y combinaciones de los mismos, también puede incluirse. En una forma de realización particular, el inhibidor de la ACE/NEP se selecciona entre: AVE-7688, enalaprilat, fasidotril, 5 fasidotrilato, omapatrilat, sampatrilat, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto 1 se administra en combinación con un activador o estimulador de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2).

En una forma de realización, el Compuesto 1 se administra en combinación con una vacuna de angiotensina II, cuyos ejemplos incluyen ATR12181 y CYT006-AngQb.

10 En una forma de realización, el Compuesto 1 se administra en combinación con un anticoagulante, cuyos ejemplos incluyen: cumarinas tales como warfarina; heparina; e inhibidores directos de trombina tales como argatrobán, bivalirudina, dabigatrán, y lepirudina.

En otra forma de realización más, el Compuesto 1 se administra en combinación con 15 un agente antidiabético, cuyos ejemplos incluyen drogas inyectables así como también drogas efectivas para administración oral, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de drogas inyectables incluyen insulina y derivados de insulina. Los ejemplos de drogas efectivas para administración oral incluyen: biguanidas tales como metformina; antagonistas de glucagón; inhibidores de la α -glucosidasa tales como acarbosa y miglitol; inhibidores de 20 la dipeptidil peptidasa IV (inhibidores de DPP-IV) tales como alogliptina, denagliptina, linagliptina, saxagliptina, sitagliptina, y vildagliptina; meglitinidas tales como repaglinida; oxadiazolidinedionas; sulfonilureas tales como clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, y tolazamida; tiazolidinodionas tales como pioglitazona y rosiglitazona; y combinaciones de las mismas.

25 En otra forma de realización, el Compuesto 1 se administra en combinación con tratamientos antidiarreicos. Las opciones de tratamiento representativas incluyen soluciones de rehidratación orales (ORS, por sus siglas en inglés *Oral Rehydration Solutions*), loperamida, difenoxilato y subsalicilato de bismuto.

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agente anti-glaucoma, cuyos ejemplos incluyen: agonistas α -adrenérgicos tales como brimonidina; antagonistas de los receptores β_1 -adrenérgicos; β_1 -bloqueadores tópicos tales como betaxolol, levobunolol, y timolol; inhibidores de la anhidrasa carbónica tales como acetazolamida, brinzolamida o dorzolamida; agonistas colinérgicos tales como cevime-
5 DMXB-anabaseina; compuestos de epinefrina; mióticos tales como pilocarpina; y análogos de prostaglandina.

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agente antilipídico, cuyos ejemplos incluyen: inhibidores de proteínas de transferencia de éster de coles-
10 téster (CETPs, por su siglas en inglés *Cholesteryl Ester Transfer Proteins*) tales como anacetrapib, dalcetrapib y torcetrapib; estatinas tales como atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina; y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agente antitrombótico, cuyos ejemplos incluyen: aspirina; agentes anti-plaquetarios tales como clopidogrel, prasugrel y ticlopidina; heparina, y combinaciones de los mismos.
15

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores AT₁, también conocidos como bloqueadores de los receptores tipo 1 de la angiotensina II (ARBs, del inglés *Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers*). Los ARBs representativos incluyen abitesartán, azilsartán (por ej., azilsartán medoxomilo),
20 bencilosartán, candesartán, candesartán cilexetilo, elisartán, embusartán, enoltasosartán, eprosartán, EXP3174, fonsartán, forasartán, glicilosartán, irbesartán, isoteolina, losartán, medoximilo, milfasartán, olmesartán (por ej., olmesartán medoxomilo), opomisartán, prazosartán, ripisartán, saprisartán, saralasina, sarmesina, TAK-591, tasosartán, telmisartán, valsartán, zolasartán, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el ARB se selecciona entre azilsartán medoxomilo, candesartán cilexetilo,
25 eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán medoxomilo, saprisartán, tasosartán, telmisartán, valsartán, y combinaciones de los mismos. Las sales y/o prodrogas de ejemplo incluyen candesartán cilexetilo, eprosartán mesilato, sal potásica de losartán, y olmesartán

medoxomilo. Típicamente, el ARB se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 4 hasta 600 mg por dosis, donde las dosis diarias de ejemplo oscilan entre 20 y 320 mg por día.

El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con un agente de
5 doble acción, tal como un antagonista de los receptores AT₁/inhibidor de neprilisina (ARB/NEP), cuyos ejemplos incluyen los compuestos descritos en las Patentes U.S. Nos. 7.879.896 y 8.013.005, a nombre de Allegretti y colaboradores, tal como el compuesto de ácido 4'-{2-etoxi-4-etil-5-[(S)-2-mercapto-4-metilpentanoilamino)-metil]imidazol-1-ilmetil}-3'-fluorobifenil-2-carboxílico.

10 El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con bloqueadores de los receptores de angiotensina multifuncionales tal como se describen en Kurtz & Klein (2009) *Hypertension Research* 32:826-834.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de bradiquinina, por ejemplo, icatibant (HOE-140). Se espera
15 que esta terapia combinada pueda presentar la ventaja de prevenir angioedema u otras consecuencias indeseadas de niveles elevados de bradiquinina.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un bloqueador de los canales de calcio, cuyos ejemplos incluyen amlodipina, anipamilo, aranipina, barnidipina, benciclano, benidipina, bepridilo, clentiazem, cilnidipina, cinarizina,
20 diltiazem, efonidipina, elgodipina, etafenona, felodipina, fendilina, flunarizina, galopamilo, isradipina, lacidipina, lercanidipina, lidoflazina, lomerizina, manidipina, mibefradilo, nicardipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, nivaldipina, perhexilina, prenilamina, riosidina, semotiadilo, terodilina, tiapamilo, verapamilo, amlodipina, anipamilo, aranipina, barnidipina, benciclano,
25 benidipina, bepridilo, clentiazem, cilnidipina, cinarizina, diltiazem, efonidipina, elgodipina, etafenona, felodipina, fendilina, flunarizina, galopamilo, isradipina, lacidipina, lercanidipina, lidoflazina, lomerizina, manidipina, mibefradilo, nicardipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, nivaldipina,

perhexilina, prenilamina, riosidina, semotiadilo, terodilina, tiapamilo, verapamilo, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el bloqueador de los canales de calcio se selecciona entre amlodipina, bepridilo, diltiazem, felodipina, isradipina, lacidipina, nicardipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, riosidina, verapamilo, y combinaciones de los mismos. Típicamente, el bloqueador de los canales de calcio se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 2 hasta 500 mg por dosis.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de las quimasas, tales como TPC-806 y 2-(5-formilamino-6-oxo-2-fenil-1,6-dihidropirimidin-1-il)-N-[{3,4-dioxo-1-fenil-7-(2-piridiloxi)}-2-heptil]acetamida (NK3201).

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un diurético, cuyos ejemplos incluyen: inhibidores de la anhidrasa carbónica tales como acetazolamida y diclorfenamida; diuréticos de asa, que incluyen derivados de sulfonamida tales como acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, disulfamida, etoxolamida, furosemida, mefrusida, metazolamida, piretanida, torsemida, tripamida y xipamida, así como también diuréticos no sulfonamida tales como ácido etacrínico y otros compuestos de ácido fenoxiacético tales como ácido tienílico, indacrinona y quincarbato; diuréticos osmóticos tales como manitol; diuréticos ahorradores de potasio, que incluyen antagonistas de la aldosterona tales como espironolactona, e inhibidores de los canales de Na⁺ tales como amilorida y triamtereno; tiazida y diuréticos de tipo tiazida tales como altiazida, bendroflumetiazida, bencilhidroclorotiazida, benzotiazida, butiazida, clortalidona, clorotiazida, ciclopentiazida, ciclotiazida, epitiazida, etiazida, fenquizona, flumetiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, indapamida, metilclotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politiazida, quinetazona, teclotiazida y triclorometiazida; y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el diurético se selecciona entre amilorida, bumetanida, clorotiazida, clortalidona, diclorofenamida, ácido etacrínico,

furosemida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, indapamida, metilclotiazida, metolazona, torsemida, triamtereno, y combinaciones de los mismos. El diurético se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 5 hasta 50 mg por día, más típicamente desde 6 hasta 25 mg por día, donde las dosis habituales son de 6,25 mg, 12,5 mg o 25 mg por día.

El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con un inhibidor de la enzima convertidora de endotelina (ECE), cuyos ejemplos incluyen fosforamidón, CGS 26303, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de la endotelina, cuyos ejemplos incluyen: antagonistas selectivos de los receptores de la endotelina que afectan los receptores de endotelina A, tales como avosentán, ambrisentán, atrasentán, BQ-123, clazosentán, darusentán, sitaxentán, y zibotentán; y antagonistas de los receptores de las endotelinas duales que afectan tanto los receptores de la endotelina A como los receptores de la endotelina B, tales como bosentán, macitentán, tezosentán).

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** se administra en combinación con uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa, que también se conocen como “estatinas”. Las estatinas representativas incluyen atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de la recaptación de monoamina, cuyos ejemplos incluyen inhibidores de la recaptación de la norepinefrina tales como atomoxetina, bupropión y el metabolito de bupropión hidroxibupropión, maprotilina, reboxetina, y viloxazina; inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) tales como citalopram y el metabolito del citalopram, desmetilcitalopram, dapoxetina, escitalopram (por ej., escitalopram oxalato), fluoxetina y el metabolito desmetil fluoxetina, norfluoxetina, fluvoxamina (por ej., fluvoxamina maleato), paroxetina, sertralina y el metabolito de la sertralina, demetilsertalina; inhibidores duales de la recaptación de la serotonina-norepinefrina (SNRIs, del inglés *Serotonin-*

Norepinephrine Reuptake Inhibitors) tales como bicifadina, duloxetina, milnaciprán, nefazodona y venlafaxina; y combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un relajante muscular, cuyos ejemplos incluyen: carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, diflunisal, metaxalona, metocarbamol, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un péptido natriurético o análogo, cuyos ejemplos incluyen: carperitida, CD-NP (Nile Therapeutical Agents), CU-NP, nesiritida, PL-3994 (Palatin Technologies, Inc.), ularitida, cenderitida, y los compuestos descritos en Ogawa et al (2004) *J.Biol.Chem.* 279:28625-31. Estos compuestos también se denominan “agonistas del receptor A de los péptidos natriuréticos (NPR-A, por sus siglas en inglés *Natriuretic Peptide Receptor-A*)”. En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de depuración de péptidos natriuréticos (NPR-C, por sus siglas en inglés *Natriuretic Peptide Clearance Receptor*) tales como SC-46542, cANF (4-23), y AP-811 (Veale (2000) *Bioorg Med Chem Lett* 10:1949-52). Por ejemplo, AP-811 ha mostrado sinergia cuando se combinó con el inhibidor de la NEP, tiorfán (Wegner (1995) *Clin.Exper.Hypert.* 17:861-876).

En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de la neprilisina (NEP), cuyos ejemplos incluyen: AHU-377; candoxatril; candoxatrilat; dexecadotril (éster bencílico de (+)-N-[2(R)-(acetiltiometil)-3-fenilpropionil]glicina); CGS-24128 (ácido 3-[3-(bifenil-4-il)-2-(fosfonometilamino)propionamido]propiónico); CGS-24592 (ácido (S)-3-[3-(bifenil-4-il)-2-(fosfonometilamino)propionamido]propiónico); CGS-25155 (éster bencílico de N-[9(R)-(acetiltiometil)-10-oxo-1-azaciclododecan-2(S)-ilcarbonil]-4(R)-hidroxi-L-prolina); los derivados de ácido 3-(1-carbamoilciclohexil)propiónico descritos en el documento WO 2006/027680 a nombre de Hepworth y colaboradores (Pfizer Inc.); JMV-390-1 (2(R)-bencil-3-(N-hidroxicarbamoil)propionil-L-isoleucil-L-leucina); ecadotril; fosforamidón; retrotiorfán; RU-42827 (2-(mercaptometil)-N-(4-piridinil)bencenopropionamida); RU-

44004 (N-(4-morfolinil)-3-fenil-2-(sulfanilmetil)propionamida); SCH-32615 ((*S*)-N-[N-(1-carboxi-2-feniletil)-L-fenilalanil]-β-alanina) y su prodroga SCH-34826 ((*S*)-N-[N-[1-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]carbonil]-2-feniletil]-L-fenilalanil]-β-alanina); sialorfina; SCH-42495 (éster etílico de N-[2(*S*)-(acetilsulfanilmetil)-3-(2-metilfenil)propionil]-L-metionina); espinorfina; SQ-28132 (N-[2-(mercaptometil)-1-oxo-3-fenilpropil]leucina); SQ-28603 (N-[2-(mercaptometil)-1-oxo-3-fenilpropil]-β-alanina); SQ-29072 (ácido 7-[[2-(mercaptometil)-1-oxo-3-fenilpropil]amino]heptanoico); tiorfán y su prodroga, racecadotril; UK-69578 (ácido cis-4-[[[1-[2-carboxi-3-(2-metoxietoxi)propil]ciclopentil]carbonil]amino]ciclohexanocarboxílico); UK-447,841 (ácido 2-{1-[3-(4-clorofenil)propilcarbamoil]-ciclopentilmetil}-4-metoxibutírico); UK-505,749 (ácido (*R*)-2-metil-3-{1-[3-(2-metilbenzotiazol-6-il)propilcarbamoil]ciclopentil}propiónico); ácido 5-bifenil-4-il-4-(3-carboxipropionilamino)-2-metilpentanoico y éster etílico del ácido 5-bifenil-4-il-4-(3-carboxipropionilamino)-2-metilpentanoico (WO 2007/056546); daglutril [ácido (3*S*,2'*R*)-3-{1-[2'-(etoxicarbonil)-4'-fenilbutil]-ciclopentan-1-carbonilamino}-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1*H*-1-benzazepina-1-acético] descrito en el documento WO 2007/106708 a nombre de Khder y colaboradores (Novartis AG); y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el inhibidor de la NEP se selecciona entre AHU-377, candoxatril, candoxatrilat, CGS-24128, fosforamidón, SCH-32615, SCH-34826, SQ-28603, tiorfán, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el inhibidor de la NEP es un compuesto tal como daglutril o CGS-26303 (ácido [N-[2-(bifenil-4-il)-1(*S*)-(1*H*-tetrazol-5-il)etil]amino]metilfosfónico), que tiene actividad tanto como inhibidor de la enzima convertidora de la endotelina (ECE) cuanto como inhibidor de la NEP. También es posible emplear otros compuestos de inhibición de ECE/NEP de doble acción. El inhibidor de la NEP se administra en una cantidad suficiente para brindar desde aproximadamente 20 hasta 800 mg por día, donde las dosis diarias típicas abarcan desde 50 hasta 700 mg por día; más comúnmente, desde 100 hasta 600 o desde 100 hasta 300 mg por día.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un donante de óxido nítrico, cuyos ejemplos incluyen: nicorandil; nitratos orgánicos tales como

pentaeritritol tetranitrato; y sidnoniminas tales como linsidomina y molsidomina.

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), cuyos ejemplos incluyen: acetmetacina, ácido acetil salicílico, alclofenac, alminoprofeno, amfenac, amiprilosa, aloxiprina, anirolac, 5 apazona, azapropazona, benorilato, benoxaprofeno, bezpiperilona, broperamol, ácido buclórico, carprofeno, clidanac, diclofenac, diflunisal, diftalona, enolicam, etodolac, etoricoxib, fenbufeno, fenclofenac, ácido fenclózico, fenoprofeno, fentiazac, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, furofenac, ibufenac, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, isoxepac, isoxicam, ketoprofeno, ketorolac, lofemizol, 10 lornoxicam, meclofenamato, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, mesalamina, mioprofeno, mofebutazona, nabumetona, naproxeno, ácido niflúmico, oxaprozina, oxpinac, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, salsalato, sudoxicam, sulfasalazina, sulindac, suprofeno, tenoxicam, tiopinac, ácido tiaprofénico, tioxaprofeno, ácido tolfenámico, tolmetina, triflumidato, zidometacina, 15 zomepirac, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el NSAID se selecciona entre etodolac, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, meloxicam, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de N-metil d-aspartato (NMDA), cuyos ejemplos incluyen 20 amantadina, dextrometorfano, dextropropoxifeno, ketamina, ketobemidona, memantina, metadona, y otros.

En otra forma de realización adicional, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agonista de los receptores opioides (también conocidos como “analgésicos opioides”). Los agonistas de los receptores opioides representativos incluyen: buprenorfina, 25 butorfanol, codeína, dihidrocodeína, fentanilo, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, nalbufina, nalmefeno, nalorfina, naloxona, naltrexona, nalorfina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, y combinaciones de los mismos. En ciertas formas de realización, el agonista de los receptores

opioides se selecciona entre codeína, dihidrocodeína, hidrocodona, hidromorfona, morfina, oxicodona, oximorfona, tramadol, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización particular, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE); particularmente, un inhibidor de PDE-V. Los
5 inhibidores de PDE-V representativos incluyen avanafil, lodenafil, mirodenafil, sildenafil (Revatio®), tadalafil (Adcirca®), vardenafil (Levitra®), y udenafil.

En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un análogo de la prostaglandina (conocido también como “prostanoides” o “análogos de prostaciclina”). Los análogos de las prostaglandinas representativos incluyen beraprost
10 sódico, bimatoprost, epoprostenol, iloprost, latanoprost, tafluprost, travoprost y treprostinil, donde bimatoprost, latanoprost y tafluprost son de particular interés.

En otra forma de realización más, el Compuesto **1** se administra en combinación con un agonista de los receptores de la prostaglandina, cuyos ejemplos incluyen bimatoprost, latanoprost, travoprost, y similares.

15 El Compuesto **1** también se puede administrar en combinación con un inhibidor de la renina, cuyos ejemplos incluyen aliskirén, enalkirén, remikirén, y combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina (SSRI), cuyos ejemplos incluyen:
20 citalopram y el metabolito de citalopram, desmetil-citalopram, dapoxetina, escitalopram (por ej., escitalopram oxalato), fluoxetina y el metabolito, desmetil fluoxetina, norfluoxetina, fluvoxamina (por ej., fluvoxamina maleato), paroxetina, sertralina y el metabolito de sertralina, desmetil-sertralina, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un
25 agonista de los receptores de serotonina 5-HT_{1D}, cuyos ejemplos incluyen triptanes tales como almotriptán, avitriptán, eletriptán, frovatriptán, naratriptán, rizatriptán, sumatriptán y zolmitriptán.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un

bloqueador de los canales de sodio, cuyos ejemplos incluyen carbamazepina, fosfenitoína, lamotrigina, lidocaína, mexiletina, oxcarbazepina, fenitoína, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un
5 estimulador o activador de guanilato ciclase soluble, cuyos ejemplos incluyen ataciguat, riociguat, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antidepresivo tricíclico (TCA), cuyos ejemplos incluyen amitriptilina, amitriptilinoxido, butriptilina, clomipramina, demexiptilina, desipramina, dibencepina, dimetacrina,
10 dosulepina, doxepina, imipramina, imipraminoxido, lofepramina, melitraceno, metapramina, nitroxazepina, nortriptilina, noxiptilina, pipofezina, propizepina, protriptilina, quinupramina, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **1** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de la vasopresina, cuyos ejemplos incluyen conivaptán y
15 tolvaptán.

Los agentes terapéuticos secundarios combinados también pueden ser útiles en terapia combinada con el compuesto de la invención. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede combinarse con un diurético y un ARB, o un bloqueador de los canales de calcio y un ARB, o un diurético y un inhibidor de la ACE, o un bloqueador de los canales
20 de calcio y una estatina. Los ejemplos específicos incluyen una combinación del inhibidor de ACE enalapril (en la forma de sal maleato) y el diurético hidroclorotiazida, que se vende bajo la marca Vaseretic®, o una combinación del bloqueador de los canales de calcio amlodipina (en la forma de sal besilato) y el ARB olmesartán (en la forma de prodroga medoxomilo), o una combinación de un bloqueador de los canales de calcio y una estatina,
25 todos ellos también se pueden usar con el Compuesto **1**. Otros agentes terapéuticos tales como agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos y antagonistas de los receptores de la vasopresina también pueden ser útiles en la terapia combinada. Los agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos de ejemplo incluyen clonidina, dexmedetomidina y guanfacina.

Las siguientes formulaciones ilustran las composiciones farmacéuticas representativas de la invención.

Cápsulas de gelatina dura de ejemplo para administración oral

Se combinan completamente el compuesto de la invención (50 g), 440 g de lactosa
5 secada por aspersión y 10 g de estearato de magnesio. La composición resultante se carga
luego en cápsulas de gelatina dura (500 mg de composición por cápsula). En forma
alternativa, el Compuesto **1** (20 mg) se combina completamente con almidón (89 mg),
celulosa microcristalina (89 mg) y estearato de magnesio (2 mg). La mezcla es luego filtrada
a través de un tamiz U.S. malla No. 45 y cargada en una cápsula de gelatina dura (200 mg
10 de composición por cápsula).

En forma alternativa, se combinan completamente el Compuesto **1** (30 g), un agente
secundario (20 g), 440 g de lactosa secada por aspersión y 10 g de estearato de magnesio, y
se procesan tal como se describió con anterioridad.

Formulación de cápsula de gelatina de ejemplo para administración oral

15 El Compuesto **1** (100 mg) es completamente combinado con monooleato de
polioxietilén sorbitán (50 mg) y almidón en polvo (250 mg). La mezcla se carga luego en
una cápsula de gelatina (400 mg de composición por cápsula). En forma alternativa, el
Compuesto **1** (70 mg) y un agente secundario (30 mg) se combinan completamente con
monooleato de polioxietilén sorbitán (50 mg) y almidón en polvo (250 mg), y la mezcla
20 resultante se carga en una cápsula de gelatina (400 mg de composición por cápsula).

En forma alternativa, el Compuesto **1** (40 mg) es completamente combinado con
celulosa microcristalina (Avicel PH 103; 259,2 mg) y estearato de magnesio (0,8 mg). La
mezcla se carga luego en una cápsula de gelatina (Tamaño #1, Blanca, Opaca) (300 mg de
composición por cápsula).

25 *Cápsula de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) de ejemplo para administración oral*

El Compuesto **1** (50 mg o 100 mg) se carga directamente en una cápsula de HPMC.

Formulación de comprimido de ejemplo para administración oral

El Compuesto **1** (10 mg), almidón (45 mg) y celulosa microcristalina (35 mg) se

filtran en un tamiz U.S. malla No. 20 y se mezclan completamente. Los gránulos producidos de esta manera se secan a una temperatura que oscila entre 50 y 60 °C y se filtran en un tamiz U.S. malla No. 16. Se mezcla una solución de polivinilpirrolidona (4 mg como una solución al 10% en agua estéril) con carboximetil almidón sódico (4,5 mg), estearato de magnesio (0,5 mg), y talco (1 mg), y esta mezcla luego se filtra en un tamiz U.S. malla No. 16. Luego el carboximetil almidón sódico, estearato de magnesio y talco se agregan a los gránulos. Después de mezclar, la mezcla es comprimida en una máquina para formar comprimidos para obtener un comprimido que pesa 100 mg.

En forma alternativa, el Compuesto **1** (250 mg) es completamente combinado con celulosa microcristalina (400 mg), dióxido de silicio pirogénico (10 mg), y ácido esteárico (5 mg). La mezcla luego se comprime para formar comprimidos (665 mg de composición por comprimido).

En forma alternativa, el Compuesto **1** (400 mg) es completamente combinado con almidón de maíz (50 mg), croscarmelosa sódica (25 mg), lactosa (120 mg), y estearato de magnesio (5 mg). La mezcla luego se comprime para formar un comprimido de ranura única (600 mg de composición por comprimido).

En forma alternativa, el Compuesto **1** (100 mg) es completamente combinado con almidón de maíz (100 mg) con una solución acuosa de gelatina (20 mg). La mezcla se seca y se tritura en un polvo fino. Luego se mezclan celulosa microcristalina (50 mg) y estearato de magnesio (5 mg) con la formulación de gelatina, se granulan, y la mezcla resultante se comprime para formar comprimidos (100 mg del compuesto de la invención por comprimido).

Formulación de suspensión de ejemplo para administración oral

Se mezclan los siguientes ingredientes para formar una suspensión que contiene 100 mg del Compuesto **1** por 10 mL de suspensión:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto 1	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	2,0 g
Metil parabeno	0,15 g
Propil parabeno	0,05 g
Azúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (solución al 70%)	12,85 g
Veegum® K (silicato de magnesio y aluminio)	1,0 g
Saborizante	0,035 mL
Colorantes	0,5 mg
Agua destilada	c.s. hasta 100 mL

Formulación líquida de ejemplo para administración oral

Una formulación líquida adecuada es aquella con un tampón (*buffer*) a base de ácido carboxílico tal como soluciones tampones de citrato, lactato y maleato. Por ejemplo, el Compuesto **1** (que puede ser pre-mezclado con DMSO) se combina con un tampón de citrato de amonio de 100 mM y el pH se ajusta a pH 5, o se combina con una solución de ácido cítrico de 100 mM y el pH se ajusta a pH 2. Dichas soluciones también pueden incluir un excipiente de solubilización tal como una ciclodextrina, por ejemplo, la solución puede incluir 10% en peso de hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Otras formulaciones adecuadas incluyen una solución de NaHCO₃ al 5%, con o sin ciclodextrina.

Formulación parenteral iv de ejemplo para administración por inyección

El Compuesto **1** (0,2 g) se combina con solución tampón de acetato de sodio 0,4 M (2,0 mL). El pH de la solución resultante es ajustado a pH 4 usando ácido clorhídrico acuoso 0,5 N o hidróxido de sodio acuoso 0,5 N, según sea necesario, y luego se agrega suficiente agua para inyección a fin de brindar un volumen total de 20 mL. La mezcla luego se filtra a través de un filtro estéril (0,22 micrones) para obtener una solución estéril adecuada para administración por inyección.

Las siguientes formulaciones ilustran las composiciones farmacéuticas

representativas de la presente invención.

Formulación de Ejemplo A

Una solución congelada adecuada para preparar una solución inyectable se prepara de la siguiente manera:

5	<table><tr><th>Ingredientes</th><th>Cantidad</th></tr><tr><td>Compuesto activo 1 o 1'</td><td>10 a 1000 mg</td></tr><tr><td>Excipientes (por ej., dextrosa)</td><td>0 a 50 g</td></tr><tr><td>Agua para solución de inyección</td><td>10 a 100 mL</td></tr></table>	Ingredientes	Cantidad	Compuesto activo 1 o 1'	10 a 1000 mg	Excipientes (por ej., dextrosa)	0 a 50 g	Agua para solución de inyección	10 a 100 mL
Ingredientes	Cantidad								
Compuesto activo 1 o 1'	10 a 1000 mg								
Excipientes (por ej., dextrosa)	0 a 50 g								
Agua para solución de inyección	10 a 100 mL								

- 10 Procedimiento representativo: Los excipientes (de haberlos) se disuelven en aproximadamente 80% del agua para inyección, y se agrega y disuelve el Compuesto activo **1** o **1'**.

- El pH se ajusta con hidróxido de sodio con 1 M a un valor de 3 a 4,5, y el volumen se ajusta luego al 95% del volumen final con agua para inyección. El pH es verificado y
15 ajustado, de ser necesario, y el volumen es ajustado al volumen final con agua para inyección. La formulación es luego filtrada estéril a través de un filtro de 0,22 micrones y colocada en un vial estéril bajo condiciones asépticas. El vial se tapa, se rotula y se almacena congelado.

Formulación de Ejemplo B

- 20 Un polvo liofilizado o sólido cristalino adecuado para preparar una solución inyectable se prepara de la siguiente manera:

25	<table><tr><th>Ingredientes</th><th>Cantidad</th></tr><tr><td>Compuesto activo 1 o 1'</td><td>10 a 1000 mg</td></tr><tr><td>Excipientes (por ej., manitol y/o sacarosa)</td><td>0 a 50 g</td></tr><tr><td>Agente tampón (por ej., citrato)</td><td>0 a 500 mg</td></tr><tr><td>Agua para inyección</td><td>10 a 100 mL</td></tr></table>	Ingredientes	Cantidad	Compuesto activo 1 o 1'	10 a 1000 mg	Excipientes (por ej., manitol y/o sacarosa)	0 a 50 g	Agente tampón (por ej., citrato)	0 a 500 mg	Agua para inyección	10 a 100 mL
Ingredientes	Cantidad										
Compuesto activo 1 o 1'	10 a 1000 mg										
Excipientes (por ej., manitol y/o sacarosa)	0 a 50 g										
Agente tampón (por ej., citrato)	0 a 500 mg										
Agua para inyección	10 a 100 mL										

Procedimiento representativo: Los excipientes y/o agentes tampones (de haberlos) se

disuelven en aproximadamente 60% del agua para inyección. El Compuesto activo **1** o **1'** es agregado y disuelto, y el pH se ajusta con hidróxido de sodio 1 M a un valor de 3 a 4,5, y el volumen se ajusta al 95% del volumen final con agua para inyección. El pH es verificado y ajustado, de ser necesario, y el volumen es ajustado al volumen final con agua para inyección. La formulación es luego filtrada estéril a través de un filtro de 0,22 micrones y colocada en un vial estéril bajo condiciones asépticas. La formulación luego se seca por congelación usando un ciclo de liofilización apropiado. El vial se tapa, (opcionalmente bajo vacío parcial o nitrógeno seco), se rotula y se almacena bajo refrigeración.

Formulación de Ejemplo C

Una solución inyectable para administración intravenosa a un paciente se preparara partir de la Formulación de Ejemplo B anterior, de la siguiente manera:

Procedimiento representativo: El polvo liofilizado de la Formulación de Ejemplo B (por ej., que contiene de 10 a 1000 mg del Compuesto activo **1** o **1'**) es reconstituido con 20 mL de agua estéril y la solución resultante se diluye adicionalmente con 80 mL de solución salina estéril en una bolsa de infusión de 100 mL. La solución diluida se administra luego al paciente por vía intravenosa en un período de 30 a 120 minutos.

Composiciones de ejemplo para administración por inhalación

El Compuesto **1** (0,2 mg) es micronizado y luego combinado con lactosa (25 mg). Esta mezcla combinada es luego cargada en un cartucho de inhalación de gelatina. Los contenidos del cartucho son administrados usando un inhalador de polvo seco, por ejemplo.

En forma alternativa, el Compuesto **1** micronizado (10 g) se dispersa en una solución preparada al disolver lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 mL). La suspensión resultante se seca por aspersión y luego se microniza para formar una composición micronizada que comprende partículas que tienen un diámetro medio inferior a aproximadamente 1,5 μm . La composición micronizada luego se carga en cartuchos de inhalador de dosis medida que contienen 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado en una cantidad suficiente para brindar aproximadamente 10 μg a aproximadamente 500 μg del

compuesto de la invención por dosis cuando se administra mediante el inhalador.

En forma alternativa, el Compuesto **1** (25 mg) se disuelve en solución salina isotónica (125 mL) tamponada con citrato (pH 5). La mezcla es agitada y sometida a sonicación hasta que el compuesto se disuelve. El pH de la solución es verificado y ajustado, de ser necesario,
5 a pH 5 al agregar lentamente NaOH acuoso 1 N. La solución se administra usando un dispositivo nebulizador que provee entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del Compuesto **1** por dosis.

EJEMPLOS

10 Las siguientes Preparaciones y Ejemplos se proveen para ilustrar formas de realización específicas de la invención. Estas formas de realización específicas, no obstante, no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera, a menos que se indique específicamente.

Las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados, a menos que se indique
15 lo contrario, y cualesquiera otras abreviaturas usadas en la presente y no definidas tienen su significado estándar, generalmente aceptado, a saber:

	AcOH	ácido acético
	BOC	<i>t</i> -butoxicarbonilo (-C(O)OC(CH ₃) ₃)
	(BOC) ₂ O	di- <i>t</i> -butil dicarbonato
20	Bn	bencilo
	CPME	ciclopentil metil éter
	DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
	DCM	diclorometano o cloruro de metileno
	DIPE	diisopropil éter
25	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMAP	4-dimetilaminopiridina
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
	Et ₃ N	triethylamina

	EtOH	etanol
	Et ₂ O	dietil éter
	EtOAc	acetato de etilo
	MeCN	acetonitrilo
5	NaHMDS	bis(trimetilsilil)amida de sodio
	Pd(PPh ₃) ₄	tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0)
	PE	éter de petróleo
	SilicaCat [®] DPP-Pd	catalizador de difenilfosfina paladio (II) basado en sílice
	TFA	ácido trifluoroacético
10	THF	tetrahidrofurano

A menos que se advierta lo contrario, todos los materiales, tales como reactivos, materiales de inicio y solventes, se adquirieron a través de proveedores comerciales (tales como Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haën, y similares) y se usaron sin purificación adicional.

15 Las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno, a menos que se establezca lo contrario. El progreso de las reacciones fue supervisado mediante cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés *Thin Layer Chromatography*), cromatografía líquida de alto rendimiento analítica (HPLC anal.), y espectrometría de masas, cuyos detalles se brindan en los ejemplos específicos. En general, los solventes usados en la

20 HPLC analítica fueron los siguientes: el solvente A era 98% de H₂O/2% de MeCN /1,0 mL/L de TFA; el solvente B era 90% de MeCN/10% de H₂O/1,0 mL/L de TFA.

Las reacciones tuvieron lugar tal como se describe específicamente en cada preparación; por ejemplo, comúnmente, las mezclas de reacción se purificaron mediante extracción y otros métodos de purificación tales como cristalización dependiente de

25 temperatura y dependiente de solvente, y precipitación. Asimismo, las mezclas de reacción fueron purificadas en forma rutinaria mediante HPLC preparativa, típicamente usando empaques de columna Microsorb C18 y Microsorb BDS y eluyentes convencionales. El progreso de las reacciones se midió típicamente mediante cromatografía líquida y

espectrometría de masas (LCMS). La caracterización de los isómeros se realizó mediante espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (NOE, por sus siglas en inglés *Nuclear Overhauser Effect*). La caracterización de los productos de reacción se llevó a cabo en forma rutinaria mediante espectroscopía de masas y ^1H -RMN. Para la medición de RMN, las muestras se disolvieron en solvente deuterado (CD_3OD , CDCl_3 , o $\text{DMSO}-d_6$), y los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron con un instrumento Varian Gemini 2000 (400 MHz) bajo condiciones de observación estándar. La identificación por espectrometría de masas de los compuestos se realizó típicamente usando un método de ionización por electrospray (ESMS, por sus siglas en inglés *Electrospray Ionization Method*) con un instrumento modelo API 150 EX de Applied Biosystems (Foster City, CA) o un instrumento LC/MSD modelo 1200 de Agilent (Palo Alto, CA).

Técnicas de medición

Difracción de rayos X en polvo

El análisis de difracción de rayos X en polvo se realizó usando un difractómetro de rayos X Bruker D8-Advance. La fuente de rayos X era radiación Cu-K α con tensión de salida de 40 kV y corriente de 40 mA. El instrumento fue operado en geometría de Bragg-Brentano y se usaron espejos Goebel para obtener el haz de rayos X paralelos. Cualquier divergencia en el haz fue limitada por una rejilla de divergencia vertical de $0,2^\circ$ en la fuente y rejillas Soller ($2,5^\circ$) en la fuente y el detector. Para la medición, una pequeña cantidad de polvo (5-25 mg) fue suavemente presionada sobre un portamuestras de silicio monocristalino para formar una superficie uniforme y se sometió a exposición a rayos X. Las muestras se barrieron en modo acoplado θ - 2θ de 2° a 35° en 2θ con un tamaño de paso de $0,02^\circ$ y una velocidad de barrido de 0,3 segundos por paso. La adquisición de datos fue controlada mediante el programa informático Bruker DiffraSuite y analizada mediante el programa informático Jade (Versión 7.5.1). El instrumento fue calibrado con un estándar de corundo, dentro de $\pm 0,02^\circ$ ángulo 2θ .

Debe tenerse en cuenta que la geometría de Bragg-Brentano usada para la reunión de

los datos es proclive a una orientación preferida. Bajo estas condiciones, es posible que las intensidades relativas de los picos de difracción puedan no representar las intensidades relativas reales que se obtendrían de una distribución idealizada de partículas esféricas o de un patrón de difracción simulado a partir de los datos de cristales únicos. También es posible
5 que algunos picos no se vean en algunos patrones de difracción debido a la orientación preferida extensiva.

Calorimetria diferencial de barrido

Las mediciones de DSC se llevaron a cabo usando un módulo Modelo Q-100 de TA Instruments con controlador de análisis térmico. Los datos se recabaron y analizaron usando
10 el programa informático Universal Analysis de TA Instruments. Se pesó con precisión una muestra en una cápsula de aluminio con tapa. Después de un período de equilibrado de la isoterma de 5 minutos a 5 °C, la muestra se calentó usando una rampa de calentamiento lineal de 10°C/min desde 0 °C hasta 275 °C.

Análisis termogravimétrico

15 El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó usando un módulo Modelo Q-500 de TA Instruments equipado con alta capacidad de resolución. Los datos se recabaron usando controlador Thermal Analyst de TA Instruments y se analizaron usando el programa informático Universal Analysis de TA Instruments. Se colocó una muestra pesada con exactitud sobre una cápsula de platino y se barrió (*escaneó*) con una velocidad de
20 calentamiento de 10 °C de temperatura ambiente a 200 °C. Las cámaras de balanza y horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante el uso.

Microscopía de luz polarizada

Para los estudios de microscopía de luz polarizada (PLM, *Polarized Light Microscopy*), las muestras fueron examinadas bajo un microscopio óptico (Olympus BX51)
25 con filtro de luz de polarización cruzada. Las imágenes se captaron con una cámara PaxCam controlada por el programa informático PaxIt Imaging (versión 6.4). Las muestras se prepararon en portaobjetos de vidrio con aceite mineral liviano como medio de inmersión. Dependiendo del tamaño de las partículas, se usó un lente objetivo de 4x, 10x o 20x para la

magnificación.

Evaluación de sorción dinámica de humedad

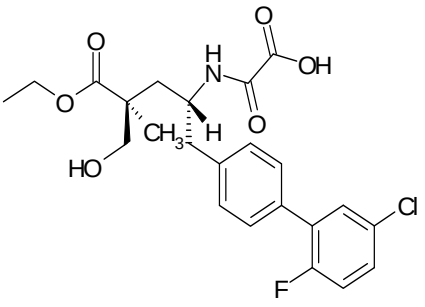
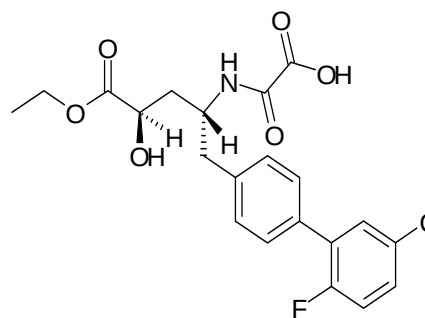
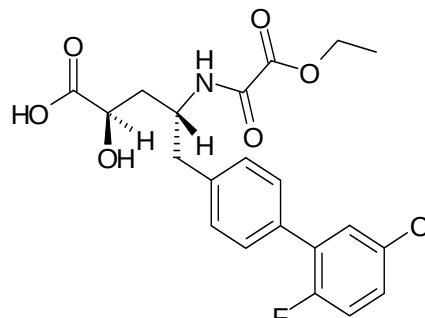
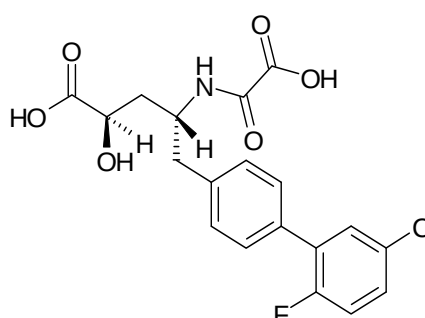
Las mediciones de DMS se realizaron usando una microbalanza atmosférica VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra pesada, y la humedad se encontraba al menor valor posible (cerca del 0% de humedad relativa) al inicio del análisis. El análisis de DMS consistió en una tasa de barrido del 5% de humedad relativa/paso en el rango de humedad total del 5-90%. La corrida de la DMS se realizó isotérmicamente a 25 °C.

10

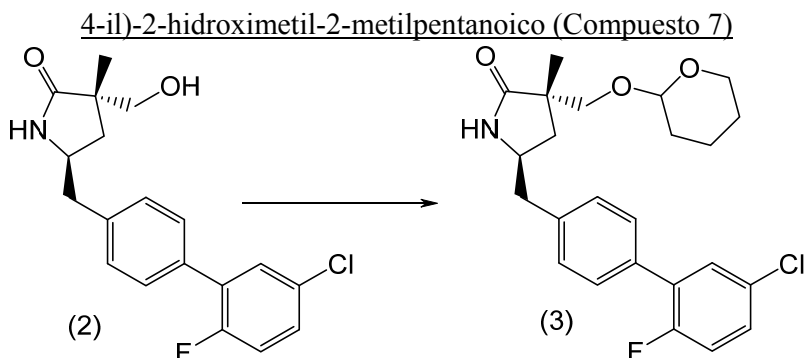
Procedimientos sintéticos y ejemplos comparativos

Los siguientes compuestos fueron sintetizados y evaluados en cuanto a su actividad de inhibición de la enzima NEP:

Nombre del compuesto	Designación general	Preparación/ Ejemplo	Estructura
Compuesto 1	Compuesto	Preparación 1/ Ejemplo 1	
Compuesto de comparación C2	Metabolito activo	Preparación 2/ Ejemplo 2	

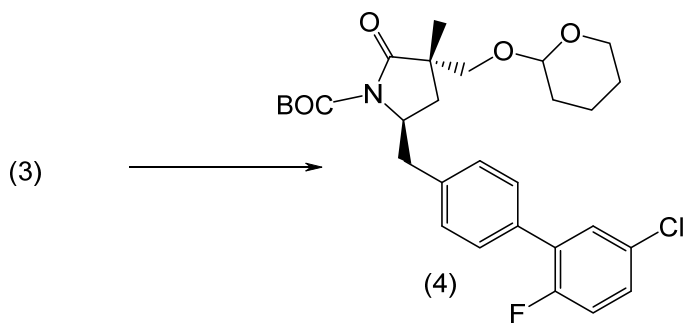
Nombre del compuesto	Designación general	Preparación/ Ejemplo	Estructura
Compuesto de comparación C3	Compuesto o Prodroga	Preparaciones 3 y 4/ Ejemplo 3	
Compuesto de comparación C4	Compuesto o Prodroga	Preparaciones 5, 6, 7, y 8/ Ejemplo 4	
Compuesto de comparación C5	Compuesto o Prodroga	Preparación 9/ Ejemplo 5	
Compuesto de comparación C6	Metabolito activo	Ejemplo 6	

Preparación 1: éster bencílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (Compuesto 7)

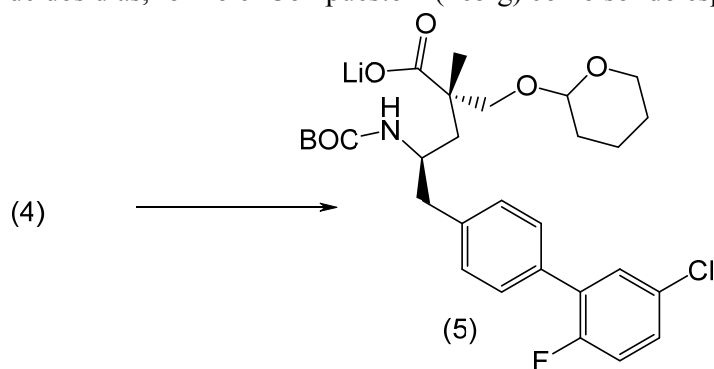


Se combinó (3*S*,5*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-bifenil-4-ilmetil)-3-hidroximetil-3-metil-pirrolidin-2-ona (2) (201,0 g, 578 mmol) con DCM (4020 mL) para obtener una solución homogénea de color marrón claro, que luego se enfrió a 0 °C con agitación; se agregaron 3,4-dihidro-2H-pirano (118 mL, 1,3 mol) y ácido 4-metilbencenosulfónico (34,8 g, 202 mmol); y la mezcla se calentó a 18,5 °C en 2 horas; luego se agitó a 18,5 °C toda la noche

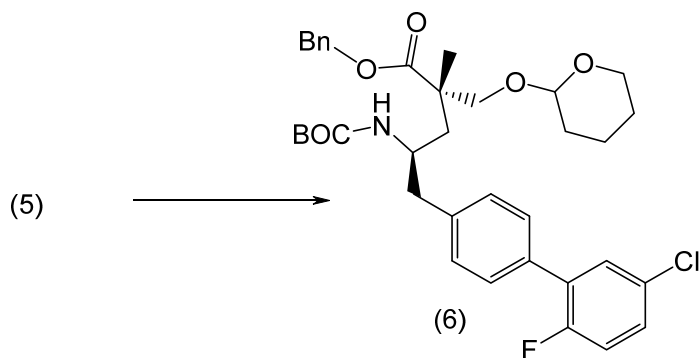
(>98% de conversión). La reacción se templó con NaHCO₃ acuoso saturado, y se permitió que las fases se separaran. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄, luego se filtró, seguido de la extracción del solvente para obtener un producto marrón oscuro espeso en crudo (~300 g), que se disolvió en DIPE (2 L) y se agitó a 5 °C toda la noche para obtener una suspensión blanca. La suspensión se filtró, y los sólidos se secaron en el transcurso de 2 días para obtener el Compuesto 3 (113,8 g). El producto filtrado se secó, formando un aceite espeso, que se disolvió en DIPE (~100 mL) y se agitó toda la noche a 5 °C para aislar el Compuesto adicional 3 (rendimiento total 225 g).



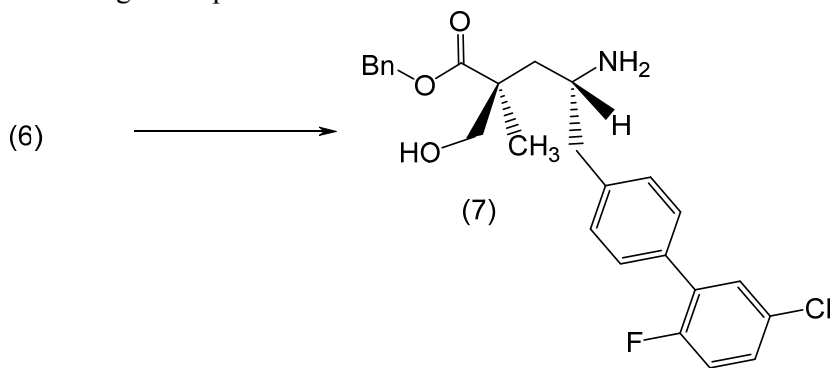
El Compuesto 3 (208 g, 482 mmol) se disolvió en THF (1912 mL, 23 mol) con agitación para obtener una solución homogénea transparente. La mezcla se purgó con nitrógeno y luego se enfrió a -10 °C. Se agregó NaHMDS 1M en THF (539 mL, 539 mmol) a gotas, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se agregó a gotas dicarbonato de di-*t*-butilo (131 g, 602 mmol) disuelto en THF (393 mL, 4,8 mol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se templó con NH₄Cl acuoso saturado (5,0 L) y se agregó EtOAc (3,1 L). Las fases se separaron, y la capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado (5,0 L). Las fases se separaron, y la capa orgánica se secó en presencia de MgSO₄. La eliminación del solvente formó un aceite espeso que, al secarse adicionalmente en el transcurso de dos días, formó el Compuesto 4 (265 g) como sólido espumoso.



El Compuesto 4 (265 g, 498 mmol) se disolvió en THF (1,7 L) para obtener una solución homogénea de color marrón claro-transparente. Se agregó LiOH 1,0M en agua (1,5 L, 1,5 mol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en 4 horas. La reacción se completó después de 6 horas pero la mezcla continuó agitándose a 15 °C toda la noche. Se agregó EtOAc (1,7 L), y la mezcla se lavó con NH₄Cl acuoso saturado (1,7 L) y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado, se separó, se secó en presencia de Na₂SO₄, luego se filtró y se secó para obtener el Compuesto 5 (300 g) como sólido blancuzco a amarillo, espumoso (el excedente se debe al EtOAc residual).



El Compuesto 5 (277,0 g, 498 mmol) se disolvió en DMF (970 mL) para obtener una solución incolora. Se agregó K_2CO_3 (103 g, 747 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. Se agregó bromuro de bencilo (71,1 mL, 598 mmol) en una porción, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche; la conversión se completó después de 20 horas. Se agregó NH_4Cl (6 L) y EtOAc (1 L) y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado (6 L), y se secó en presencia de Na_2SO_4 , seguido de la extracción del solvente para obtener el Compuesto 6 en crudo (335 g), que se usó directamente en el siguiente paso.

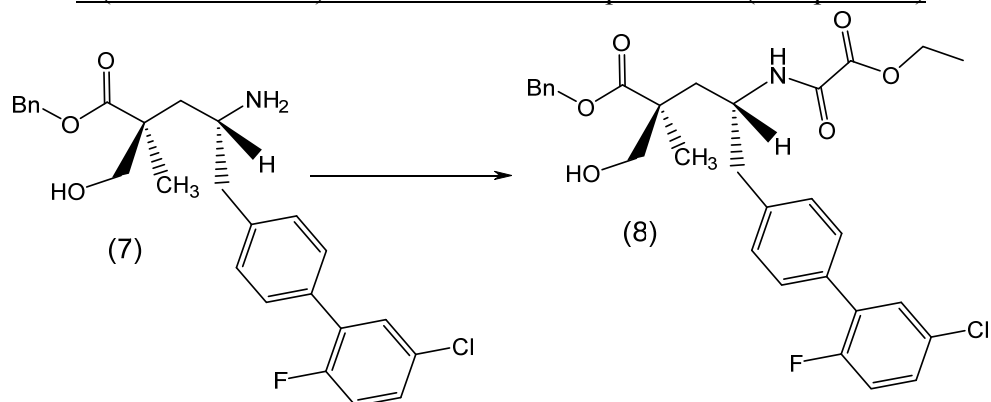


10

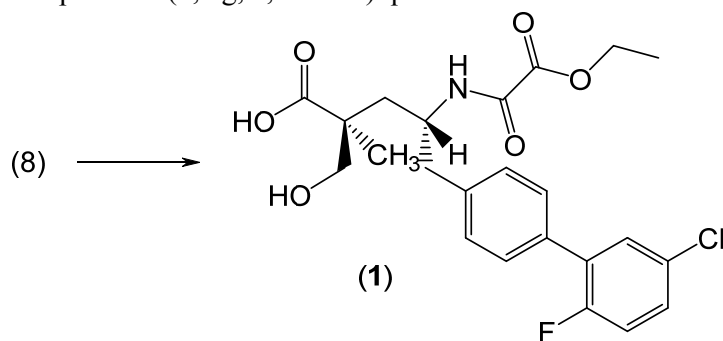
Se combinó HCl 3M (1,7 L, 5,0 mol) en CPME con el Compuesto 6 (319,0 g, 498 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante más de 24 horas, formando una suspensión (>99% de conversión). Se agregó CPME adicional (1,0 L) y la suspensión resultante se agitó durante 1 hora. La mezcla se filtró y la torta húmeda se enjuagó con CPME (500 mL). Luego de filtrar y secar, se obtuvo el Compuesto 7 (190 g) como torta blanca.

EJEMPLO 1: ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-

4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (Compuesto 1)



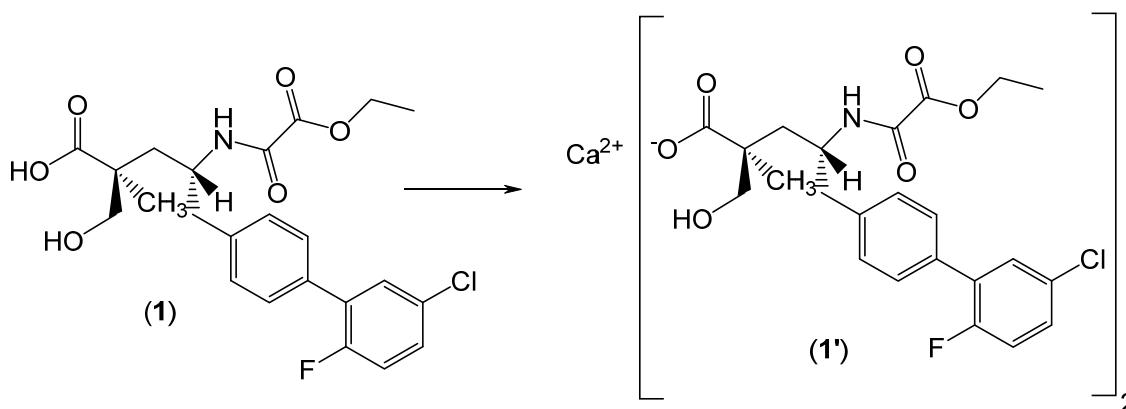
Se disolvió EtOH (576 μ L, 9,9 mmol) en DCM (3 mL). Se agregó cloruro de oxalilo (1,0 mL, 12,1 mmol), y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 30 minutos. El solvente se evaporó sin calor, formando una solución que se usó directamente en el siguiente paso. Se disolvió éster bencílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (7) (1,0 g, 2,2 mmol) en DCM (3 mL). Se agregó la solución obtenida previamente, seguido de DIPEA (958 μ L, 5,5 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, en cuyo momento 10 la LC/MS mostró la masa del producto deseado. El solvente se extrajo *in vacuo* y el residuo en crudo se purificó mediante cromatografía de fase normal (20-95% de EtOAc/hexanos) para obtener el Compuesto 8 (1,0 g, 1,9 mmol) que se usó directamente en el siguiente paso.



El Compuesto 8 (1,0 g, 1,9 mmol) se combinó con paladio al 10% en peso sobre 15 carbono (350 mg, 185 μ mol), AcOH (5 mL) y EtOAc (5 mL). La mezcla se colocó bajo hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, en cuyo momento la LC/MS mostró la finalización de la desprotección de bencilo. El paladio se filtró usando un filtro CR Acrodisc de PTFE de 0,2 μ m y el solvente se extrajo *in vacuo*. El residuo en crudo se purificó

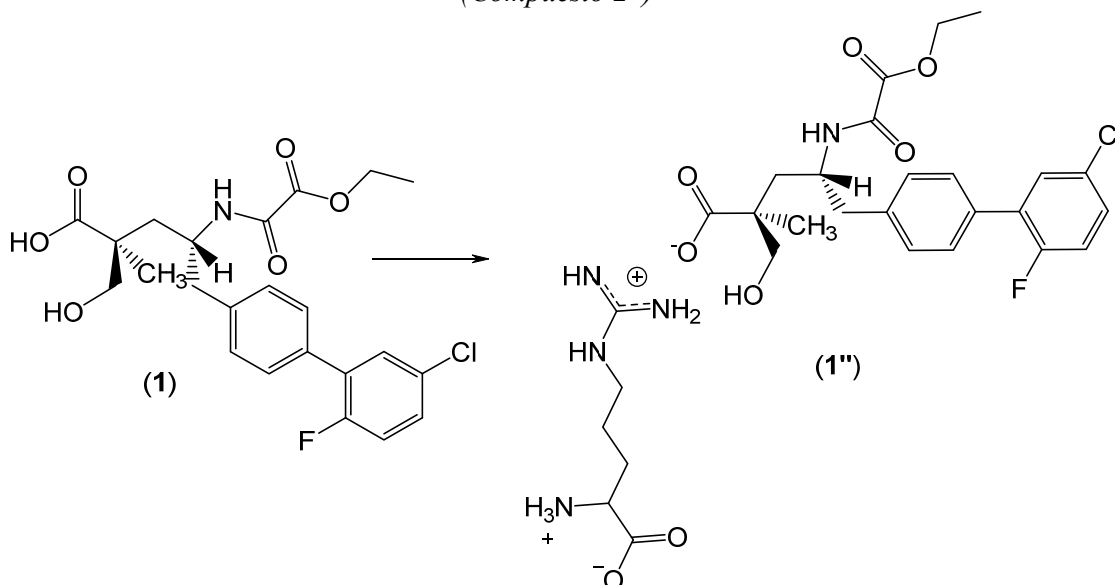
mediante cromatografía de fase reversa para obtener el Compuesto **1** (400 mg). MS m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{23}H_{25}ClFNO_6$, 466,14; encontrado 466.

(2*S*,4*R*)-5-(5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-
 4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio cristalino
 (Compuesto **1'**)



El Compuesto **1** (30 g, 64,4 mmol) se disolvió en EtOH 100% puro (100 mL), y
 10 posteriormente se agregó DIPEA (11,25 mL, 64,4 mmol) a esta mezcla a temperatura ambiente. Se disolvió trifluorometanosulfonato de calcio (10,89 g, 32,2 mmol) en EtOH (20 mL) y se agregó a gotas a la mezcla que contenía el Compuesto **1** para formar una suspensión espesa en el transcurso de aproximadamente 1 hora. La suspensión espesa se agitó entonces a temperatura ambiente durante dos días. La suspensión resultante se filtró lentamente y se
 15 secó en el transcurso de dos días para obtener 33 g del Compuesto **1'** > 99% puro. Un segundo proceso de re-suspensión se realizó primero al enfriar el Compuesto **1'** (33 g, 19,80 mmol) a 5 °C. Luego se agregó una mezcla fría de EtOH:agua (7:3) (300 mL) y la suspensión resultante se agitó vigorosamente durante 4 días. La suspensión luego se filtró lentamente y se secó durante 24 horas evitando la formación de grumos. La suspensión se secó luego al
 20 aire a temperatura ambiente durante 18 horas adicionales para obtener 29,5 g del sólido >99% puro del Compuesto **1'**. Este producto fue analizado por PXRD, DSC y TGA, tal como se describe en la presente, y los datos generados se presentan en las FIGS. 1-3.

*(2S,4R)-5-(5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-
4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de L-Arginina cristalino
(Compuesto 1'')*



5

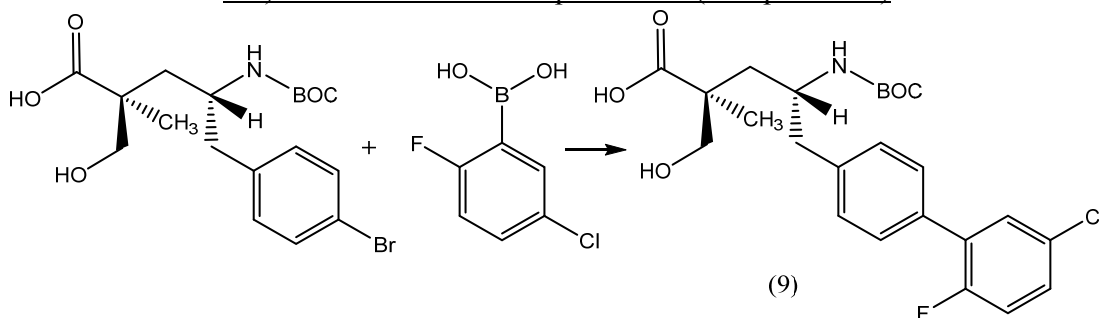
El Compuesto **1** (181,6 mg) se disolvió en EtOH puro (0,5 mL) en un vial de vidrio para obtener una solución transparente. La solución se enfrió a -20 °C durante aproximadamente 10 minutos. En un vial de vidrio separado, se disolvió L-arginina (68 mg) en 0,2 mL de agua, y la solución se enfrió a 5 °C durante aproximadamente 10 minutos. La

10 solución transparente que contenía el Compuesto **1** fue lentamente transferida a la solución de L-arginina. Se agregó un adicional de 0,2 mL de EtOH puro al vial que previamente contenía el Compuesto **1** y los contenidos fueron adicionalmente agregados al vial que contenía la solución de L-arginina. Las semillas de los cristales de L-arginina obtenidas de una reacción anterior usando un procedimiento similar al recientemente descrito se

15 agregaron a la solución combinada, y toda la mezcla se mantuvo a 5 °C con agitación suave para obtener una suspensión cristalina entre 1-2 días. Los cristales del Compuesto **1''** se filtraron y se analizaron mediante PXRD, DSC y TGA, tal como se describe en la presente, y los datos generados se presentan en las FIGS. 6-8.

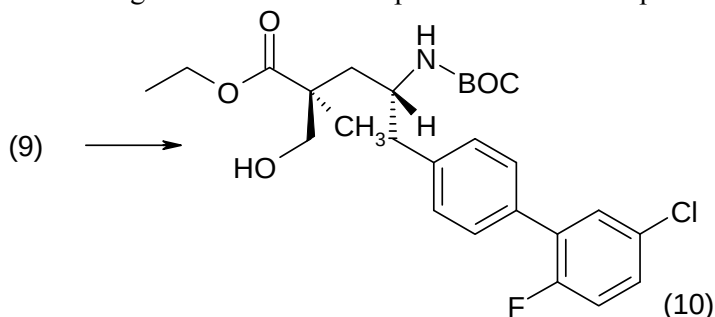
Preparación 2: Éster etílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-*t*-butoxicarbonilamino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-

4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (Compuesto 10)



5 Se combinó ácido (2*S*,4*R*)-5-(4-bromofenil)-4-*t*-butoxicarbonilamino-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (1,3 g, 3,1 mmol) con Na₂CO₃ (993 mg, 9,4 mmol), agua (0,2 mL) y dioxano (1,5 mL). El recipiente de reacción se tapó, se purgó y se colocó bajo nitrógeno. Rápidamente se agregó Pd(PPh₃)₄ (541 mg, 468 μmol) y el recipiente se purgó nuevamente. La mezcla se calentó durante 45 minutos a 90 °C, en cuyo momento la LCMS

10 mostró la finalización de la reacción. La capa orgánica se acidificó con 1N HCl/agua a pH ~4 y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se lavó con NaCl acuoso saturado y se secó en presencia de Mg₂SO₄. El solvente se extrajo *in vacuo* y el residuo en crudo se purificó mediante cromatografía de fase reversa para obtener el Compuesto 9.

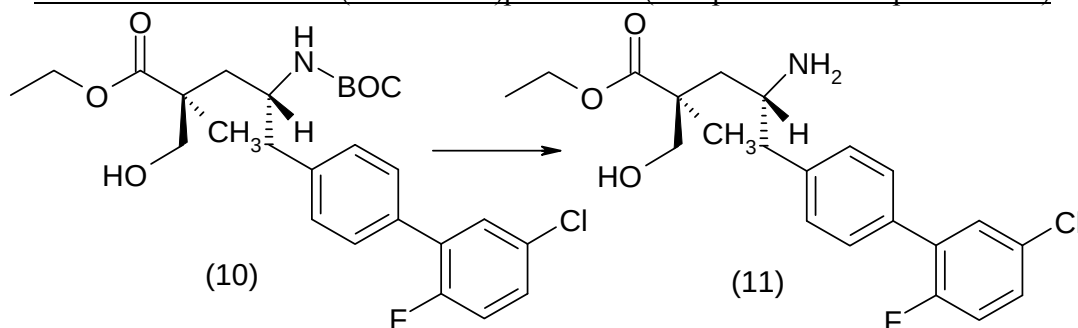


15 El Compuesto 9 (1,0 g, 2,1 mmol) se disolvió en EtOH (4 mL) y HCl 4N en dioxano (4 mL) y se agitó durante 3 horas a 60 °C. Los solventes se evaporaron, y el residuo en crudo se disolvió en DCM. Se agregó (BOC)₂O (472 μL, 2,031 mmol) y Et₃N (566 μL, 4,1 mmol) seguido de DMAP (5 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. El producto en crudo se evaporó y se trituró con DCM, y se filtró sin purificación adicional para obtener el

Compuesto 10 (800 mg).

EJEMPLO 2: Ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-

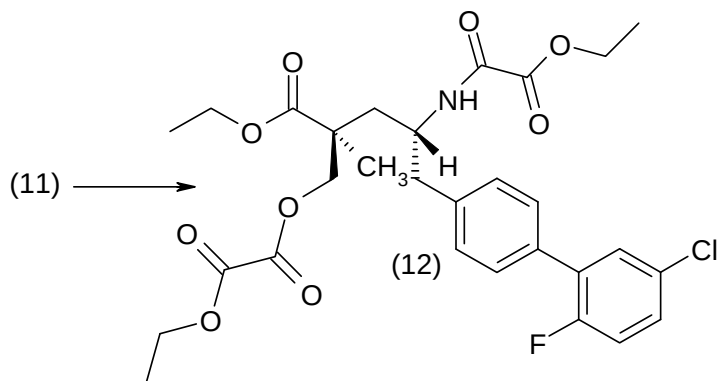
2-hidroximetil-2-metil-4-(oxalilamino)pentanoico (Compuesto de Comparación C2)



5

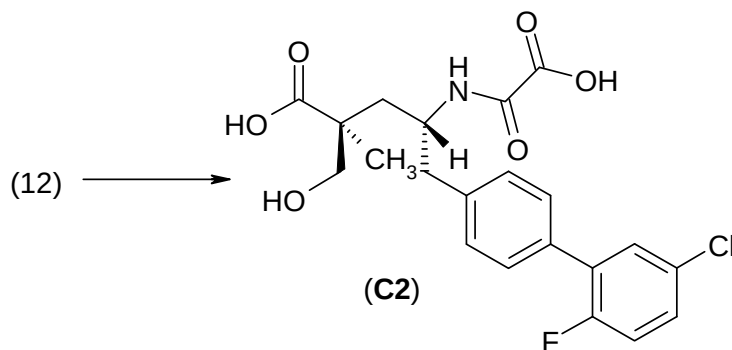
Se combinó éster etílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-*t*-butoxicarbonilamino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (10) (2,6 g, 5,3 mmol) con MeCN (5 mL) y HCl 4N en dioxano (4 mL) y se agitó durante 15 minutos. El solvente se extrajo mediante evaporación centrífuga para obtener el Compuesto 11, que se usó directamente en

10 el siguiente paso.



Al Compuesto 11 en crudo (2,1 g, 5,3 mmol) en DCM (10 mL) se agregó etil 2-cloro-2-oxoacetato (1,3 mL, 11,7 mmol), seguido de la adición lenta de Et₃N (2,6 mL, 18,7 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos y se verificó la finalización de la reacción.

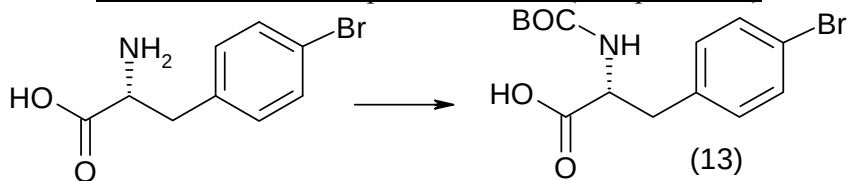
15 El producto en crudo se purificó mediante cromatografía *flash* (0-100% de EtOAc/hexanos) para obtener el Compuesto 12, que se usó directamente en el siguiente paso.



El Compuesto 12 (2,2 g, 3,7 mmol) se combinó con THF (5 mL) y NaOH (3,7 mL, 37,0 mmol), seguido de la adición de agua (10 mL). La mezcla resultante se agitó toda la noche. El solvente se evaporó, se agregó AcOH, y el producto se purificó mediante cromatografía de fase reversa para obtener el Compuesto de Comparación C2 (540 mg). MS m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{21}H_{21}ClFNO_6$, 438,10; encontrado 438,2.

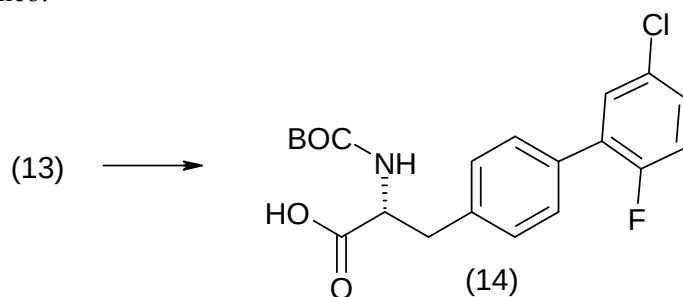
El Compuesto de Comparación C2 se describe en el ejemplo 11-2 de la Patente U.S. No. 8.691.868 a nombre de Hughes y colaboradores

10 Preparación 3: (3*S*,5*R*)-5-(5'-Cloro-2'-fluorobifenil-4-ilmetil)-
3-hidroximetil-3-metilpirrolidin-2-ona (Compuesto 21)

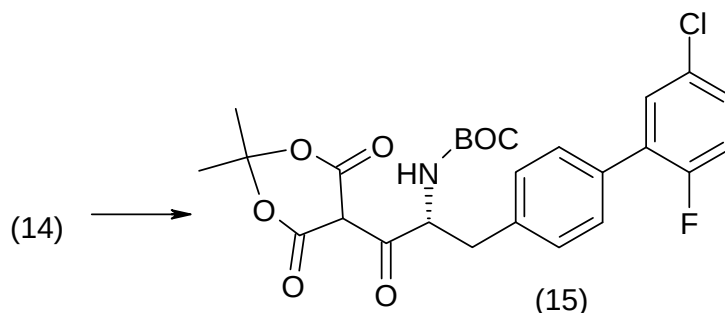


Una solución de ácido (*R*)-2-amino-3-(4-bromofenil)propiónico (3300 g, 13,5 mol, 1,0 eq.) en MeCN (46,2 L) se colocó en un matraz de reacción que había sido purgado y
 15 mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Una solución de NaOH (1081 g, 27,0 mol, 2,0 eq.) en agua (46,2 L) se agregó en varias tandas a -10 °C. A esto se agregó una solución de dicarbonato di-*t*-butilico (2948 g, 13,51 mol, 1,0 eq.) en MeCN (6,6 L). La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se concentró *in vacuo*. La solución resultante se diluyó con 45 L de agua/hielo. El pH de la solución se ajustó a 2 con
 20 HCl (1 mol/L). La solución resultante se extrajo con DCM (50 Lx3) y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla resultante se lavó con NaCl acuoso saturado (50 L), luego se secó

en presencia de MgSO_4 y se concentró *in vacuo* para obtener el Compuesto 13 (3720 g) como sólido blanco.

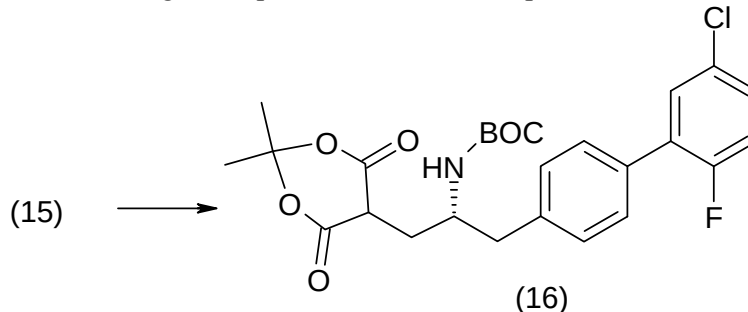


Una solución del Compuesto 13 (530 g, 1,54 mol, 1,0 eq.) en dioxano (9,54 L) se combinó con ácido (5-cloro-2-fluorofenil)borónico (348 g, 2,0 mol, 1,3 eq.), una solución de Na_2CO_3 (228 g, 2,2 mol, 1,4 eq.) en agua (1,1 L), y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (8,9 g, 7,7 mmol, 0,01 eq.) en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. La solución resultante se calentó a reflujo durante 2,5 horas en un baño de aceite, luego se enfrió a temperatura ambiente con un baño de agua/hielo. La solución resultante se diluyó con EtOAc (15 L), se lavó con HCl 1N (5 L) y NaCl acuoso saturado (5 Lx4). Los orgánicos combinados se secaron luego en presencia de MgSO_4 y se concentró *in vacuo*. El residuo se lavó luego con PE (1 Lx2) para obtener el Compuesto 14 (510 g) como aceite marrón.



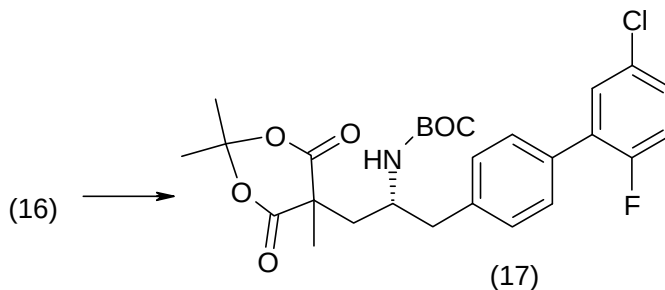
Una solución del Compuesto 14 (510 g, 1,3 mol, 1,0 eq.) en DCM (5 L) se combinó con 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (205 g, 1,4 mol, 1,1 eq.) y 4-dimetilaminopiridina (237 g, 1,9 mol, 1,5 eq.) en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Una solución de DCC (294 g, 1,4 mol, 1,1 eq.) en DCM (600 mL) se agregó a gotas con agitación a -10°C . La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Los sólidos se filtraron, y el producto filtrado se lavó con

HCl 1 N (2 L) y NaCl acuoso saturado (3 L). Los orgánicos combinados se secaron en presencia de MgSO₄. Los sólidos se filtraron para obtener el Compuesto 15 como el producto filtrado, que se usó en el siguiente paso directamente sin purificación adicional.



5 Una solución del Compuesto 15 en DCM (7 L, crudo) se combinó con AcOH (600 mL) en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Se agregó NaBH₄ (88,8 g, 2,4 mol, 1,8 eq.) en varias tandas a -5 °C. La solución resultante se agitó durante 3 horas a -5 °C. La reacción se templó luego mediante la adición a gotas de NaCl acuoso saturado (1 L). La solución resultante se diluyó con NaCl

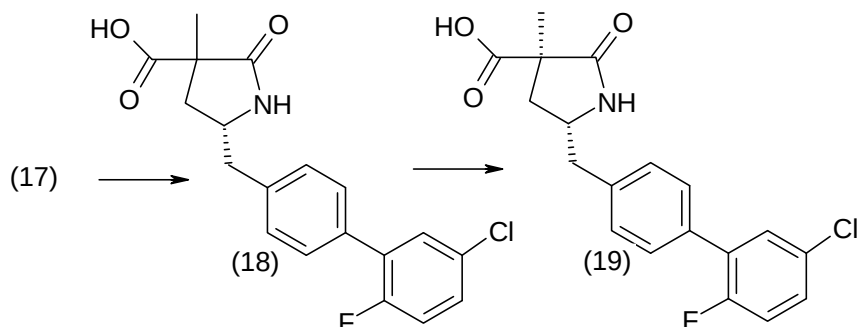
10 acuoso saturado (2 L) y la mezcla resultante se lavó con agua (2 Lx2), NaHCO₃ acuoso saturado (1 L), y NaCl acuoso saturado (2 L). Los orgánicos combinados se secaron en presencia de MgSO₄ y se concentraron *in vacuo* para obtener el Compuesto 16 (520 g) como aceite amarillo.



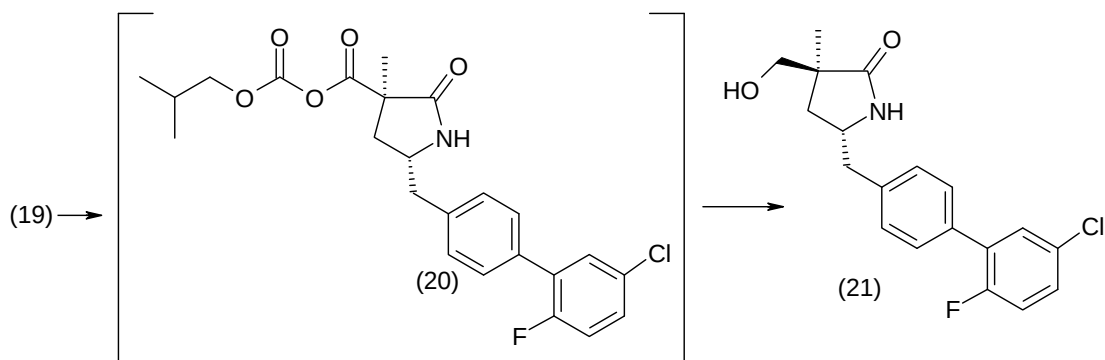
15 Una solución del Compuesto 16 (520 g, 1,0 mol, 1,0 eq.) en acetona/DMF(1:1) (5,2 L) se combinó con Na₂CO₃ (163 g, 1,5 mol, 1,5 eq.) y yoduro de metilo (219 g, 1,5 mol, 1,5 eq.) en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se diluyó con agua (15 L). Después de agitar durante 1 hora, los sólidos se recogieron mediante

20 filtración. El residuo se disolvió en DCM (5 L). Los orgánicos combinados se secaron en

presencia de MgSO_4 y se concentraron *in vacuo* para obtener el Compuesto 17 (520 g) como sólido amarillo.



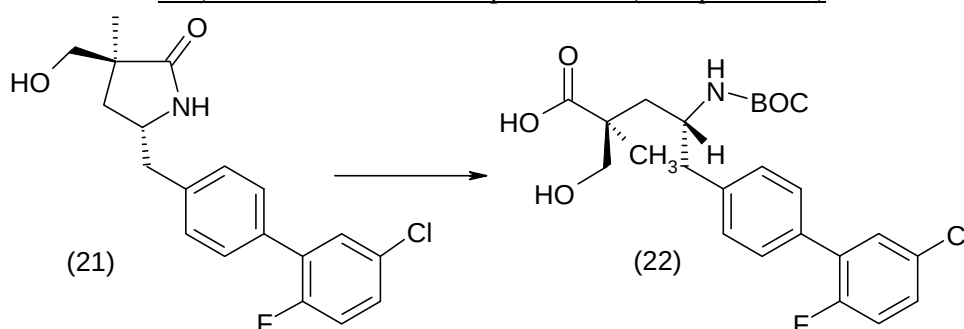
Una solución del Compuesto 17 (520 g, 1,0 mol, 1,0 eq.) en CPME (2,6 L) se colocó en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Una solución de HCl 4N en CPME (2,6 L) se agregó a -5°C . La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se concentró a la mitad del volumen *in vacuo* (formando el Compuesto 18). Los sólidos se recogieron mediante filtración, luego se lavaron con una mezcla 1:2 de EtOAc y DIPE para obtener el Compuesto 19 (220 g) como sólido blancuzco.



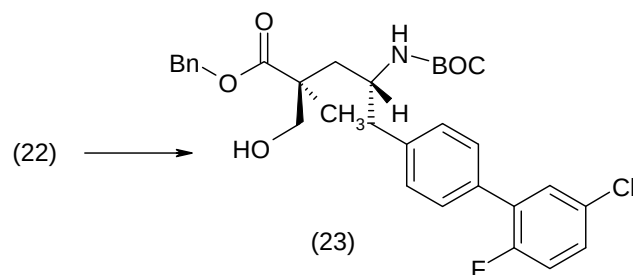
Una solución del Compuesto 19 (218 g, 602,5 mmol, 1,0 eq.) en THF (4 L) y *N*-metilmorfolina (170 g, 1,7 mol, 2,8 eq.) se colocó en un matraz de reacción que había sido purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Se agregó 2-metilpropil cloroformato (164,4 g, 1,2 mol, 2,0 eq.) a gotas con agitación a -5°C . La solución resultante se agitó durante 20 minutos a -5°C . Una solución de NaBH_4 (91,5 g, 2,4 mol, 4,0 eq.) en agua (400 mL) se agregó luego a gotas con agitación a -5°C . La solución resultante se agitó durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. La reacción se templó luego mediante la

adición a gotas de HCl 1N (2,6 L), y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y luego se concentró *in vacuo*. La mezcla residual se agitó luego durante otra hora, y luego los sólidos se recogieron mediante filtración. Los sólidos se lavaron con agua, se disolvieron en THF, se secaron en presencia de Na₂SO₄, y se concentraron *in vacuo* para obtener el Compuesto 21 (170 g) como sólido blanco.

Preparación 4: Éster bencílico del ácido (2*S*,4*R*)-4-*t*-butoxicarbonilamino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (Compuesto 23)

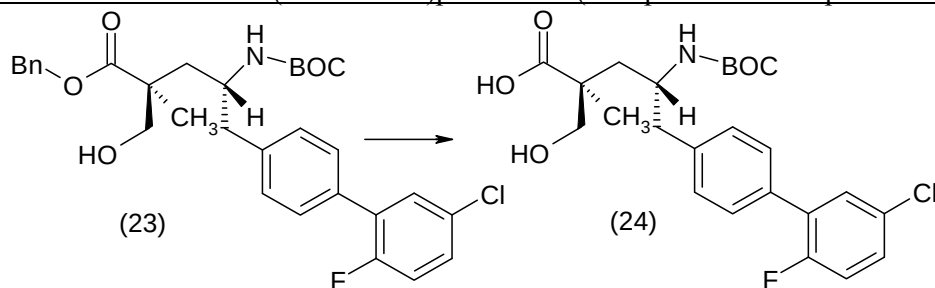


Se disolvió (3*S*,5*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-ilmetil)-3-hidroximetil-3-metilpirrolidin-2-ona (21) (5,0 g, 14,4 mmol) en THF (10 mL) y se colocó bajo nitrógeno. La solución se colocó en un baño de hielo. Se agregó NaHMDS (31,6 mL, 31,6 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 minutos desde 0 °C hasta temperatura ambiente. Luego se agregó (BOC)₂O (7,3 mL, 31,6 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, en cuyo momento la LC/MS mostró la finalización de la reacción. A esta solución en crudo se agregó una solución de NaOH 10N (21,6 mL, 216 mmol) en agua para alcanzar un pH~12. Se agregó THF adicional (~10 mL) y la solución se agitó toda la noche a temperatura ambiente, en cuyo momento la LC/MS mostró la finalización de la reacción. Se agregó EtOAc seguido de una solución de HCl 1N hasta alcanzar un pH 5. La capa orgánica se extrajo, se secó en presencia de MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo en crudo se purificó mediante cromatografía de fase normal (50-100% de EtOAc/hexanos) para obtener el Compuesto 22 (2,5 g).



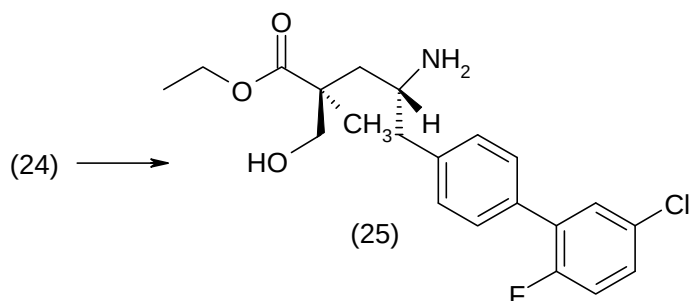
Se combinaron el Compuesto 22 (550 mg, 1,2 mmol), K_2CO_3 (179 mg, 1,3 mmol) y bromuro de bencilo (154 μ L, 1,3 mmol) en DMF (6 mL) y se agitó durante 3-4 horas a temperatura ambiente, en cuyo momento la LC/MS mostró la finalización de la reacción. El
 5 solvente se extrajo *in vacuo* y el residuo en crudo se purificó mediante cromatografía de fase normal para obtener el Compuesto 23 (453 mg).

EJEMPLO 3: Éster etílico del ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metil-4-(oxalilamino)pentanoico (Compuesto de Comparación C3)

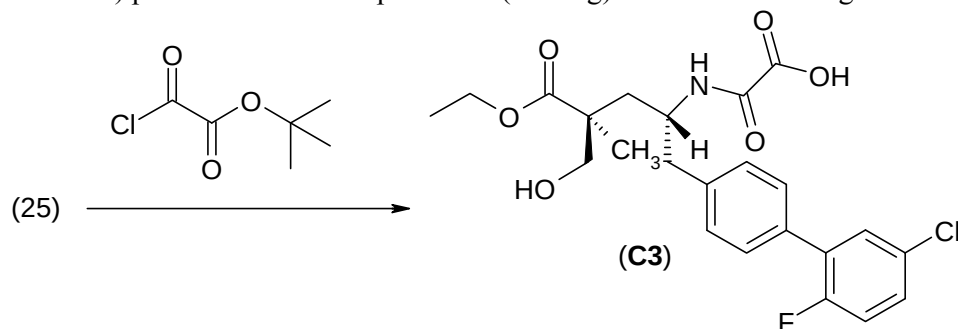


10

Se agregó AcOH (376 μ L, 6,6 mmol) a una solución del éster bencilico del ácido (2*S*,4*R*)-4-*t*-butoxicarbonilamino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico (23) (730 mg, 1,3 mmol) seguido de paladio (140 mg, 131 μ mol). La mezcla resultante se agitó bajo hidrógeno durante 3 horas, en cuyo momento la LCMS mostró la
 15 finalización de la reacción. La mezcla se filtró usando un filtro CR Acrodisc de PTFE de 0,2 μ m, y se concentró para obtener el Compuesto 24 (599 mg) como líquido viscoso incoloro transparente.



Se agregó HCl 4N en dioxano (4,8 mL, 19,3 mmol) a una solución del Compuesto 24 (599 mg, 1,3 mmol) en EtOH (5 mL). La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 3 horas, luego se concentró *in vacuo* para obtener un líquido incoloro transparente. El líquido en crudo se purificó mediante cromatografía de fase reversa (20-90% de MeCN en agua con 0,05% de TFA) para obtener el Compuesto 25 (455 mg) como sal HCL de goma blanca.



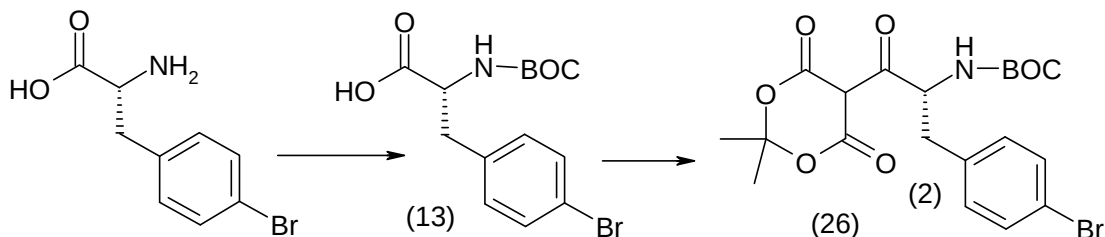
Se agregó *t*-butanol (574 μ L, 6,0 mmol) a una solución de cloruro de oxalilo (772 μ L, 9,0 mmol) en DCM (3 mL) a 0 °C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró luego *in vacuo* para obtener 2-cloro-2-oxoacetato de *t*-butilo (403 mg) como líquido incoloro transparente. El líquido se disolvió en DCM (2,5 mL) para preparar una solución 1,0 M en DCM.

Se agregó DIPEA (261 μ L, 1,5 mmol) a una solución del Compuesto 25 (236 mg, 599 μ mol) en DCM (3,0 mL) seguido de 2-cloro-2-oxoacetato de *t*-butilo (solución 1M en DCM; 659 μ L, 659 μ mol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se agregó TFA (3,0 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* para obtener un líquido amarillo pálido transparente. El líquido en crudo se purificó mediante cromatografía de fase reversa (20-90% de MeCN en agua con 0,05% de TFA) para obtener el Compuesto de Comparación C3

(174 mg) como sólido blanco. MS m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{23}H_{25}ClFNO_6$, 466,14; encontrado 466.

Preparación 5: Éster *t*-butilíco del ácido (*S*)-2-(4-bromobenzil)-5-oxopirrolidina-1-carboxílico (Compuesto 28)

5

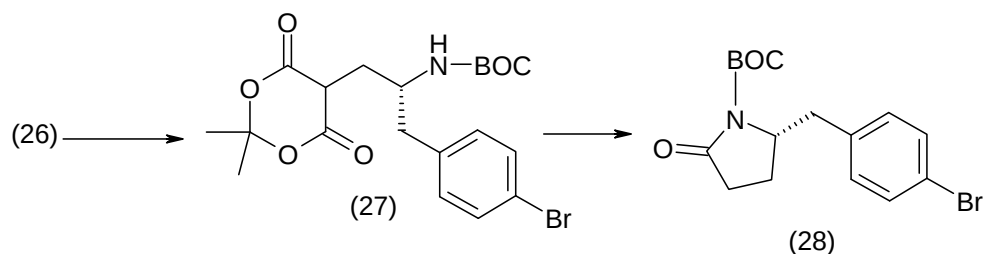


A una solución del ácido (*R*)-2-amino-3-(4-bromofenil)propiónico (50 g, 0,2 mol) en MeCN (700 mL) se agregó una solución de NaOH (16,4 g, 0,4 mol) en agua (700 mL) a -5 °C. Después de agitar durante 10 minutos, se agregó una solución de (BOC)₂O (44,7 g, 0,2 mol) en MeCN (100 mL). La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. Después de la evaporación del MeCN, el residuo se diluyó con DCM (800 mL) y se acidificó con HCl 1 M a pH 2 a -5 °C. El producto acuoso se extrajo con DCM (3x200 mL).

15 Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado (500 mL), se secaron en presencia de Na₂SO₄ y se concentraron para obtener el Compuesto 13 (66,5 g) como sólido blanco. LC-MS: 366 $[M+Na]$, 709 $[2M+Na]$.

A una solución del Compuesto 13 (66,5 g, 193 μmol), ácido de Meldrum (33,4 g, 232 mmol) y DMAP (37,7 g, 309 mmol) en DCM anhidro (600 mL), se agregó a gotas una solución de DCC (47,9 g, 232 mmol) en DCM anhidro (200 mL) en 1 hora a -5 °C bajo nitrógeno. La mezcla se agitó a -5 °C durante 8 horas, luego se refrigeró toda la noche. Se observaron cristales de dicitohexilurea. La mezcla se filtró, se lavó con 5% de KHSO₄ (5x200 mL) y NaCl acuoso saturado (200 mL), luego se secó en presencia de MgSO₄ anhidro bajo refrigeración toda la noche. La solución se evaporó luego para obtener el Compuesto

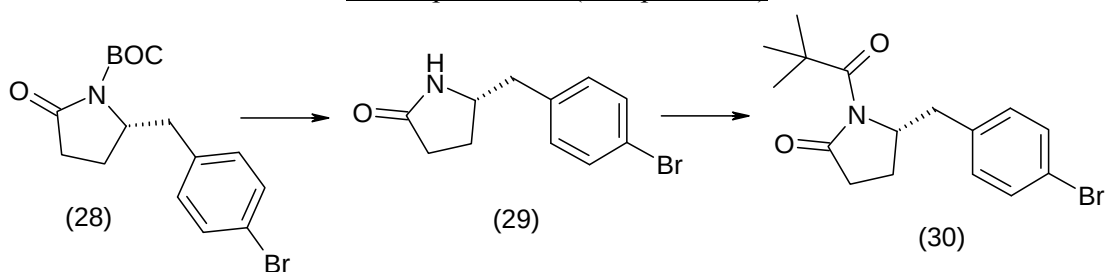
25 26 en crudo (91 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 492 $[M+Na]$, 961 $[2M+Na]$.



A una solución del Compuesto 26 en crudo (91 g, 193 mmol) en DCM anhidro (1 L) se agregó AcOH (127,5 g, 2,1 mol) a -5 °C bajo nitrógeno. La mezcla se agitó a -5 °C durante 30 minutos, luego se agregó NaBH₄ (18,3 g, 483 mmol) en pequeñas porciones en el transcurso de 1 hora. Después de agitar durante otra hora a -5 °C, se agregó NaCl acuoso saturado (500 mL). La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado (2x300 mL) y agua (2x300 mL), se secó en presencia de MgSO₄, se filtró, y se concentró para obtener el producto en crudo, que se purificó adicionalmente mediante el lavado con Et₂O para obtener el Compuesto 27 (68 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 478 [M+Na], 933 [2M+Na].

Una solución del Compuesto 27 (68 g, 149 mmol) en tolueno anhidro (500 mL) se reflujo bajo nitrógeno durante 3 horas. Después de la evaporación del solvente, el residuo se purificó mediante cromatografía (hexanos:EtOAc=10:1) para obtener el Compuesto 28 (38 g) como aceite amarillo claro. LC-MS: 376 [M+Na], 729 [2M+Na].

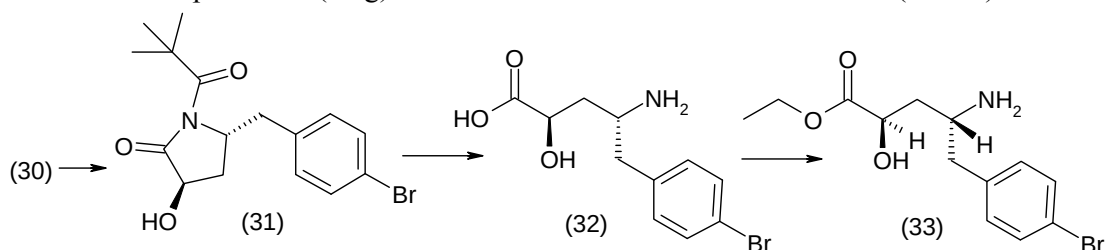
Preparación 6: Éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(4-bromofenil)2-hidroxipentanoico (Compuesto 33)



A una solución de éster butílico del ácido (*S*)-2-(4-bromobenzil)-5-oxopirrolidina-1-carboxílico (28) (38 g, 107 mmol) en DCM anhidro (250 mL) se agregó TFA (20 mL, 0,27 mol) a -5 °C bajo nitrógeno. La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. Después de la evaporación del solvente, el residuo se diluyó con EtOAc (300

mL) y lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (3x200 mL), agua (200 mL), NaCl acuoso saturado (250 mL), se secó en presencia de Na_2SO_4 y se concentró para obtener el Compuesto 29 en crudo (24 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 254 $[\text{M}+\text{H}]$.

A una solución de NaH (8,6 g, 250 mmol) en THF anhidro (200 mL) se agregó a
5 gotas una solución del Compuesto 29 (24 g, 94 mmol) en THF anhidro (200 mL) en 30 minutos a 0°C bajo nitrógeno. La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Después de enfriar a 0°C , se agregó cloruro de pivaloilo (18 g, 150 mmol) a gotas en 30 minutos. La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. La reacción se templó con NH_4Cl acuoso saturado (300 mL) y se extrajo con EtOAc (3x200
10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado (300 mL), se secaron en presencia de MgSO_4 , se filtraron y se concentraron para obtener el producto en crudo, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía (hexanos:EtOAc=25:1) para obtener el Compuesto 30 (18 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 360 (M+Na).



A una solución del Compuesto 30 (18 g, 53 mmol) en THF anhidro (250 mL) se agregó a gotas NaHMDS (47,7 mL, 96 mmol) en el transcurso de 30 minutos a -78°C bajo nitrógeno. Después de agitar a -78°C durante 90 minutos, una solución de (+)-(8,8-diclorocamforilsulfonyl)-oxaziridina (31,6 g, 106 mmol) se agregó a gotas en 30 minutos. Después de agitar a 78°C durante 2 horas, la reacción se templó con NH_4Cl acuoso saturado
20 (400 mL) y se extrajo con EtOAc (3x300 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado (300 mL), se secaron en presencia de MgSO_4 , se filtraron, y se concentraron para formar el producto en crudo que se purificó adicionalmente mediante cromatografía (hexanos:EtOAc=15:1) para obtener el Compuesto 31 (8,9 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 376 (M+Na).

Una solución del Compuesto 31 (8,9 g, 25 mmol) en HCl concentrado (81 mL, 81

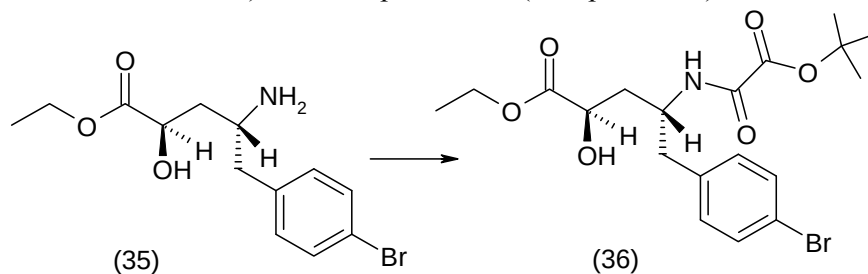
mmol) se calentó a 100 °C durante 16 horas. La mezcla se concentró luego para obtener el producto en crudo que se purificó adicionalmente mediante el lavado con Et₂O para obtener el compuesto 32 (7 g) como sal HCl en forma de sólido amarillo claro. LC-MS: 323 (M+H).

Una solución del compuesto 32 (7 g, 22 mmol) en EtOH (10 mL) se combinó con
5 HCl 8M en EtOH (120 mL, 960 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 50 °C durante 16 horas, y luego se concentró. El producto en crudo se purificó adicionalmente mediante el lavado con Et₂O para obtener el Compuesto 33 (6 g) como sal HCl en forma de sólido amarillo claro. LC-MS: 352 (M+H).

10 Preparación 7: Éster *t*-butílico del ácido cloro-oxo-acético (Compuesto 34)

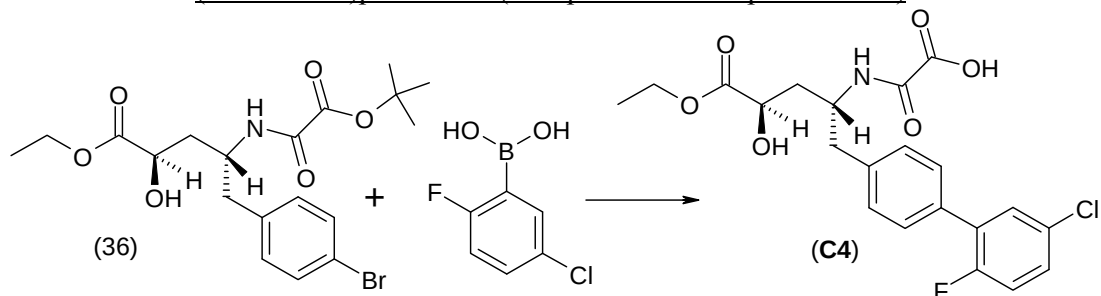
Se combinaron cloruro de oxalilo (232 µL, 2,8 mmol) y alcohol *t*-butílico (228 µL) en éter (6,7 mL) bajo nitrógeno a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El solvente se evaporó bajo vacío para formar el Compuesto 34.

15 Preparación 8: Éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-5-(4-bromofenil)-4-(*t*-butoxioxalil-amino)-2-hidroxipentanoico (Compuesto 36)



Se combinó cloruro de oxalilo (401 µL, 4,7 mmol) en DCM (8 mL) con alcohol *t*-butílico (454 µL, 4,7 mmol). Se agregó Et₃N (198 µL, 1,4 mmol) a gotas, y la solución
20 resultante se agitó durante 5 minutos. Esta solución se agregó luego a gotas a una solución de éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(4-bromofenil)-2-hidroxipentanoico (35) (150 mg, 474 µmol) y Et₃N (198 µL, 1,4 mmol) en DCM (5 mL), y se agitó hasta que la reacción se completó. Los solventes se evaporaron, y el producto en crudo se purificó mediante cromatografía de fase normal (20-100% de EtOAc/hexanos) para obtener el Compuesto 36.

EJEMPLO 4: Éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroxi-4-(oxalilamino)pentanoico (Compuesto de Comparación C4)

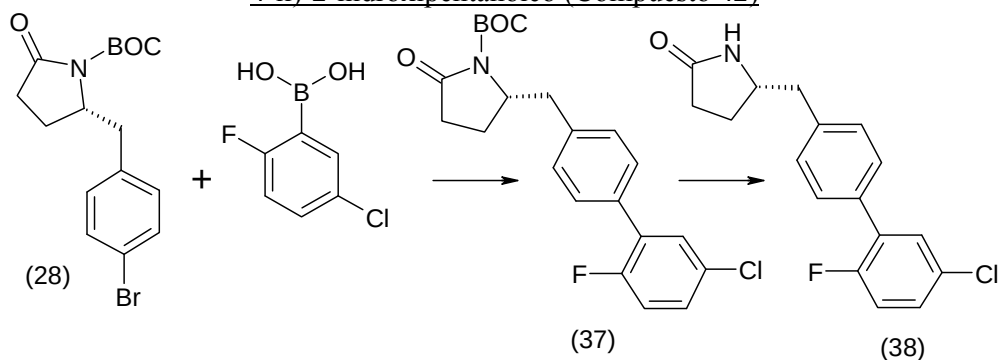


- 5 Se combinó éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-5-(4-bromofenil)-4-(*t*-butoxioxalilamino)-2-hidroxipentanoico (36) (48,5 mg, 109 μ mol) con ácido 5-cloro-2-fluorofenilborónico (22,8 mg, 131 μ mol) y K_2CO_3 (45,2 mg, 327 μ mol) en alcohol *t*-butílico (2 mL) y agua (0,3 mL). Se agregó SilicaCat®DPP-Pd (0,28 mmol/g de carga; 39 mg, 11 μ mol) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 15 minutos, en cuyo momento la LC/MS
- 10 mostró el producto deseado. La mezcla se filtró y el producto filtrado se concentró y purificó mediante HPLC preparativa para obtener el Compuesto de Comparación C4 (20 mg). MS m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{21}H_{21}ClFNO_6$, 438,10; encontrado 438,0.

El Compuesto de Comparación C4 es tal como se describe en el ejemplo 5-6 de la Patente U.S. No. 8.691.868 a nombre de Hughes y colaboradores

15

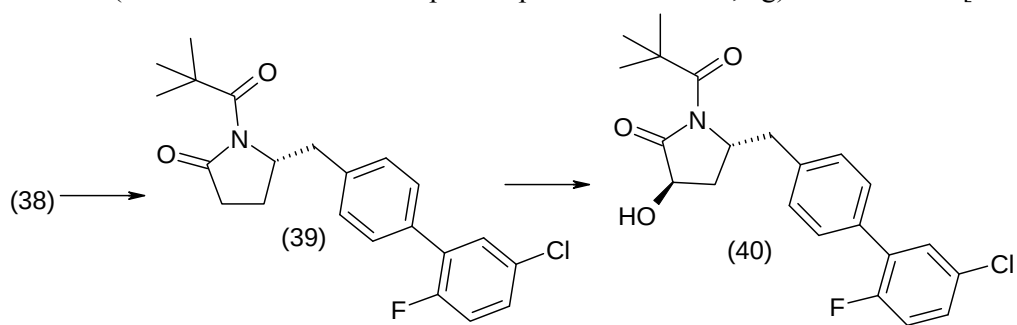
Preparación 9: Éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroxipentanoico (Compuesto 42)



A una solución de éster *t*-butílico del ácido (*S*)-2-(4-bromobencil)-5-oxopirrolidina-

1-carboxílico (28) (25 g, 70,6 mmol) en 1,4-dioxano (500 mL) se agregó ácido 5-cloro-2-fluorofenilborónico (24,6 g, 141 mmol), Pd(PPh₃)₄ (4,1 g, 3,5 mmol) y una solución de K₂CO₃ (17,8 g, 141 mmol) en agua (90 mL), a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla se calentó a 60 °C y se agitó toda la noche. Se agregó agua (500 mL) y el solvente se evaporó. La mezcla se extrajo con EtOAc (3x200 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl acuoso saturado (300 mL) y se filtraron. El producto filtrado se concentró para obtener el producto en crudo que se purificó mediante cromatografía para obtener el Compuesto 37 (22,7 g) como sólido amarillo claro. LC-MS: 829,2 [2M+Na⁺].

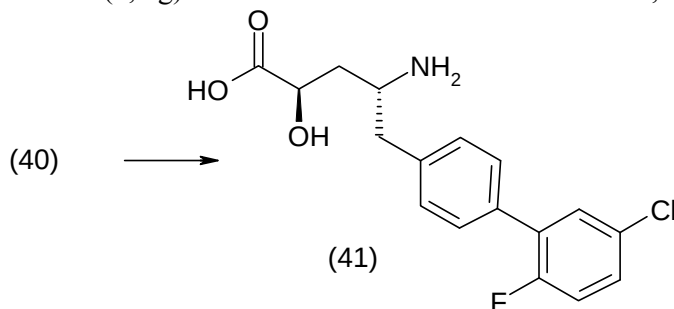
A una solución del Compuesto 37 (4,9 g, 12,1 mol) en DCM (100 mL) se agregó TFA (4,5 mL, 60,7 mmol) a 0 °C bajo nitrógeno, y se agitó durante 1 hora. La mezcla se entibió a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de la evaporación del solvente, el residuo se diluyó con EtOAc (100 mL), luego se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (3x100 mL), agua (2x100 mL), NaCl acuoso saturado (100 mL), luego se secó en presencia de Na₂SO₄. La mezcla se filtró y el producto filtrado se concentró para obtener el Compuesto 38 en crudo (combinado con un lote separado por un total de 16,9 g). LC-MS: 304 [M+H].



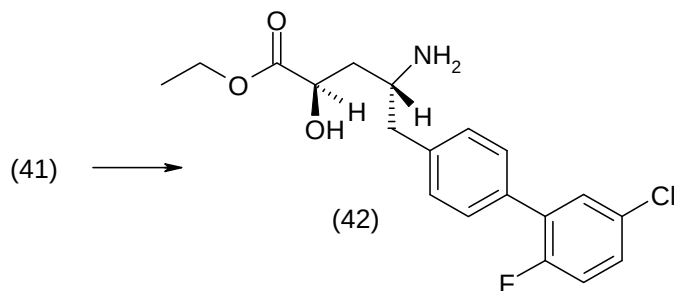
A una solución de NaH (2,4 g, 695 mmol) en THF (200 mL) se agregó a gotas una solución del Compuesto 38 (8,5 g, 278 mmol) en THF (50 mL) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Después de enfriar a 0 °C, se agregó cloruro de pivaloilo (5 g, 41,7 mmol) a gotas en 30 minutos. La mezcla se entibió a temperatura ambiente y se agitó durante 9,5 horas. La reacción se templó con NH₄Cl acuoso saturado (250 mL) y se extrajo con EtOAc (3x400 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron en presencia de Na₂SO₄ y se concentraron para obtener el producto

en crudo que se purificó mediante cromatografía para obtener el Compuesto 39 (18 g) como sólido amarillo. LC-MS: 388 [M+H⁺].

A una solución del Compuesto 39 (9 g, 23,2 mmol) en THF (200 mL) se agregó a gotas NaHMDS (20,9 mL, 41,8 mmol) a -78 °C bajo nitrógeno. Después de agitar durante 1 hora a -78 °C, se agregó a gotas una solución de (+)-(8,8-diclorocamforilsulfonil)oxaziridina (10,4 g, 34,8 mmol) en THF (50 mL). Después de agitar a -78 °C durante 1 hora, la reacción se templó con NH₄Cl acuoso saturado (50 mL) y se extrajo con EtOAc (3x400 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl 1M (400 mL), NaHCO₃ acuoso saturado (400 mL), y NaCl acuoso saturado (400 mL), se secaron en presencia de Na₂SO₄, y se concentraron para formar el producto en crudo que se purificó mediante cromatografía para obtener el Compuesto 40 (8,8 g) como semisólido blanco. LC-MS: 426,1 [M+Na⁺].



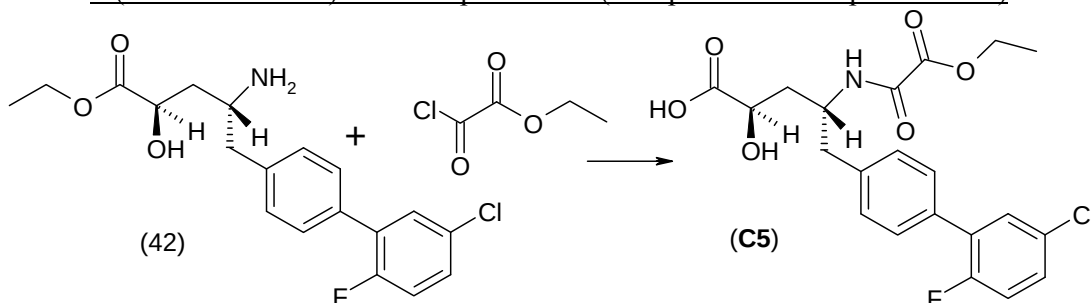
Se agregó una solución del Compuesto 40 (8,8 g, 21,8 mmol) en EtOH (12 mL) a HCl concentrado (200 mL) y se calentó a 100 °C y se agitó toda la noche. La mezcla luego se concentró para formar el producto en crudo que se purificó mediante el lavado con Et₂O (100 mL) para obtener el Compuesto 41 como una sal HCl sólida (7,5 g). LC-MS: 338 [M+H⁺].



Una solución del Compuesto 41 (7,5 g, 20,1 mmol) en EtOH/HCl (100 mL) se calentó a 50 °C toda la noche. La mezcla se concentró, y el producto en crudo se purificó

mediante el lavado con Et₂O (200 mL) para obtener el Compuesto 42 (6,5 g) como sal HCl sólida blanca. LC-MS: 366,1 [M+H⁺].

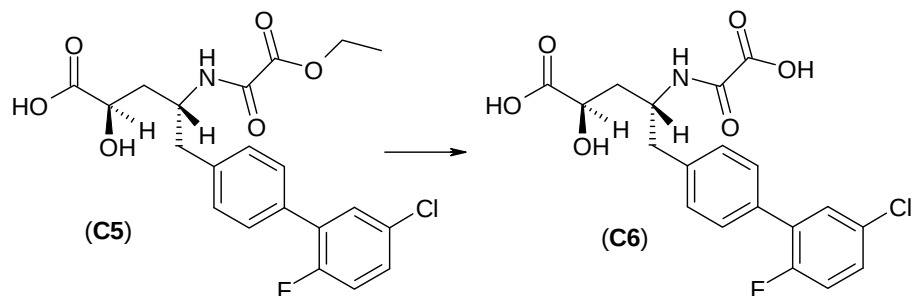
EJEMPLO 5: Ácido (2*R*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-
4-(etoxioxalilamino)-2-hidroxipentanoico (Compuesto de Comparación C5)



Se agregó HCl 1,0 N (6 mL) a éster etílico del ácido (2*R*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-2-hidroxipentanoico (42) (114 mg, 313 μmol) y la mezcla se agitó a 90 °C durante 24 horas, luego se concentró bajo presión reducida. El producto zwitteriónico se combinó con Et₃N (157 μL, 1,1 mmol) en DCM (6 mL), seguido de la adición de una solución de etil cloruro de oxalilo (34,9 μL, 313 μmol) en DCM (2 mL) a 0 °C, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó NaHCO₃ acuoso saturado (5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se extrajo con DCM (3x3 mL) y se concentró, y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa para obtener el Compuesto de Comparación C5 (5 mg). MS *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₁ClFNO₆, 438,10; encontrado 438,2.

El Compuesto de Comparación C5 se describe en el ejemplo 5-14 de la Patente U.S. No. 8.691.868 a nombre de Hughes y colaboradores

EJEMPLO 6: Ácido (2*R*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-
2-hidroxi-4-(oxalilamino)pentanoico (Compuesto de Comparación C6)



Se combinó ácido (2*R*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroxipentanoico (**C5**) con 1M de LiOH en agua (2,5 mL, 2,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, en cuyo momento la LCMS mostró la finalización de la reacción. El solvente se extrajo *in vacuo* para obtener el Compuesto de Comparación **C6** (20,8 mg). MS *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₁₇ClFNO₆, 410,07; encontrado 410,0.

El Compuesto de Comparación **C6** se describe en el ejemplo 5-5 de la Patente U.S. No. 8.691.868 a nombre de Hughes y colaboradores

10 EJEMPLO 7: Estudio de estabilidad de cristales de (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-4-(2-etoxi-2-oxoacetamido)-2-(hidroximetil)-2-metilpentanoato de calcio (**1'**)

Un desafío en el desarrollo de drogas farmacéuticas se relaciona con descubrir una forma cristalina estable de una droga que tenga un punto de fusión razonablemente alto. El desafío a encarar por la presente invención era que los cristales del ácido libre del Compuesto **1** no podían obtenerse. Asimismo, muchos cribados de cristales fallaron, con la excepción de dos: se obtuvieron cristales del ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluorobifenil-4-il)-4-(etoxioxalilamino)-2-hidroximetil-2-metilpentanoico de arginina y calcio. No obstante, los cristales de arginina (ver Ejemplo 1) eran delicuescentes en condiciones ambiente y fueron difíciles de desarrollar en mayor medida. Por otro lado, los cristales de calcio eran estables y se fundieron a aproximadamente 239 °C. Por esa razón, se llevó a cabo un estudio de estabilidad acelerada del Compuesto **1'** a las temperaturas y % de humedad relativa (RH) que se informan a continuación.

Tiempo	25 °C, 60% de RH	40 °C, 75% de RH	5 °C
--------	------------------	------------------	------

(meses)						
	Ensayo ^a	Pureza ^b	Ensayo	Pureza	Ensayo	Pureza
0	95,0	97,3	95,0	97,3	95,0	97,3
1	nt ^c	nt	95,5	95,9	nt	nt
2	94,4	97,3	92,1	95,3	93,4	97,6
3	92,9	96,8	92,1	93,9	92,4	97,5

^aEnsayo = (sustancia de masa/ masa total)*100 = % (p/p).

^bPureza = (AUC de sustancia pura /AUC de sustancia impura)*100 = % (a/a).

^cnt = no evaluado (*not tested*).

5

Estos datos demuestran que el Compuesto **1'** permanece relativamente estable hasta al menos tres meses a las temperaturas y humedad relativa evaluadas.

ENSAYOS

- 10 El Compuesto **1** y los Compuestos de Comparación **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, y **C6** fueron evaluados en los ensayos descritos a continuación. La siguiente tabla ilustra los metabolitos que pueden formarse de uno o más compuestos que son escindidos en varias ubicaciones sobre su estructura.

<i>Compuesto o Prodroga</i> →	<i>Metabolito activo</i>
Compuesto 1	Compuesto de Comparación C2
Compuesto de Comparación C3	Compuesto de Comparación C2
Compuesto de Comparación C4	Compuesto de Comparación C6
Compuesto de Comparación	Compuesto de Comparación

C5	C6
----	----

ENSAYO 1: Ensayos *in vitro* para la cuantificación de la potencia de los inhibidores de NEP en humanos y ratas

Las actividades inhibitorias de la neprilisina en humanos y ratas (EC 3,4,24,11; NEP) se determinaron usando ensayos *in vitro* como los que se describen a continuación.

Extracción de actividad de NEP de los riñones de ratas

Se preparó NEP de rata a partir de los riñones de ratas adultas Sprague Dawley. Los riñones enteros se lavaron en solución salina tamponada en fosfato (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) fría y se levantaron en tampón de lisis helado (1% Triton X-114, 150 mM de NaCl, 50 mM de tris(hidroximetil) aminometano (Tris) a pH de 7,5; Bordier (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607) en una relación de 5 mL de tampón por cada gramo de riñón. Las muestras se homogenizaron en hielo usando una trituradora manual de tejidos Polytron. Los productos homogenizados se centrifugaron a 1000 x g en un rotor de balde oscilante durante 5 minutos a 3 °C. El sedimento se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis helado y se incubó en hielo durante 30 minutos. Las muestras (15-20 mL) luego se dispusieron en capas sobre 25 mL de tampón helado (6% p/v de sacarosa, 50 mM a pH 7,5 de Tris, 150 mM de NaCl, 0,06%, Triton X-114), se calentaron a 37 °C durante 3-5 minutos y se centrifugaron a 1000 x g en un rotor de balde oscilante a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las dos capas superiores se aspiraron, dejando un precipitado oleoso viscoso que contenía la fracción de membrana enriquecida. Se agregó glicerol a una concentración del 50% y las muestras se almacenaron a -20 °C. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron usando un sistema de detección BCA con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) como estándar.

Ensayos de inhibición de enzimas

La NEP humana recombinante se obtuvo comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN, catálogo número 1182-ZN). Se usó el sustrato peptídico fluorogénico Mca-D-Arg-Arg-Leu-Dap-(Dnp)-OH (Medeiros y colaboradores (1997) *Braz. J. Med. Biol.*

Res. 30:1157-62; Anaspec, San Jose, CA).

Los ensayos se realizaron en placas opacas blancas de 384 cavidades a 37 °C usando los sustratos peptídicos fluorogénicos a una concentración de 10 µM en tampón de ensayo (50 mM de HEPES, pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,01% monolaurato de polietilenglicol sorbitán (Tween-20), 10 µM de ZnSO₄). Las respectivas enzimas se usaron a concentraciones que generaron la proteólisis cuantitativa de 1 µM de sustrato después de 20 minutos a 37 °C.

Los compuestos de ensayo se evaluaron de acuerdo con un rango de concentraciones comprendidas entre 10 µM y 20 pM. Los compuestos de ensayo fueron agregados a las enzimas e incubados durante 30 minutos a 37 °C antes de iniciar la reacción mediante la adición del sustrato. Las reacciones finalizaron después de 20 minutos de incubación a 37 °C por medio de la adición de ácido acético glacial a una concentración final del 3,6% (v/v).

Las placas se leyeron en un fluorómetro con longitudes de onda de excitación y emisión establecidas a 320 nm y 405 nm, respectivamente. Las constantes de inhibición se obtuvieron mediante regresión no lineal de los datos usando la siguiente ecuación (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA):

$$v = v_0 / [1 + (I / K')]$$

donde v es la tasa de reacción, v_0 es la tasa de reacción no inhibida, I es la concentración del inhibidor y K' es la constante de inhibición aparente.

20

Compuesto	pK _i (rata)	pK _i (humano)
1	9,1	9,1
C2	9,5	9,2
C3	5,7	5,4
C4	8,1	7,8
C5	9,7	9,7
C6	9,8	9,7

- Estos datos muestran que el Compuesto **1** tiene potencia sobre la NEP en rata y humano similar al Compuesto de Comparación **C2** mientras que el Compuesto de Comparación **C3** tiene una potencia muy baja sobre la enzima NEP en rata y humano en comparaci3n con la del Compuesto de Comparaci3n **C2**. En forma similar, el Compuesto de Comparaci3n **C5** tiene potencia sobre la NEP en rata y humano similar al Compuesto de Comparaci3n **C6** mientras que el Compuesto de Comparaci3n **C4** tiene una potencia baja sobre la enzima NEP en rata y humano en comparaci3n con la del Compuesto de Comparaci3n **C6**.
- Los Compuestos **1**, **C2**, **C5**, y **C6** tienen actividad significativa sobre la enzima NEP en rata y humano y satisfacen el umbral de actividad de $pK_i \geq 9,0$ para ser 3tiles para uso terap3utico, tal como se describi3 con anterioridad.

ENSAYO 2: Estudio farmacocin3tico PO en ratas, perros y monos

- Cada estudio farmacocin3tico en ratas, perros o monos comenz3 con la formulaci3n del compuesto de ensayo. Las masas apropiadas de cada compuesto de ensayo se agregaron en un volumen de veh3culo (por ej. 5% de bicarbonato de sodio, 5% de dextrosa en agua) de modo tal que la concentraci3n final de cada compuesto fuera apropiada para administrarse a 2 mL/kg. Si bien una suspensi3n homog3nea era aceptable para la administraci3n oral, las soluciones para administraci3n intravenosa se esterilizaron por filtraci3n (0,2 μ m) antes de la administraci3n para asegurar que no se administraran materiales particulados.

- En el estudio en ratas, las ratas Sprague-Dawley machos pre-canuladas (3 por ruta) de entre 8 y 10 semanas de vida fueron obtenidas a trav3s de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Las ratas recibieron ya sea una 3nica dosis oral por sonda o una 3nica dosis intravenosa (mediante la vena lateral de la cola) de la soluci3n. La dosis final fue de t3picamente 0,5-3 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre seriales a trav3s de la c3nula implantada en la vena yugular a los 3 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, y 24 horas posteriores a la dosis. La extracci3n de las muestras se realiz3 ya

sea a mano o bien usando dispositivos de extracción de sangre automatizados. Las muestras fueron recolectadas en tubos Microtainer que contenían fluoruro de sodio, oxalato de potasio y paraoxón (anticoagulantes e inhibidor de la esterasa, respectivamente), y fueron procesadas en plasma mediante centrifugación refrigerada.

- 5 En el estudio en perros, perros Beagle machos (3 por ruta) alojados en Agilux Laboratories (Worcester, MA) y que pesaban entre 7-12 kg recibieron una única dosis por sonda oral de la solución. La dosis final fue de típicamente 0,1-2 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre seriales a través de venopunción directa a los 3 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, y 24 horas posteriores a la dosis.
- 10 Todas las muestras se recolectaron manualmente en tubos Microtainer que contenían fluoruro de sodio, oxalato de potasio y paraoxón, y fueron procesadas en plasma mediante centrifugación refrigerada.

- En el estudio en monos, monos cinomolgos machos (3 por ruta) alojados en Xenometrics (Stilwell, KS) y que pesaban entre 4-5 kg, recibieron una única dosis por sonda oral de la solución. La dosis final fue de 2 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre seriales de la vena cefálica o safena antes de la administración de la dosis y 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, y 24 horas posteriores a la dosis. Todas las muestras se recolectaron en tubos que contenían oxalato de potasio, fluoruro de sodio y paraoxón, y fueron procesadas en plasma mediante centrifugación refrigerada.
- 15

- 20 Las muestras de plasma se extrajeron con 3 volúmenes de MeCN que contenían un estándar interno adecuado. Los extractos fueron reconstituidos en 3 volúmenes de agua que contenían 1% de ácido fórmico, y analizados mediante MS/MS acoplada a HPLC. Los datos de concentración en plasma-tiempo fueron analizados usando el programa informático Foenix (Pharsight Corp., St. Louis, MO) para calcular los parámetros farmacocinéticos.

- 25 La biodisponibilidad oral (% de F) representa el porcentaje de una dosis que alcanza la circulación sistémica después de una dosis oral cuando se compara con una dosis intravenosa, donde la dosis total se administra directamente en la circulación sistémica. Es igual a la relación entre el área debajo de la curva (AUC) de concentración-tiempo después

de una dosis oral y el área debajo de la curva de concentración-tiempo después de una dosis intravenosa, normalizada para cualesquiera diferencias en los niveles de dosis entre las rutas.

	Compuesto de Comparación C2		Compuesto 1	
Especie	AUC _{última} ^a (μg*hr/mL) (normalizada) ^b	Biodisponibilidad oral (% de F)	AUC _{última} ^a (μg*hr/mL) (normalizada) ^b	Biodisponibilidad oral (% de F)
Rata	0,45	33	3,4	>100
Perro	0,27	13	0,89	44
Mono	0,82	1,7	7,4	77

^aAUC_{última} es el área debajo de la curva de concentración en plasma versus tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo después de la administración de la dosis en que la última concentración cuantificable fue observada, estimada mediante el método trapezoidal lineal

^b Normalizada al dividir la AUC_{última} por la dosis administrada

- 5
- 10 Estos datos muestran que el Compuesto de Comparación C2 (metabolito activo del Compuesto 1) tiene biodisponibilidad oral baja mientras que el Compuesto 1 tiene biodisponibilidad oral relativamente alta en todos los tres modelos animales evaluados.

ENSAYO 3: Estudio farmacocinético IV/PO en ratas y perros

- 15 Cada estudio farmacocinético en ratas o perros comenzó con la formulación del compuesto de ensayo. Las masas apropiadas de cada compuesto de ensayo se agregaron en un volumen de vehículo (por ej. 5% de bicarbonato de sodio, 5% de dextrosa en agua) de modo tal que la concentración final de cada compuesto fuera apropiada para administrarse a 2 mL/kg. Si bien una suspensión homogénea era aceptable para la administración oral, las
- 20 soluciones para administración intravenosa se esterilizaron por filtración (0,2 μm) antes de la administración para asegurar que no se administraran materiales particulados.

En el estudio en ratas, las ratas Sprague-Dawley machos pre-canuladas (3 por ruta) de entre 8 y 10 semanas de vida fueron obtenidas a través de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Las ratas recibieron ya sea una única dosis oral por sonda o una única dosis intravenosa (mediante la vena lateral de la cola) de la solución. La dosis final fue de típicamente 0,5-3 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre seriales a través de la cánula implantada en la vena yugular a los 3 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, y 24 horas posteriores a la dosis. La extracción de las muestras se realizó ya sea a mano o bien usando dispositivos de extracción de sangre automatizados. Las muestras fueron recolectadas en tubos Microtainer que contenían fluoruro de sodio, oxalato de potasio y paraoxón, y fueron procesadas en plasma mediante centrifugación refrigerada.

En el estudio en perros, perros Beagle machos (3 por ruta) alojados en Agilux Laboratories (Worcester, MA) y que pesaban entre 7-12 kg recibieron una única dosis por sonda oral o una única dosis intravenosa (mediante un catéter permanente) de la solución. La dosis final fue de típicamente 0,1-2 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre seriales a través de venopunción directa a los 3 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, y 24 horas posteriores a la dosis. Todas las muestras se recolectaron manualmente en tubos Microtainer que contenían fluoruro de sodio, oxalato de potasio y paraoxón, y fueron procesadas en plasma mediante centrifugación refrigerada.

Las muestras de plasma se extrajeron con 3 volúmenes de MeCN que contenían un estándar interno adecuado. Los extractos fueron reconstituidos en 3 volúmenes de agua que contenían 1% de ácido fórmico, y analizados mediante MS/MS acoplado a HPLC. Los datos de concentración en plasma-tiempo fueron analizados usando el programa informático Foenix (Pharsight Corp., St. Louis, MO) para calcular los parámetros farmacocinéticos.

Datos farmacocinéticos en ratas

Compuesto administrado	Ruta	Analito	AUC _{última} ^a (µg*hr/mL)		Biodisponibilidad oral ^b del Metabolito activo
			Media	CV	Media
1	PO	1	0	NC	NC
1	PO	C2	15	18%	>100%
C2	IV	C2	16	32%	NC
C3	PO	C3	0,56	20%	NC
C3	PO	C2	0,67	20%	21%
C2	IV	C2	16	32%	NC
C5	PO	C5	0	NC	NC
C5	PO	C6	0,62	12%	11%
C6	IV	C6	15	17%	NC
C4	PO	C4	0,04	32%	NC
C4	PO	C6	0,59	34%	9%
C6	IV	C6	15	17%	NC

^a AUC_{última} es el área debajo de la curva de concentración en plasma versus tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo después de la administración de la dosis en que la última concentración cuantificable fue observada, estimada mediante el método trapezoidal lineal

^b La Biodisponibilidad oral es calculada como la AUC_{última} de la molécula activa después de la administración oral de la prodroga, dividida por la AUC_{última} después de la administración intravenosa de la molécula activa, normalizada para cualesquiera diferencias en las dosis administradas, expresada como porcentaje.

Estos datos en ratas muestran que el compuesto de la invención, Compuesto **1**, genera

exposición sistémica significativamente superior de su metabolito activo que cualquiera de los Compuestos **C3**, **C5** o **C4** (valores de biodisponibilidad del metabolito de >100%, 21%, 11% y 9%, respectivamente).

Metabolito activo	Compuesto o Prodroga	AUC _{última} del activo / AUC _{última} de la prodroga
C2	1	No se detectó prodroga
C2	C3	1,2
C6	C5	No se detectó prodroga
C6	C4	17

5

Tanto para el Compuesto **1** como para el Compuesto de Comparación **C5**, no se detectó prodroga, por lo que se puede asumir que la completa conversión de los compuestos de prodroga en el metabolito activo ocurrió *in vivo* en la rata. Ambos compuestos tienen relaciones de exposición del metabolito superiores a las del Compuesto de Comparación **C4** (17) o del Compuesto de Comparación **C3** (1,2).

10

Estas prodrogas se escinden mediante la hidrólisis estérica, que con frecuencia ocurre más rápidamente en ratas que en perros o humanos. Por esa razón, el modelo de rata de hidrólisis estérica no siempre es predictivo de la escisión en los humanos. Por ende, las prodrogas como las de la invención también deberían evaluarse en perros para obtener datos predictivos adicionales para la estimación de las tasas de escisión en humanos.

15

Datos farmacocinéticos en perros

Compuesto administrado	Ruta	Analito	AUC _{última} (µg*hr/mL)		Biodisponibilidad oral del metabolito activo
			Media	CV	Media
1	PO	1	0,0037	37%	NC
1	PO	C2	0,65	30%	44%

Compuesto administrado	Ruta	Analito	AUC _{última} (µg*hr/mL)		Biodisponibilidad oral del metabolito activo
			Media	CV	Media
C2	IV	C2	1,97	5%	NC
C3	PO	C3	0,95	3%	NC
C3	PO	C2	0	0%	0%
C2	IV	C2	1,97	5%	NC
C5	PO	C5	0,029	26%	NC
C5	PO	C6	0,37	19%	29%
C6	IV	C6	1,28	26%	NC
C4	PO	C4	0,48	33%	NC
C4	PO	C6	0,59	17%	46%
C6	IV	C6	1,28	26%	NC

Estos datos en perros muestran que el compuesto de la invención, Compuesto **1**, genera biodisponibilidad oral similar de su metabolito activo al Compuesto de Comparación **C4** y biodisponibilidad muy superior al Compuesto **C3** o **C5** (valores del 44%, 46%, 0% y 5 29%, respectivamente).

Metabolito activo	Compuesto o Prodroga	AUC _{última} del activo/ AUC _{última} de la Prodroga
C2	1	177
C2	C3	0
C6	C5	13
C6	C4	1,2

Estos datos en perros muestran que la prodroga de la invención, el Compuesto **1**,

ofrece una exposición relativa significativamente superior a su molécula de metabolito activo (es decir, $AUC_{\text{última}}$) que cualquiera de los otros compuestos o prodrogas evaluados. Tal hidrólisis rápida y extensiva de la prodroga provee una ventaja significativa y sorprendente para el compuesto de la invención. En el perro, el Compuesto **1** se escinde en

5 forma mucho más eficiente que el Compuesto de Comparación **C5**, lo que genera una tasa de exposición 10 veces mejor (177 versus 13). Asimismo, el Compuesto **1** se escinde incluso más eficientemente cuando se compara con el Compuesto de Comparación **C3** (tasas de exposición de 177 versus 0). La magnitud de esta diferencia no podría haber sido predicha sobre la base de la comparación de la extensión de la hidrólisis del Compuesto de

10 Comparación **C5** en relación con el **C4** (13 versus 1,2).

ENSAYO 4: Excreción Renal del Compuesto **1** en perros Beagle machos

Un factor importante para asegurar la administración de la dosis apropiada a largo plazo y las concentraciones de droga en estado estable correctas en pacientes es la depuración

15 de la droga. En general, una depuración disminuida de la droga genera concentraciones más altas de la droga y mayores efectos de la droga. A fin de entender la renal depuración del Compuesto **1**, se evaluó el porcentaje de la dosis administrada recuperada en la orina después de una única dosis i.v. en perros Beagle machos, tal como se describe a continuación.

Los perros Beagle machos (N=3), que tenían pesos corporales de entre 9,58 y 10,42

20 kg, recibieron una dosis i.v. de 1,0 mg/kg del Compuesto **1**. El Compuesto **1** fue formulado en 5% de NaHCO_3 en D5W. Los perros se sometieron a ayuno toda la noche y se pretrataron con pentagastrina (60 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 mL/kg, IM) aproximadamente 30 minutos antes de la administración de la dosis para estimular la secreción gástrica. Volvieron a recibir alimento aproximadamente 4 horas después de la dosis. Las muestras de orina fueron recolectadas,

25 rodeadas de paquetes de hielo durante el período de recolección. Después de 24 horas, se registró el peso de la muestra; la muestra se mezcló completamente, y se obtuvieron alícuotas y se congelaron (-80°C) antes del bioanálisis.

Las concentraciones en la orina de los perros del Compuesto **1** fueron determinadas mediante LC/MS/MS. Las muestras del estudio en orina (diluidas en plasma) se sometieron a vórtice y se colocaron 50 µL en una placa de 96 cavidades. Las muestras se extrajeron con acetonitrilo con crisina estándar interno. El extracto se centrifugó, y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 cavidades y se diluyó 1 parte de muestra en 4 partes de agua con 0,2% de ácido fórmico. Las muestras (12 µL) fueron inyectadas en una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1mm, 1,7µm) con una tasa de flujo de 0,9 mL/min. La fase móvil A consistía en 95:5:0,1 (v:v:v) agua:acetonitrilo:ácido fórmico, y la fase móvil B consistía en 50:50:0,1 (v:v:v) metanol:acetonitrilo:ácido fórmico. El rango de ensayo del Compuesto **1** era de 0,001 a 5,00 µg/mL.

La cantidad media de orina excretada en un período de recolección de 24 horas, y el % aproximado de dosis administrada excretada en la orina se informa en la tabla que sigue.

Especie	Cantidad de Administración i.v. (mg/kg)	Cantidad del Compuesto 1 excretada en orina en período de recolección (0-24 horas) (µg) Media ^a	Excreción urinaria (% aproximado de dosis administrada excretada en orina) Media ^a
Perro	1,0	28,9	0,284%

^a Promedio de las tres determinaciones

La excreción renal del Compuesto **1** en el perro fue de aproximadamente < 0,5% de la dosis administrada. Este dato indica que el Compuesto **1** tiene excreción renal baja en los perros Beagle machos.