

ÁCIDO (2S,4R)-5-(5'-CLORO-2'-FLUORO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL)-2-(ETOXIMETIL)-4-(3-HIDROXIISOXAZOL-5-CARBOXAMIDO)-2-METILPENTANOICO CRISTALINO, Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes de Patentes Provisionales U.S. Nos. 62/305,393 y 62/346,336, presentadas el 8 de marzo de 2016 y el 6 de junio de 2016, respectivamente, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad por referencia en la presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una forma cristalina novedosa que tiene actividad de inhibición de la neprilisina. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, a procesos para preparar el compuesto, y a los métodos de uso del compuesto para tratar enfermedades tales como hipertensión, insuficiencia cardíaca, y enfermedad renal.

ESTADO DEL ARTE

La neprilisina (endopeptidasa neutra, EC 3.4.24.11) (NEP), es una Zn^{2+} 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.

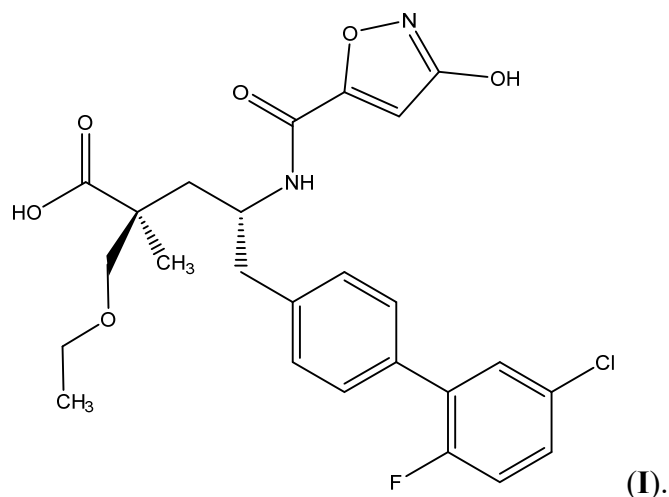
Los inhibidores de la NEP –tales como tiorfán, candoxatril y candoxatrilat– han sido estudiados como potenciales terapéuticos. Los compuestos que inhiben tanto la NEP como la enzima convertidora de angiotensina I (ACE, por sus siglas en inglés *Angiotensin Converting Enzyme*) también son conocidos, e incluyen omapatrilat, gempatrilat y sampatrilat. Bajo el nombre de “inhibidores de la vasopectidasa”, 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 son descritos en la Patente U.S. No. 9,126,956 a nombre de Fleury y colaboradores. Muchos de estos compuestos tienen una o más propiedades deseables. Para usar efectivamente un compuesto inhibidor de la NEP como agente terapéutico, sería deseable tener una forma en estado sólido que pudiera fabricarse con facilidad y que tuviera 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, y un tamaño de cristal pequeño que incrementa la disolución, la biodisponibilidad y la absorción, permitiendo de este modo características de suministro de droga favorables. 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 cristalinas de los compuestos orgánicos es en gran medida 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 agente farmacéutico. Por consiguiente, es necesaria una forma cristalina estable que tenga un punto de fusión razonablemente alto y un tamaño de cristal pequeño.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee una forma cristalina novedosa del Compuesto I, que se ha encontrado posee actividad de inhibición de la enzima neprilisina (NEP). Por consiguiente, se espera que este compuesto sea útil y ventajoso como agente terapéutico para tratar afecciones tales como hipertensión, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal. La estructura del Compuesto I es:



Un aspecto de la invención se refiere a una forma de ácido libre cristalina de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (Compuesto **I'**). En una forma de realización, el Compuesto **I'** es anhidro, no higroscópico o ambos. El Compuesto **I'** también puede denominarse “forma cristalina **I''**”.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y el Compuesto **I'**. 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 (PDE, por sus siglas en inglés *Phosphodiesterase*), un inhibidor de la renina, un diurético, o combinaciones de los mismos.

El Compuesto **I'** de la invención 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 de sus sustratos 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 **I'**. Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar hipertensión, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca, o enfermedad renal, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I'**. 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 **I'**.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a procesos útiles para preparar el Compuesto **I** y su forma cristalina, el Compuesto **I'**.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del Compuesto **I** y su forma cristalina, el Compuesto **I'**, 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 **I** o el Compuesto **I'** para inhibir una enzima NEP en un sujeto. En la presente se describen otros aspectos y formas de realización de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXR, por sus siglas en inglés *Powder X-Ray Diffraction*) del ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico cristalino (**I'**).

La Figura 2 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*) de la forma cristalina (**I'**).

La Figura 3 muestra un perfil termogravimétrico para la forma cristalina (**I'**).

La Figura 4 muestra una isoterma de sorción dinámica de humedad (DMS, por sus siglas en inglés *Dynamic Moisture Sorption*) de la forma cristalina (**I'**).

La Figura 5 es una imagen de microscopio de luz polarizada (PLM, por sus siglas en inglés *Polarized Light Microscope*) de la forma cristalina (**I'**).

La Figura 6 muestra el cambio desde la línea de inicio en cGMP plasmático medio (nM) en sujetos sanos que no recibieron ninguna dosis o que recibieron una dosis única de 50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg y 600 mg en 24 horas.

La Figura 7 ilustra el cambio en n veces en cGMP desde la línea de inicio versus la dosis (mg) para los datos generados en un estudio con dosis ascendente individual.

La Figura 8 es la concentración del Compuesto **I** (ng/mL) versus tiempo (hr) para los datos generados en un estudio con dosis ascendente individual.

La Figura 9 muestra el % de eliminación renal de sacubitril versus el Compuesto **I**

en sujetos sanos.

La Figura 10 muestra el cambio desde la línea de inicio en cGMP plasmático medio (nM) en el Día 14 en sujetos sanos adultos y ancianos que no recibieron ninguna dosis o que recibieron una dosis única de 10 mg, 50 mg, 100 mg, and 200 mg en 24 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere al ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico cristalino (**I'**).

El Compuesto **I'** de la invención contiene dos centros quirales y, por lo tanto, un compuesto de tal estructura puede existir en diversas formas estereoisoméricas. Específicamente, los átomos de carbono pueden tener 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 **I'**, tal como se ilustra y menciona, se encuentra en la configuración (2*S*,4*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 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 **I'** de la invención posee actividad de inhibición de la neprilisina (NEP), es decir, el compuesto es capaz de inhibir la actividad enzimática-catalítica. 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 negativo a base 10 de la constante de disociación (K_i), que se informa típicamente en unidades molares. El compuesto de la invención tiene un valor de pK_i para NEP $\geq 9,0$. Otras propiedades y utilidades del Compuesto **I'** 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 Patente U.S. No. 9.126.956.

El Compuesto **I'**, 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 descritos en esta invención, 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 **I'** enriquecido en tritio o carbono-14, que se puede usar, por ejemplo, en estudios de distribución en tejidos; el Compuesto **I'** enriquecido en deuterio, especialmente en un sitio de metabolismo que forma, por ejemplo, un compuesto que tiene mayor estabilidad metabólica; y el Compuesto **I'** 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

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” 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 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.

El término “alrededor de” o “aproximadamente”, cuando se usa en el contexto del comportamiento térmico del Compuesto **I'**, se define como $\pm 1-3$ °C. El término “aproximado”, cuando se usa en el contexto del % de dosis del Compuesto **I'** 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 “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 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 activo es liberado en un sujeto 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.

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.

En general, cuando se describen sólidos farmacéuticos, el término “no solvatado” significa “sin solvente”. Por ello, cuando se describe que la forma cristalina de la invención es “no solvatada”, quiere decir que las partículas cristalinas esencialmente contienen sólo moléculas de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico; la forma no contiene cantidades significativas de otras moléculas de solventes incluidas en la red o, en otras palabras, el solvente no se incorpora en forma significativa en la red cristalina. El término “no solvatado” es un sinónimo del término “no hidratado” cuando el agua es el solvente. El

término “anhidro” significa que el cristal contiene una cantidad insignificante o nula de agua, especialmente agua de cristalización. Una “cantidad insignificante” de agua significa el límite de detección al cual el agua puede ser medida. Por ejemplo, la medición del contenido de agua Karl Fischer (% p/p) en esta solicitud puede tener un límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés *Limit Of Quantification*) del 0,20% p/p. Por lo tanto, la cantidad de agua encontrada en el Compuesto I' se informaría como <LOQ o <0,20% p/p. Asimismo, una sustancia higroscópica es aquella que atrae fácilmente agua de su entorno, a través de absorción o adsorción. El término “no higroscópico/a” se usa para describir cristales que tienen poca tendencia o ninguna tendencia a adsorber la humedad a sus superficies o absorber agua en su red cristalina.

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.

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 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 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.

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 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 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 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 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 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.

PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS GENERALES

La forma cristalina del Compuesto **I** de la invención puede 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 proceso (por ejemplo, temperaturas de reacción, 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 es una temperatura dentro del rango 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.

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.

En una forma de realización, el Compuesto **I** puede prepararse al (a) copular bencil (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato clorhidrato con ácido 3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxílico en un solvente en aproximadamente una relación molar 1:1 para obtener bencil (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoato; y (b) desproteger el bencil (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoato para formar ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (**I**).

En una forma de realización, el paso (a) además incluye la adición de un agente de copulación peptídico y una base en aproximadamente una relación molar 1:3:1:1 de agente de copulación a base a bencil (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato clorhidrato a ácido 3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxílico. Los ejemplos representativos de agentes de copulación peptídicos incluyen, mas no se limitan a: O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), O-

(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), O-(7-Azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TATU), O-(6-Clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HCTU), and O-[(Etoxicarbonil)cyanometilenamino]-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TOTU). En una forma de realización preferida, el agente de copulación peptídico es HATU, HBTU y HCTU, donde HCTU es el más preferido. Un ejemplo de una base que se puede usar en la reacción es DIPEA.

En otra forma de realización, el paso de desprotección (b) se realiza con un catalizador de paladio, por ejemplo paladio sobre carbono (5% o 10% p/p), y gas hidrógeno. En las formas de realización adicionales, los siguientes pasos pueden realizarse después del paso (b). El catalizador de paladio es extraído, seguido de la adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno. La reacción puede luego agitarse durante al menos 1 h o preferentemente 2 h a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y 30 °C. Este paso puede ser seguido de destilación y lavado una o más veces, y opcionalmente enfriamiento y añejamiento, antes del aislamiento del Compuesto I.

En una forma de realización, la invención se refiere a una forma cristalina de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (**I**). En otra forma de realización, la forma cristalina es anhidra, no higroscópica, o ambas.

La preparación de la forma cristalina **I'** se realiza 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 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 etil acetato y agua. Al completar la cristalización, el compuesto cristalino puede aislarse de la mezcla de reacción mediante cualquier medio convencional tal como precipitación, filtración, concentración, centrifugación, secado *in vacuo*, y similares.

En una forma de realización, la forma cristalina **I'** puede prepararse al (a) formar una solución que comprende ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (Compuesto **I**) con

un solvente, que opcionalmente contiene un depurador de metal, a una temperatura elevada; (b) enfriar la solución a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y 5 °C; y (c) aislar los sólidos resultantes para obtener la forma cristalina **I'**. En otra forma de realización, el proceso además incluye agitar o sacudir la solución a una temperatura de entre aproximadamente -20 °C y 5 °C.

El paso (a) se realiza generalmente a temperatura ambiente en un solvente polar. El solvente polar puede ser prótico o aprótico e incluir, por ejemplo, una mezcla de etil acetato y agua, etil acetato, o etanol. La temperatura elevada en el paso (a) se encuentra típicamente entre aproximadamente 60 °C y 95 °C y preferentemente entre 70 °C y 85 °C, 70 °C y 80 °C, o 75 °C y 85 °C. El paso de aislamiento (c) implica filtrar, lavar con uno o más solventes, secar al aire o bajo vacío, o una combinación de estos pasos. Si el Compuesto **I'** o forma cristalina **I'** se seca bajo vacío, esto se puede efectuar a una temperatura de entre 25 °C y 70 °C, preferentemente entre 30 °C y 60 °C, 30 °C y 50 °C, 40 °C y 60 °C, o 40 °C y 50 °C.

En otra forma de realización, el proceso además incluye el paso de agitar la mezcla a una temperatura de entre 0 °C y 30 °C durante al menos 5 minutos antes de elevar la temperatura a un valor de entre aproximadamente 60 °C y 95 °C. En forma alternativa, la agitación se puede realizar a una temperatura de entre 25 °C y 35 °C durante al menos 1 h.

En otra forma de realización adicional, la mezcla además se decanta y una fase no acuosa superior se aísla antes de elevar la temperatura. En forma alternativa, la mezcla se filtra, se enjuga y se reduce en volumen antes de elevar la temperatura.

En otra forma de realización más, la temperatura en el paso (b) del proceso anterior se encuentra independientemente entre -15 °C y -5 °C o, en forma alternativa, independientemente entre -5 °C y 5 °C.

PROPIEDADES CRISTALINAS

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 (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 a una forma cristalina del ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (**I'**) que se caracteriza por un patrón de PXRD en donde las posiciones de los picos están sustancialmente de acuerdo con las ilustradas en la Figura 1.

Los picos con intensidades relativas superiores al 1% en el área se enuncian en la tabla que sigue. Este patrón muestra picos de difracción agudos en el rango de 5-35° en 2 θ . Estos y otros picos en el patrón de difracción pueden usarse para identificar esta forma.

2 θ *	d (Å)	Área	% de área
6,51	13,57	10871,5	100
11,17	7,92	199,4	1,8
11,62	7,61	2441,7	22,5
13,05	6,78	2380,2	21,9
15,07	5,88	3944,4	36,3
15,72	5,63	1321,5	12,2
17,12	5,18	2026,8	18,6
17,12	5,18	2026,8	18,6
18,77	4,72	979,9	9,0
19,63	4,52	585,3	5,4
20,79	4,27	1339,1	12,3
21,10	4,21	1192,2	11,0
22,38	3,97	814,6	7,5
23,28	3,82	6169,3	56,7
23,89	3,72	840,8	7,7
24,48	3,63	1053,9	9,7
25,17	3,54	281,4	2,6
25,81	3,45	1604,8	14,8
26,19	3,40	1943,7	17,9
27,05	3,29	181,9	1,7
28,11	3,17	363,1	3,3
28,76	3,10	176,1	1,6
29,21	3,06	372,8	3,4
30,29	2,95	1003,4	9,2
31,76	2,816	486,3	4,5

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

Por ende, en una forma de realización, la forma cristalina **I'** se caracteriza por un patrón de PXRD que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,51\pm0,20$, $11,62\pm0,20$, $13,05\pm0,20$, $15,07\pm0,20$, y $23,28\pm0,20$.

En otra forma de realización, la forma cristalina **I'** se caracteriza por un patrón de PXRD que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,51\pm0,20$, $11,62\pm0,20$, $13,05\pm0,20$, $15,07\pm0,20$, $17,12\pm0,20$, $23,28\pm0,20$, y $26,19\pm0,20$.

En otra forma de realización, la forma cristalina **I'** se caracteriza además por tener uno o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre $6,51\pm0,20$, $11,62\pm0,20$, $13,05\pm0,20$, $15,07\pm0,20$, $15,72\pm0,20$, $17,12\pm0,20$, $20,79\pm0,20$, $21,10\pm0,20$, $23,28\pm0,20$, $24,48\pm0,20$, $25,81\pm0,20$, y $26,19\pm0,20$; y en otra forma de realización más, el compuesto cristalino se caracteriza además por tener tres o más de dichos picos de difracción adicionales.

En una forma de realización, forma cristalina **I'** se caracteriza por el termograma de DSC o la traza de calorimetría diferencial de barrido de acuerdo con lo ilustrado en la Figura 2. La forma cristalina **I'** se caracteriza por una traza de calorimetría diferencial de barrido registrada a una tasa 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 $214\text{ }^{\circ}\text{C}$ y aproximadamente $218\text{ }^{\circ}\text{C}$. El termograma de DSC o la traza de calorimetría diferencial de barrido ilustra una endoterma de fusión con un pico a aproximadamente $216,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, inicio a $214,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, y con un área debajo de la endoterma correspondiente a $107,2\text{ J/g}$. La descomposición del compuesto coincide con la fusión y la contribución de $107,2\text{ J/g}$ hacia la entalpía de fusión no es establecida.

En una forma de realización, la forma cristalina **I'** se caracteriza por el perfil de TGA en la Figura 3. Este perfil muestra ausencia de pérdida de masa a una temperatura de hasta aproximadamente $240\text{ }^{\circ}\text{C}$; el compuesto cristalino se descompone después de la fusión, como se observa a raíz de la pérdida de peso significativa que tiene lugar a un inicio de aproximadamente $242\text{ }^{\circ}\text{C}$. No existe pérdida de masa adicional hasta la temperatura de descomposición, lo que indica una falta de moléculas adsorbidas tales como agua.

En una forma de realización, la forma cristalina **I'** se caracteriza por la isoterma de DMS en la Figura 4. Esta forma es un sólido no higroscópico. La ganancia total de humedad observada es menor al $0,02\%$ en peso cuando se expone a una humedad relativa de entre 5 y 90% . No se encuentra histéresis significativa entre dos ciclos consecutivos de

sorción-desorción. El sólido obtenido después de los ciclos de sorción-desorción mostró el mismo patrón de PXRD que el material de inicio, lo que indica que no hubo cambio en la forma después de este experimento. Estos datos indican que la forma cristalina **I'** no se convierte en una forma hidratada en presencia de agua. La forma cristalina **I'** sigue siendo no higroscópica y, por lo tanto, puede caracterizarse como anhidra, no higroscópica, o ambas.

La forma cristalina **I'** puede caracterizarse mediante la imagen de PLM en la Figura 5, que muestra esta forma como partículas en forma de plato, cristalinas, birrefringentes.

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 *in vitro* con el objeto de determinar la actividad inhibitoria de la neprilisina del Compuesto **I** y la forma cristalina **I'**. Se alcanzó un umbral de $pK_i \geq 9,0$. No obstante, también se realizaron experimentos *in vivo* adicionales a fin de predecir con mayor certeza el comportamiento del Compuesto **I** y la forma cristalina **I'** en un sujeto.

Con respecto al comportamiento *in vivo*, 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 baja depuración plasmática en todas las especies evaluadas, biodisponibilidad oral alta, potenciación favorable de la respuesta de guanósín monofosfato cíclico (cGMP) y depuración renal baja para aquellos sujetos cuya función renal está afectada.

Para la presente invención, se realizaron estudios farmacocinéticos orales e intravenosos especies de ratas, perros y monos a fin de determinar la biodisponibilidad oral del Compuesto **I**, es decir, la forma soluble del Compuesto **I'** (Ensayo 1). Este ensayo también se usó para determinar la tasa de depuración plasmática para estos compuestos; se cree que una tasa de depuración baja es predictiva de cuánto tiempo se espera que el compuesto permanezca en circulación, es decir, su estabilidad y persistencia *in vivo* sin identificar los procesos de eliminación individuales implicados.

Se realizaron estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en humanos para

determinar el nivel de inhibición de la neprilisina que se obtiene con el Compuesto **I** (Ensayo 3). En este ensayo, se midió el nivel de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El cGMP es una molécula efectora descendente de la unión del receptor del péptido natriurético y, por ende, sirve como biomarcador *in vivo* efectivo de la actividad del péptido natriurético. El nivel de cGMP se incrementa cuando se administra a un animal un inhibidor de neprilisina en comparación con placebo. Una forma de realización de la invención se refiere a un método para incrementar los niveles basales de péptido natriurético atrial (ANP) o cGMP en un sujeto con hipertensión, insuficiencia cardíaca o enfermedad renal, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**. Los niveles de ANP y cGMP se miden ya sea en orina o en plasma, o ambos, en un sujeto. En otra forma de realización, el nivel de ANP o cGMP se eleva al menos $\geq 1,1$ -veces; $\geq 1,2$ veces; $\geq 1,3$ veces; $\geq 1,4$ veces; $\geq 1,5$ veces; ≥ 2 veces; ≥ 3 veces; ≥ 4 veces; o ≥ 5 veces en un período de 24 horas en un sujeto cuando se administra una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o forma cristalina **I'**. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para incrementar la cantidad de guanosin monofosfato cíclico en el plasma de un humano, en donde el método comprende administrar al humano una forma de ácido libre cristalina de la invención. En un aspecto, la invención se refiere a disminuir la presión arterial en un humano, en donde el método comprende administrar al humano una cantidad que disminuye la presión arterial de una forma de ácido libre cristalina de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico.

La forma cristalina **I'**, que se disuelve en su forma soluble, el Compuesto **I**, en un sujeto, 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 sustratos peptídicos, puedan ser tratados al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o forma cristalina **I'**. Por ejemplo, al inhibir la NEP, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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.

Las 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 **I** en ratas, perros o monos así como también humanos tuvo lugar para evaluar la excreción de los riñones como vía de eliminación (Ensayos 2 y 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 realizaron determinaciones *in vivo* de la depuración plasmática, biodisponibilidad oral y excreción renal en múltiples especies animales. El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** exhibió actividad inhibitoria alta de la neprilisina humana, biodisponibilidad oral alta, depuración plasmática baja, potenciación incrementada de cGMP y excreción renal baja, que se espera provean una utilidad particular en el tratamiento de la enfermedad.

Enfermedades cardiovasculares

Al potenciar los efectos de los péptidos vasoactivos como los péptidos natriuréticos y bradiquinina, se espera que el Compuesto **I** y la forma cristalina **I'** encuentren 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, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (CTEPH, por sus siglas en inglés *Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension*), o hipertensión con estenosis de la arteria renal que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto I o la forma cristalina I'.

Para el tratamiento de hipertensión primaria, la cantidad terapéuticamente efectiva es típicamente la cantidad que es suficiente para disminuir la presión arterial del paciente. En un aspecto, la invención se refiere a disminuir la presión arterial en un humano, en donde el método comprende administrar al humano una cantidad que disminuye la presión arterial de una forma de ácido libre cristalina de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico. Esto incluiría el tratamiento tanto de hipertensión leve a moderada como de hipertensión severa. Cuando se usa para tratar la hipertensión, el Compuesto I o la forma cristalina I' 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 I o la forma cristalina I' se puede administrar en 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 la recaptación de la serotonina, y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular de la invención, el Compuesto I o la forma cristalina I' 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.

Para el tratamiento de la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, la cantidad terapéuticamente efectiva es típicamente la cantidad que es suficiente para disminuir la presión arterial en las arterias pulmonares independientemente de que se haya formado o no un embolismo pulmonar en un sujeto.

Asimismo, para el tratamiento de la hipertensión con estenosis de la arteria renal, la cantidad terapéuticamente efectiva es típicamente la cantidad que es suficiente para disminuir la presión arterial. Para los sujetos que padecen estenosis arterial renal, las arterias se estrechan debido a la aterosclerosis. Esto a su vez hace que el cuerpo registre menos sangre que alcanza los riñones, interpretando esto como una baja en la presión arterial, lo que a su vez señala una liberación de las hormonas para subir la presión arterial. Con el tiempo, eso puede conducir a una insuficiencia renal.

Otra forma de realización de la invención se refiere a un método para tratar 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 **I** o la forma cristalina **I'**. 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 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 se administra como una forma farmacéutica intravenosa. Cuando se usa para tratar insuficiencia cardíaca, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, tales 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** 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.

Diarrea

Como inhibidor de la NEP, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 Diseases* 24:47-58; y Marçais-Collado (1987) *Eur. J. Pharmacol.* 144(2):125-132. Cuando se usa para tratar diarrea, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** puede combinarse con uno o más agentes antidiarreicos adicionales.

Enfermedades renales

Al potenciar los efectos de los péptidos vasoactivos como los péptidos natriuréticos y la bradiquinina, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 insuficiencia renal. Las 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). Otras enfermedades renales de particular interés incluyen síndrome nefrótico, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS, por sus siglas en inglés *Focal Segmental Glomerulosclerosis*) y enfermedad renal poliquística (PKD, por sus siglas en inglés *Polycystic Kidney Disease*).

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 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*) $<60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ durante ≥ 3 meses, la etapa de la enfermedad puede asignarse de acuerdo con la clasificación KDOQI CKD. Éstas incluyen *Etapa 1* (daño en los riñones con GFR normal o incrementada): $\text{GFR} \geq 90$; *Etapa 2* (daño en los riñones con GFR disminuida leve): $\text{GFR } 60\text{-}89$; *Etapa 3* (GFR disminuida moderada): $\text{GFR } 30\text{-}59$; *Etapa 4* (GFR disminuida severa): $\text{GFR } 15\text{-}29$; y *Etapa 5* (insuficiencia renal): $\text{GFR} < 15$ (o diálisis). La GFR se define en unidades de mL/min/1,73 m^2 .

Una forma de realización incluye un método para tratar un sujeto que padece de insuficiencia renal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**. 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 **I** o la forma cristalina **I'** se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores AT_1 , 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 Glomerular Filtration Rate*) de entre $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ y $15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o forma cristalina **I'**. 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 $\geq 90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ (Etapa 1) o una eGFR de $< 15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ (Etapa 5), que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**. A los efectos de esta invención, la enfermedad renal severa puede clasificarse como una eGFR de $< 30 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. 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 **I** o la forma cristalina **I'**.

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 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

Al potenciar los efectos de los péptidos natriuréticos, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** puede combinarse con uno o más agentes antiglaucoma adicionales.

Alivio del dolor

Como inhibidor de la NEP, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** inhiba la degradación de las encefalinas endógenas y, por ende, dicho compuesto también puede encontrar utilidad como analgésico. 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 **I** o la forma cristalina **I'** 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, 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 **I** o la forma cristalina **I'** sea útil como agente antitussivo, así como también que encuentre utilidad en el tratamiento de hipertensión portal asociada con cirrosis hepática (véase Sansoe y 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 inclusión de disfunción eréctil masculina y trastorno de excitación sexual femenina. Más específicamente, se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** sea útil 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 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 antagonistas de los receptores de estrógenos, andrógenos, y estrógenos. Debido a su propiedad de inhibición de la NEP, también se espera que el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'** sea útil para brindar protección contra el deterioro de la función nerviosa causado por la diabetes o la obesidad inducida por la dieta.

La cantidad del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 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,

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 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** en 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 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.

El Compuesto **I** también encuentra utilidad como intermediario útil para la preparación de formas cristalinas del Compuesto **I**, incluyendo, por ejemplo, la forma cristalina **I'**

Herramientas de investigación

Como el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** posee actividad de inhibición de la enzima NEP, también es 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 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 mamífero es inhibida al administrar una cantidad inhibitoria de la NEP del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**.

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 **I** o la forma cristalina **I'**. Después de que el sistema biológico o la muestra biológica se expone al compuesto, los efectos de inhibición de la enzima NEP se 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 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 determinación implicará determinar los efectos de la inhibición de la enzima NEP.

En forma adicional, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'** se usa como un estándar en un ensayo para permitir la comparación de los resultados obtenidos con un compuesto de ensayo y con el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'** a fin de identificar aquellos compuestos de ensayo que tienen las propiedades deseadas; por 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** 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 comprende: (a) poner en contacto el sistema biológico o la muestra biológica con el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**; y (b) determinar los efectos causados por el compuesto sobre el sistema biológico o la muestra biológica.

COMPOSICIONES Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'** se 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 **I** o la forma cristalina **I'**, (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

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 **I** o la forma cristalina **I'**. La composición puede contener otros agentes terapéuticos y/o agentes de formulación, si se desea. Cuando se describen las composiciones, el “Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**” también 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 el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**, así como también sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente contienen una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**. 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 0,01-99% en peso de agente activo, 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 10-99% en peso, o de aproximadamente 50-99% 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 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 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 comprender el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** y estearato de magnesio en una relación de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1 del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** respecto del estearato de magnesio. Otras relaciones del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** al estearato de magnesio incluyen, a modo no taxativo, 1:1, 5:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 y 50:1. En otra forma de realización, la cantidad del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** respecto del estearato de magnesio puede expresarse como % en peso. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender 99% en peso del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** y 1% en peso de estearato de magnesio. En otra forma de realización, la relación en peso del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** al estearato de magnesio se encuentra entre 85:15 y 99:1, respectivamente. En una forma de realización preferida, la relación en peso del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** al estearato de magnesio se encuentra entre 95:5 y 99:1, preferentemente 99:1.

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.

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 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 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 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 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 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, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético, 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 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** en una cápsula, comprimido, líquido o suspensión. Otra forma de realización de la invención se refiere a una forma farmacéutica oral en donde la liberación del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 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, 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 modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires 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, etil acetato, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, 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 tetrahidrofurílico, 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 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 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 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. 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 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 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** y las composiciones que los 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 **I** o la forma cristalina **I'** será típicamente diluido en aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 10 mL del portador acuoso por mg del Compuesto **I** o la forma cristalina **I'**; 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 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 **I** o la forma cristalina **I'** en una solución tampón.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'** también se puede administrar por vía transdérmica usando excipientes y sistemas de suministro transdérmico conocidos. Por ejemplo, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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.

Agentes secundarios

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** 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 **I** o la forma cristalina **I'**. Por 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 AT_1 y antagonistas de los receptores AT_1 /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, antagonistas de los receptores mineralocorticoides, 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 (por ej., PDE5 y PDE9), 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 ciclase 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 **I** o forma cristalina **I'**, 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 **I** o forma cristalina **I'**, un segundo agente activo, y un portador farmacéuticamente aceptable. Es posible incluir terceros, cuartos, etc., agentes activos en la composición. En la terapia combinada, la cantidad del Compuesto **I** o forma cristalina **I'** que es administrada, así como también la cantidad de agentes secundarios, puede ser menor a la cantidad típicamente administrada en monoterapia.

El Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se puede mezclar físicamente con el segundo agente activo para formar una composición que contiene ambos agentes; o cada agente puede estar presente en composiciones separadas y distintas que se administran al paciente en forma simultánea o en momentos separados. Por ejemplo, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se puede combinar con un segundo agente activo usando equipos y

procedimientos convencionales para formar una combinación de agentes activos que comprende el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** y un segundo agente activo. En forma adicional, los agentes activos pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica que comprende el Compuesto **I** o forma cristalina **I'**, 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 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 en momentos separados, el agente secundario típicamente se administra menos de 24 horas después de la administración del Compuesto **I** o forma cristalina **I'**, 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** o en algún momento posterior predeterminado (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 **I** o forma cristalina **I'**. 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 comprende el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 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 **I** o forma cristalina **I'** de la invención. El agente secundario puede estar en forma de sal farmacéuticamente 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de adenosina, cuyos ejemplos representativos incluyen naxifilina, rolofilina, SLV-320, teofilina y tonapofilina.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antagonista de los receptores α -adrenérgicos, cuyos ejemplos representativos incluyendo xazosina, prazosina, tamsulosina y terazosina.

El Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 μg por dosis.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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).

El Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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, 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.

En otra forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 *(4S,7S,12bR)*-7-[3-metil-2(*S*)-sulfanilbutiramido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidropirido[2,1-a][2]-benzazepina-4-carboxílico); AVE-7688 (ilepatril) y su compuesto madre; BMS-182657 (ácido 2-[2-oxo-3(*S*)-[3-fenil-2(*S*)-sulfanilpropionamido]-2,3,4,5-tetrahidro-1H-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 *(4S,7S,12bR)*-7-[2(*S*)-(2-morfolinoacetil)-3-fenilpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidropirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico); MDL-101287 (ácido *[4S-[4 α ,7 α (*R**),12b β]]*-7-[2-(carboximetil)-3-fenilpropionamido]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidropirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico); omapatrilat; RB-105 (N-[2(*S*)-(mercaptometil)-3(*R*)-fenilbutil]-L-alanina); sampatrilat; SA-898 ((*2R,4R*)-N-[2-(2-hidroxifenil)-3-(3-mercaptopropionil)tiazolidin-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, fasidotrilato, omapatrilat, sampatrilat, y combinaciones de los mismos.

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

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con 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 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.

En otra forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 salsalicilato de bismuto.

En otra forma de realización más, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 cevimelina y DMXB-anabaseína; compuestos de epinefrina; mióticos tales como pilocarpina; y análogos de prostaglandina.

En otra forma de realización más, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un agente antilipídico, cuyos ejemplos incluyen: inhibidores de proteínas de transferencia de éster de colesterol (CETPs, por sus 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 **I** o forma cristalina **I'** 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.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antagonista de los receptores AT_1 , 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), bencilosartán, candesartán, candesartán cilexetilo, elisartán, embusartán, enoltasosartán, eprosartán, EXP3174, fonsartán, forasartán, glicilosartán, irbesartán, isoteolina, losartán, medoximilo, milfasartán, olmesartán (por ej., olmesartán medoxomilo), opomisartán, pratosartán, 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, 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 **I** o forma cristalina **I'** también se puede administrar en combinación con un agente de 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.

El Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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 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 **I** o forma cristalina **I'** 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, 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, 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 triclormetiazida; 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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, reboksetina, 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, demetilertralina; 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 y colaboradores (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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 (*3S*,*2'R*)-3-{1-[2'-(etoxicarbonil)-4'-fenilbutil]-ciclopentan-1-carbonilamino}-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-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*)-(1H-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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), cuyos ejemplos incluyen: acemetacina, ácido acetil salicílico, alclofenac, alminoprofeno, amfenac, amiprilosa, aloxiprina, anirolac, apazona, azapropazona, benorilato, benoxaprofeno, bezpiperilona, broperamol, ácido buclóxico, carprofeno, clidanac,

diclofenac, diflunisal, diftalona, enolicam, etodolac, etoricoxib, fenbufeno, fenclofenac, ácido fenclozico, fenoprofeno, fentiazac, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, furofenac, ibufenac, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, isoxepac, isoxicam, ketoprofeno, ketorolac, lofemizol, 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, 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de N-metil d-aspartato (NMDA), cuyos ejemplos incluyen amantadina, dextrometorfano, dextropropoxifeno, ketamina, ketobemidona, memantina, metadona, y otros.

En otra forma de realización adicional, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** 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, butorfanol, codeína, dihidrocodeína, fentanilo, hidrocodona, hidromorfona, levalorfanol, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, nalbufina, nalmeveno, 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE); particularmente, un inhibidor de PDE-V. Los inhibidores de PDE-V representativos incluyen avanafil, lodenafil, mirodenafil, sildenafil (Revatio®), tadalafil (Adcirca®), vardenafil (Levitra®), y udenafil.

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

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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina (SSRI), cuyos ejemplos incluyen: 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un 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 **I** o forma cristalina **I'** 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 **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un estimulador o activador de guanilato ciclasa soluble, cuyos ejemplos incluyen ataciguat, riociguat, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antidepresivo tricíclico (TCA), cuyos ejemplos incluyen amitriptilina, amitriptilinoxido, butriptilina, clomipramina, demexiptilina, desipramina, dibencepina,

dimetacrina, dosulepina, doxepina, imipramina, imipraminóxido, lofepramina, melitraceno, metapramina, nitroxazepina, nortriptilina, noxiptilina, pipofezina, propizepina, protriptilina, quinupramina, y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el Compuesto **I** o forma cristalina **I'** se administra en combinación con un antagonista de los receptores de la vasopresina, cuyos ejemplos incluyen conivaptán y 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 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, todos ellos también se pueden usar con el Compuesto **I**. 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 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 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

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** (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 **I** o la forma cristalina **I'** (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 resultante se carga en una cápsula de gelatina (400 mg de composición por cápsula).

En forma alternativa, el Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** (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).

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

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** (50 mg o 100 mg) se carga directamente en una cápsula de HPMC.

Formulación de comprimido de ejemplo para administración oral

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** (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 **I** o la forma cristalina **I'** (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 **I** o la forma cristalina **I'** (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 **I** o la forma cristalina **I'** (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 **I** o la forma cristalina **I'** por 10 mL de suspensión:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto I o forma cristalina I'	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g
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

Ingredientes	Cantidad
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 **I** o la forma cristalina **I'** (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 NaHCO_3 al 5%, con o sin ciclodextrina.

Formulación parenteral iv de ejemplo para administración por inyección

El Compuesto **I** o la forma cristalina **I'** (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:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto activo I o I'	10 a 1000 mg
Excipientes (por ej., dextrosa)	0 a 50 g
Agua para solución de inyección	10 a 100 mL

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

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 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

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

Ingredientes	Cantidad
Compuesto activo I o I'	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 **I** o **I'** 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 **I** o **I'**) 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 **I** o **I'** (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 **I** o **I'** 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 aspersion 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 **I** o **I'** (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, 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 **I** o **I'** por dosis.

EJEMPLOS

Las siguientes Esquemas de Reacción/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 lo contrario, y cualesquiera otras abreviaturas usadas en la presente y no definidas tienen su significado estándar, generalmente aceptado, a saber:

ACN	=	acetonitrilo
CPME	=	ciclopentil metil éter
d	=	día(s)
DCC	=	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	=	díclorometano o cloruro de metileno
DIPE	=	diisopropil éter
DIPEA	=	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	=	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EDTA	=	ácido etilenediaminotetraacético
EtOH	=	etanol
EtOAc	=	etil acetato
g	=	gramo(s)
h	=	hora(s)
H ₂	=	gas hidrógeno
H ₂ O ₂	=	peróxido de hidrógeno
HCTU	=	2-(6-cloro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato(V)
HATU	=	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio hexafluorofosfato
HCl	=	cloruro de hidrógeno
NaBH ₄	=	borohidruro de sodio

NaCl	=	cloruro de sodio
NaHCO ₃	=	bicarbonato de sodio
Na ₂ CO ₃	=	carbonato de sodio
NaHMDS	=	bis(trimetilsilil)amida de sodio o hexametildisilazida de sodio
NaOH	=	hidróxido de sodio
Na ₂ SO ₄	=	sulfato de sodio
NH ₄ Cl	=	cloruro de amonio
NMM	=	n-metilmorfolina
MeI	=	metil yoduro
MeOH	=	metanol
min	=	minuto(s)
MgSO ₄	=	sulfato de magnesio
Pd(PPh ₃) ₄	=	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
Pd/C	=	paladio sobre carbono activado, carga de 10%
PE	=	éter de petróleo
SiO ₂	=	dióxido de silicio o sílice
TFA	=	ácido trifluoroacético
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.

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. Las condiciones de HPLC analíticas representativas son las siguientes:

A. Condiciones de HPLC analítica – Método A

Instrumento	Agilent 1260 HPLC
Columna	Advance Material Technology HALO®; 150 x 4,60 mm; 2,7 micrones
Temperatura de columna	30 °C
Caudal	1,0 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Preparación de muestra	Disolver en 1:1 ACN:agua
Fases móviles	A = Agua:ACN:TFA (98:2:0,1) B = Agua:ACN:TFA (30:70:0,1)
Longitud de onda de detector	254 nm
Gradiente	22 min total Tiempo (min)/% B: 0/30, 15/100, 18/100, 20/30, 22/30

B. Condiciones de HPLC analítica – Método B

Instrumento	Agilent 1260 HPLC
Columna	Agilent Zorbax-Bonus RP-C18; 150 x 4,6 mm; 3,5 micrones
Temperatura de columna	40 °C
Caudal	1,5 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Preparación de muestra	Disolver en 1:1 ACN:1 M HCl
Fases móviles	A = Agua:TFA (99,95:0,05) B = ACN:TFA (99,95:0,05)
Longitud de onda de detector	254 nm y 214 nm

Gradiente	26 min total Tiempo (min)/% B: 0/5, 18/90, 22/90, 22,5/90, 26/5
-----------	--

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 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 $\text{Cu-K}\alpha$ 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 DiffracSuite 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 que algunos picos no se vean en algunos patrones de difracción debido a la orientación preferida extensiva.

Calorimetría 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 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 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ desde 0°C hasta 250°C .

Análisis termogravimétrico

Las mediciones del análisis termogravimétrico (TGA) se realizaron 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 tasa de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ de temperatura ambiente a 300°C . Las cámaras de balanza y horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante el uso.

Microscopía de luz polarizada

Para los estudios con microscopio de luz polarizada (PLM, *Polarized Light Microscope*), las muestras fueron examinadas bajo un microscopio óptico (Olympus BX51) 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.

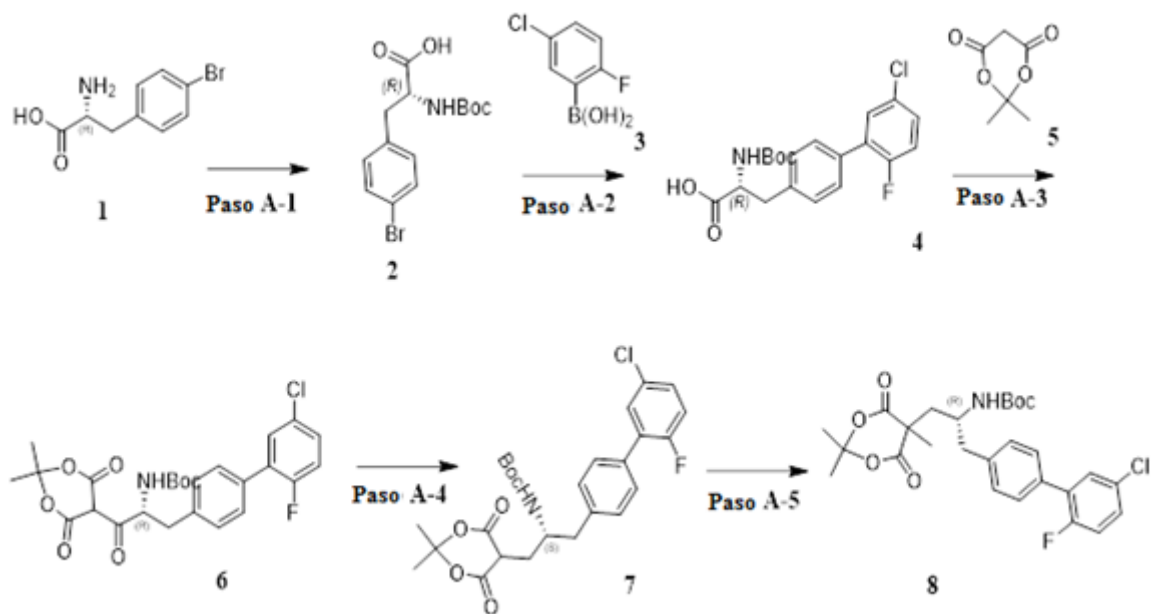
Evaluación de sorción dinámica de humedad

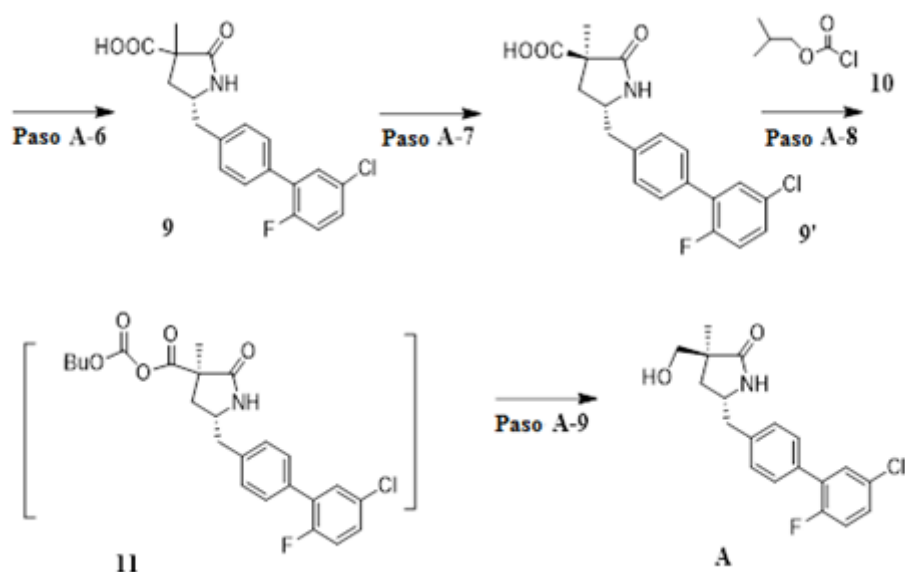
Las mediciones de DMS se realizaron usando una microbalanza atmosférica VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra pesada, y la humedad se encontraba al menor valor posible (cerca del 0% de humedad relativa) al inicio del análisis. El análisis de DMS consistió en una tasa 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.

Esquemas de reacciones sintéticas

La (3*S*, 5*R*)-5-[[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]metil]-3-(hidroximetil)-3-metilpirrolidin-2-ona (**A**) que se emplea en esta invención se puede preparar a partir de materiales iniciales y reactivos usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y como se ilustra en el **Esquema A**:

Esquema A





Los pasos generales de la reacción del **Esquema A** son los que siguen. El grupo amina del Compuesto **1** es primero protegido al disolver el Compuesto **1** en solvente con una base acuosa bajo atmósfera inerte a baja temperatura seguido de la adición de un agente de protección de amina en solvente a temperatura ambiente antes del aislamiento. Se puede usar una equivalencia molar de aproximadamente 1:2:1 de Compuesto **1** a base a agente de protección de amina. Los solventes que se pueden usar para la reacción del Compuesto **1** con el agente de protección de amina incluyen, mas no se limitan a, solventes apróticos polares, tales como acetonitrilo. Las bases incluyen, mas no se limitan a, bases fuertes que incluyen LiOH, NaOH, y KOH. Las temperaturas bajas típicamente son iguales o inferiores a -10 °C.

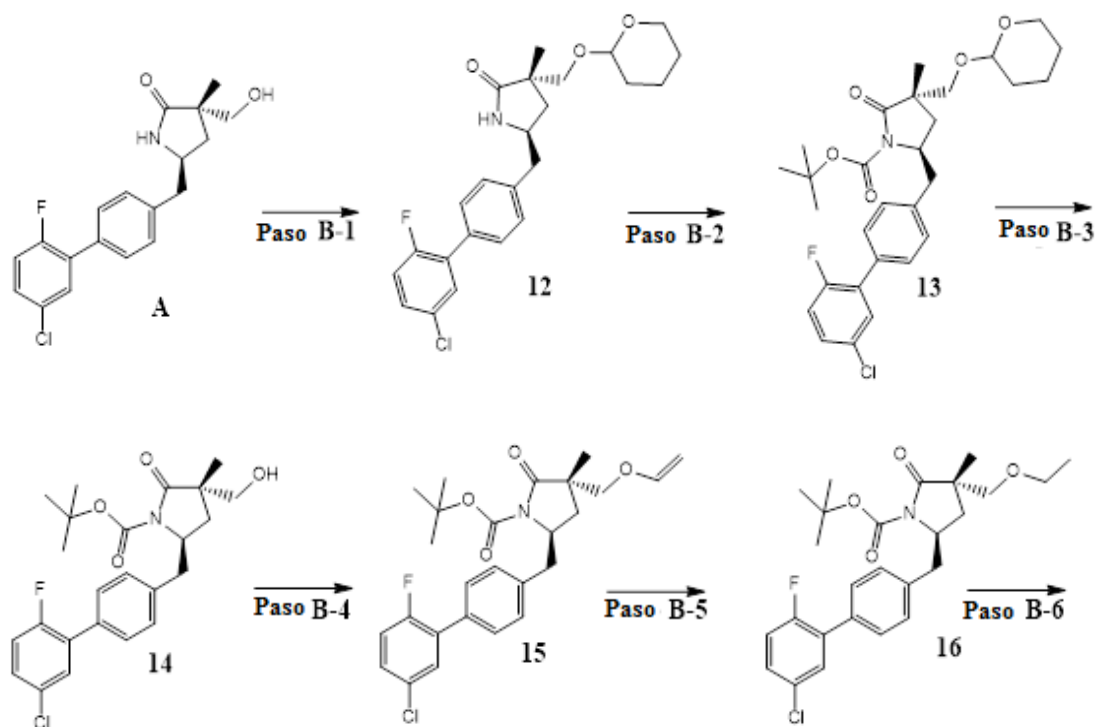
El Compuesto **2** es copulado luego con **3** en solvente con la adición de un compuesto anfotérico, por ej., NaHCO₃ en agua, y un catalizador tal como Pd(PPh₃)₄ bajo atmósfera inerte. Esto genera el derivado **4** que luego se hace reaccionar con **5** en un solvente aprótico con un catalizador aprótico bajo atmósfera inerte. Un agente de copulación peptídico se usa adicionalmente para formar el compuesto **6**. El compuesto **6** se coloca luego en solvente con ácido débil bajo atmósfera inerte y se agrega un agente reductor a baja temperatura (igual o menos de -5 °C). Esta mezcla se deja agitar durante varias horas antes de detenerse con salmuera. El Compuesto **7** es luego aislado mediante extracción con una solución de una base débil y secado con agente de secado antes de concentrarse bajo vacío.

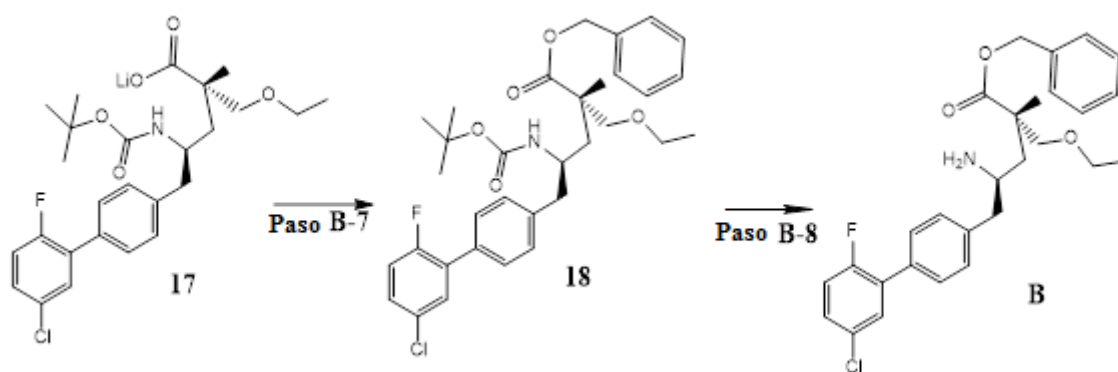
El Compuesto **7** es luego metilado en un solvente aprótico con base débil usando un agente de metilación tal como MeI. El sólido formado es aislado y luego disuelto en

solvente antes de secarse con un agente de secado y concentrarse bajo vacío para obtener el compuesto **8**. El Compuesto **8** se hace reaccionar luego con ácido en un solvente éter para obtener el compuesto **9**, que luego es concentrado y lavado con solvente adicional para obtener el compuesto **9'**. El Compuesto **9'** se coloca luego bajo atmósfera inerte en un solvente aprótico polar y se hace reaccionar **10** a baja temperatura ($< -5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para obtener el compuesto intermediario **11**. El Compuesto **A** se forma al hacer reaccionar **11** con una base orgánica seguido de la reacción con **10** a baja temperatura y reducción con un agente reductor.

El (2*S*,4*R*)-bencil 4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato (**B**) que se emplea en esta invención se puede preparar a partir del material inicial (**A**) formado previamente y los reactivos, usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 2 y tal como se ilustra en el **Esquema B**:

Esquema B





Los pasos de reacción generales en el **Esquema B** son los que siguen. El Compuesto **A** se hace reaccionar primero con 3,4-dihidro-2H-pirano en un solvente que contiene un ácido antes de la neutralización y el aislamiento. La mezcla cruda resultante se coloca en un solvente éter y se agita a baja temperatura para formar una suspensión. La suspensión adicionalmente se enjuaga, se seca y se concentra para formar el aceite viscoso **12** antes de proteger el nitrógeno del anillo con di-*ter*-butil dicarbonato para formar **13** bajo condiciones estándares. El grupo éter en **13** es adicionalmente escindido con un ácido fuerte para formar un grupo alcohol tal como se ilustra en **14**. El Compuesto **14** se hace reaccionar luego con etil vinil éter mediante la adición de un ligando orgánico heterocíclico, por ej., 1,10-fenantrolina, en una atmósfera inerte, seguido de la adición de catalizador metálico, por ej., catalizador de paladio. El grupo alqueno en el producto purificado **15** es reducido usando, por ej., H₂ y 10% Pd/C, para obtener **16**. La apertura del anillo de la pirrolidona (saponificación) en **16** se logra con una base acuosa antes de la purificación y el aislamiento para obtener el compuesto **17**. El grupo carboxilato en **17** es adicionalmente protegido, por ej., con bromuro de bencilo, bajo condiciones estándares para formar **18**. Esto se efectúa antes de desproteger el grupo amina de **18** para formar el compuesto **B**.

Tal como se analizó previamente, las condiciones de reacción de ejemplo para los **Esquemas A y B** se describen a continuación en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente.

EJEMPLO 1

Síntesis de (3*S*,5*R*)-5-[[4-(5-Cloro-2-fluorofenil)fenil]metil]-3-(hidroximetil)-3-metilpirrolidin-2-ona (**A**)

Paso A-1:

Una solución de ácido (2*R*)-2-amino-3-(4-bromofenil)propanoico (**1**) (3300 g, 13,52 mol) en acetonitrilo (46,2 L) se colocó en un reactor de 250 L que se purgó y se mantuvo con una atmósfera inerte de nitrógeno. Una solución de NaOH (1081 g, 27,02 mol) en agua (46,2 L) se agregó en varios lotes a -10 °C. Esto fue seguido de la adición de una solución de di-*ter*-butil dicarbonato (2948 g, 13,51 mol) en ACN (6,6 L). La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente y se concentró adicionalmente bajo vacío. Esta solución resultante se diluyó con 45 L de agua/hielo y el valor del pH de la solución se ajustó a pH 2 con HCl 1N. La solución resultante se extrajo luego con 3x50 L de DCM y las capas orgánicas se combinaron. La mezcla resultante se lavó con 1x50 L de salmuera y se secó en MgSO₄ anhidro y se concentró bajo vacío. Esto generó 3720 g (80%) de ácido (2*R*)-3-(4-bromofenil)-2-[[(*ter*-butoxi)carbonil] amino]propanoico (**2**) como sólido blanco.

Paso A-2:

Una solución de ácido (2*R*)-3-(4-bromofenil)-2-[[(*ter*-butoxi)carbonil]amino]propanoico (**2**) (530 g, 1,54 mol) en dioxano (9,54 L), ácido (5-cloro-2-fluorofenil) borónico (**3**) (348 g, 2,00 mol), una solución de Na₂CO₃ (228 g, 2,15 mol) en agua (1,06 L), y Pd(PPh₃)₄ (8,89 g, 7,69 mmol) se colocó en un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 20 L que se purgó y se mantuvo con una atmósfera inerte de nitrógeno. La solución resultante se calentó a reflujo durante 2,5 h en un baño de aceite y luego se enfrió a temperatura ambiente con un baño de agua/hielo. La solución resultante se diluyó con 15 L de EtOAc y se lavó con 1x5 L de HCl 1N y 4x5 L de salmuera. Los extractos orgánicos combinados se secaron en MgSO₄ anhidro y concentraron bajo vacío. El residuo se lavó con 2x1 L de PE. Esto generó 510 g (84%) de ácido (2*R*)-2-[[(*ter*-butoxi)carbonil]amino]-3-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]propanoico (**4**) como aceite marrón.

Paso A-3:

Una solución de ácido (2*R*)-2-[[(*ter*-butoxi)carbonil]amino]-3-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]propanoico (**4**) (510 g, 1,29 mol) en DCM (5000 mL), 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (**5**) (205 g, 1,42 mol), y 4-dimetilaminopiridina (237 g, 1,94 mol) se colocó en un 10 L matraz de fondo redondo de 4 cuellos purgado y mantenido con una

atmósfera inerte de nitrógeno. Esto fue seguido de la adición de una solución de DCC (294 g, 1,43 mol) en DCM (600 mL) a gotas con agitación a -10 °C. La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente y los sólidos fueron extraídos por filtración. El producto filtrado se lavó con HCl 1 N (2 L) y salmuera (3 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron en MgSO₄ anhidro y los sólidos fueron extraídos por filtración. El producto filtrado, *ter*-butil N-[(2*R*)-3-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-1-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)-1-oxopropan-2-il]carbamato (**6**), se usó directamente en el siguiente paso sin purificación adicional.

Paso A-4:

Una solución de *ter*-butil N-[(2*R*)-3-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-1-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)-1-oxopropan-2-il]carbamato (**6**) en DCM (7 L) y AcOH (600 mL) se colocó en un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 20 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Esto fue seguido de la adición de NaBH₄ (88,8 g, 2,35 mol) en varios lotes a -5 °C. La solución resultante se agitó durante 3 h a -5 °C en un baño de hielo/sal y luego detenido por la adición de 1 L de salmuera a gotas. La solución resultante se diluyó con 2 L de salmuera y se lavó con 2x2 L de agua y 1x1 L de Na₂CO₃ y 1x2 L de salmuera. Los extractos orgánicos combinados se secaron en MgSO₄ anhidro y concentrados bajo vacío. Esto generó 520 g (79%) de *ter*-butil N-[(2*S*)-1-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-3-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)propan-2-il]carbamato (**7**) como aceite amarillo.

Paso A-5:

Una solución de *ter*-butil N-[(2*S*)-1-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-3-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)propan-2-il]carbamato (**7**) (520 g, 1,03 mol) en acetona/DMF (1:1) (5,2 L), Na₂CO₃ (163 g, 1,54 mol), y MeI (219 g, 1,54 mol) se colocó en un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 10 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente y luego se diluyó con 15 L de agua. Después de agitarse durante 1 h, los sólidos se recogieron por filtración. El residuo se disolvió en 5 L de DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron en MgSO₄ anhidro y se concentraron bajo vacío. Esto generó 520 g (97%) de *ter*-butil N-[(2*R*)-1-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-3-(2,2,5-trimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)propan-2-il]carbamato (**8**) como aceite amarillo.

il)propan-2-il]carbamato (**8**) como sólido amarillo.

Pasos A-6 y A-7:

Una solución de ter-butil N-[(2R)-1-[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]-3-(2,2,5-trimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)propan-2-il]carbamato (**8**) (520 g, 1,00 mol, 1,00 equiv) en CPME (2,6 L) se colocó en un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 10 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Esto fue seguido de la adición de HCl/CPME (4N) (2,6 L) a -5 °C. La solución resultante se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla resultante se concentró a la mitad del volumen bajo vacío. Los sólidos se recogieron por filtración, y se lavaron adicionalmente con EtOAc/DIPE (1:2). Esto generó 220 g (61%) de ácido (3R,5R)-5-[[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]metil]-3-metil-2-oxopirrolidina-3-carboxílico (**9'**) como sólido blancuzco.

Pasos A-8 y A-9:

Una solución de ácido (3R,5R)-5-[[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]metil]-3-metil-2-oxopirrolidina-3-carboxílico (**9'**) (218 g, 602,55 mmol) en THF (4 L), NMM (170 g, 1,68 mol) se colocó en un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 10 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno. Esto fue seguido de la adición de 2-metilpropil cloroformato (164,4 g, 1,20 mol) a gotas con agitación a -5 °C. La solución resultante se agitó durante 20 minutos adicionales a -5 °C en un baño de hielo/sal. Una solución de NaBH₄ (91,5 g, 2,42 mol) en agua (400 mL) se agregó adicionalmente a gotas con agitación a -5 °C y se agitó durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. La reacción se detuvo luego mediante la adición a gotas de 2,6 L de HCl 1N. La mezcla resultante se agitó adicionalmente durante 1 h y luego se concentró bajo vacío para extraer el THF. La mezcla residual se agitó luego durante otra 1 h, y luego los sólidos se recogieron por filtración. El sólido se lavó con agua, se disolvió en THF, se secó en Na₂SO₄ anhidro y se concentró bajo vacío. Esto generó 170 g (81%) de (3S,5R)-5-[[4-(5-cloro-2-fluorofenil)fenil]metil]-3-(hidroximetil)-3-metilpirrolidin-2-ona (**A**) como sólido blanco.

EJEMPLO 2

Síntesis de (2S,4R)-Bencil 4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato (**B**)

Paso B-1:

En un matraz de fondo redondo encamisado de 5000 mL, se agregaron (3*S*,5*R*)-5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-(hidroximetil)-3-metilpirrolidin-2-ona (**A**) (121,0 g, 348 mmol) y DCM (2420 mL) para obtener una solución clara homogénea que luego se enfrió a 0 °C con agitación. Se agregaron 3,4-dihidro-2H-pirano (71,0 mL, 783 mmol) y ácido 4-metilbencenosulfónico (20,97 g, 122 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 18,5 °C toda la noche para alcanzar >98% de conversión. La mezcla de reacción se detuvo luego con 2420 mL de NaHCO₃ saturado, las fases se separaron lentamente, la capa orgánica se secó en sulfato de sodio, se filtró, y se extrajo el solvente. La mezcla cruda se colocó luego en DIPE (1815 mL) con agitación a 21 °C en 1 h, luego se enfrió y se agitó a 0-5 °C en 5 h para obtener una suspensión blanca. La suspensión se filtró y se enjuagó con 1X volumen de DIPE frío (0 °C) y se filtró. Los sólidos resultantes se secaron toda la noche para obtener 113,8 g; 99,1% pureza por HPLC. El producto filtrado se secó adicionalmente para obtener un aceite espeso que pesaba 24 g. Se agregó DIPE (96 mL) y la mezcla se agitó toda la noche a 0-5 °C para obtener (3*S*,5*R*)-5-((5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-3-(((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)pirrolidin-2-ona (**12**).

Paso B-2:

En un matraz de fondo redondo encamisado de 5000 mL, se agregaron (3*S*,5*R*)-5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-3-(((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)pirrolidin-2-ona (**12**) (113,8 g, 263 mmol) y THF (1707 mL) con agitación para obtener una solución clara homogénea que se purgó con nitrógeno y se enfrió a -10 °C. Se agregó NaHMDS 1M en THF (290 mL, 290 mmol) a gotas a una temperatura por debajo de 0 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se disolvió di-*ter*-butil dicarbonato (69,0 g, 316 mmol) mediante adición a gotas en 3 veces su volumen en volumen en THF (207 mL) a una temperatura por debajo de 10 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C toda la noche y se detuvo con una solución de cloruro de amonio al 20% (2731 mL). Se agregó EtOAc (1821 mL) y las fases se separaron en una capa acuosa (pH 9) y una capa orgánica. La capa orgánica se lavó con salmuera (2731 mL) y las fases se separaron nuevamente en una fase acuosa (pH 7) y una capa orgánica, donde la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ antes de la filtración. Se extrajo el solvente, formando un aceite espeso. Después del secado adicional toda la noche, se produjo un sólido que

contenía espuma de (3*S*,5*R*)-*ter*-butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-2-oxo-3-(((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato (**13**) (146,5 g, 275 mmol, 105% de rendimiento, 98,76% de pureza).

Paso B-3:

Se agregaron (3*S*,5*R*)-*ter*-butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-2-oxo-3-(((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato (**13**) (146,5 g, 275 mmol) y MeOH (1465 mL) a un matraz de fondo redondo de 3000 mL. Se agregó adicionalmente ácido 4-metilbencenosulfónico, H₂O (3,93 g, 20,65 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 16 h para alcanzar >97% de conversión. A la reacción completada, se agregó EtOAc (2930 mL) seguido de destilación, con una temperatura de baño inferior a 30°C, para alcanzar una reducción del volumen total a aproximadamente 293 mL. A la solución concentrada, se agregó nuevamente EtOAc (2930 mL) y se destiló hasta aproximadamente 293 mL. Se completó un lavado final al agregar EtOAc (2930 mL) y se destiló a un volumen final de 1465 mL para extraer completamente cualquier metanol residual. El ácido remanente se detuvo al lavar el volumen final superior (1465 mL) con EtOAc que contenía NaHCO₃ al 10% (1465 mL) con agitación en 30 min a una temperatura ≤ 21 °C. Las capas se dejaron separar al detener la agitación (capa acuosa pH~7). La capa orgánica se lavó con 1465 mL de salmuera y se dejó separar (capa acuosa pH=7). La capa de etil acetato se secó bajo vacío ~146,5 mL antes de agregar lentamente 1465 mL de hexanos al punto de enturbamiento. La solución se dejó asentar durante 1 h seguido de la adición de 1465 mL de hexanos. La mezcla se agitó toda la noche a 0 °C y los sólidos se filtraron y se lavaron con 293 mL de hexanos. Los sólidos restantes se secaron toda la noche bajo alto vacío para obtener 98,4 g de (3*S*,5*R*)-*ter*-Butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-(hidroximetil)-3-metil-2-oxopirrolidina-1-carboxilato (**14**); 80% de rendimiento; 99,3% de pureza por HPLC.

Paso B-4:

Se agregaron (3*S*,5*R*)-*ter*-butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-(hidroximetil)-3-metil-2-oxopirrolidina-1-carboxilato (**14**) (118,2g, 264 mmol) y DCM (591 mL) a un matraz de fondo redondo de 100 mL para formar una solución incolora. Se agregó etil vinil éter (761 mL, 7916 mmol) y 1,10-fenantrolina (4,76 g, 26,4 mmol) al recipiente y se purgó N₂, seguido de la adición de acetato de Pd(II) (8,89 g, 39,6 mmol).

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h para alcanzar ~81% de conversión. El solvente se extrajo por rotoevaporación para formar un producto crudo que fue purificado mediante cromatografía en columna. La columna fue pre-acondicionada con 100% de hexanos y el producto crudo (30 g/corrida) se disolvió en DCM y se cargó en 300 g de una columna empacada con gel de sílice. Se usó un gradiente isocrático de 40% de etil acetato/hexanos para eluir el compuesto, formando 91,25 g de (3*S*,5*R*)-*ter*-Butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-2-oxo-3-((viniloxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato purificado (**15**).

Paso B-5:

Se disolvió (3*S*,5*R*)-*ter*-butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-metil-2-oxo-3-((viniloxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato (**15**) (185 g, 390 mmol) en THF (1900 mL) y se agregó ácido acético (11,17 mL) seguido de purga con N₂ en 10 min. La mezcla luego se burbujeó con H₂ y se agregó Pd/C al 10% (o 18,5 g). Una purga lenta con H₂ (gas) continuó toda la noche a 22 °C hasta que la reacción se completó según se midió a través de HPLC. La mezcla de reacción se filtró a través de celite para obtener una solución homogénea. El producto filtrado se bombeó luego a sequedad bajo alto vacío para formar 185 gramos de (3*S*,5*R*)-*ter*-Butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-(etoximetil)-3-metil-2-oxopirrolidina-1-carboxilato (**16**); 89% de HPLC; 99% de rendimiento.

Paso B-6:

Se agregaron (3*S*,5*R*)-*ter*-butil 5-((5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)-3-(etoximetil)-3-metil-2-oxopirrolidina-1-carboxilato (**16**) (185 g, 389 mmol) y ~1205 mL THF en un matraz de fondo redondo de 3000 mL para obtener una solución incolora. Se agregó aproximadamente 1205 mL de LiOH 1M en H₂O y la mezcla de reacción se agitó a RT toda la noche hasta la saponificación completa. Se agregaron aproximadamente 1205 mL de EtOAc a la mezcla de reacción de toda la noche (pH=13) y luego se lavó con aproximadamente 1205 mL de NH₄Cl acuoso saturado. Las fases se separaron en una fase acuosa (pH=8) y una fase orgánica con el producto remanente en la capa orgánica. La capa orgánica se lavó luego con salmuera, las capas se separaron nuevamente, y la capa orgánica se secó en Na₂SO₄ antes de filtrarse y secarse con vacío para obtener (2*S*,4*R*)-4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-

metilpentanoato de litio (**17**) (213 g, 426 mmol, 94,6 % de rendimiento).

Paso B-7:

Se colocaron el (2*S*,4*R*)-4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato de litio (**17**) (194,0 g, 393 mmol) y ~650 mL de DMF en un matraz de fondo redondo de 2 L para obtener una solución incolora. Se agregó K₂CO₃ (81 g, 589 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se agregó bromuro de bencilo (56,1 mL, 471 mmol) en una porción, y la mezcla de reacción se agitó a aproximadamente 22 °C toda la noche. Se logró conversión completa después de 20 h según se midió a través de LCMS o TLC. Se agregaron aproximadamente 3900 mL de NH₄Cl y aproximadamente 650 mL de EtOAc y se agitaron en 15 min, y las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con ~3900 mL de salmuera, las capas se separaron nuevamente, y la capa orgánica se secó con sulfato de sodio seguido de extracción de solvente. El producto crudo se purificó con SiO₂ 0-25% EtOAc/hexanos y las fracciones purificadas combinadas formaron (2*S*,4*R*)-bencil 4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato (**18**) (190 g, 322 mmol, 82 % de rendimiento). MS *m/z* {M+H}⁺ calculado para C₃₃H₃₉ClFNO₅, 584,118; encontrado 584,12.

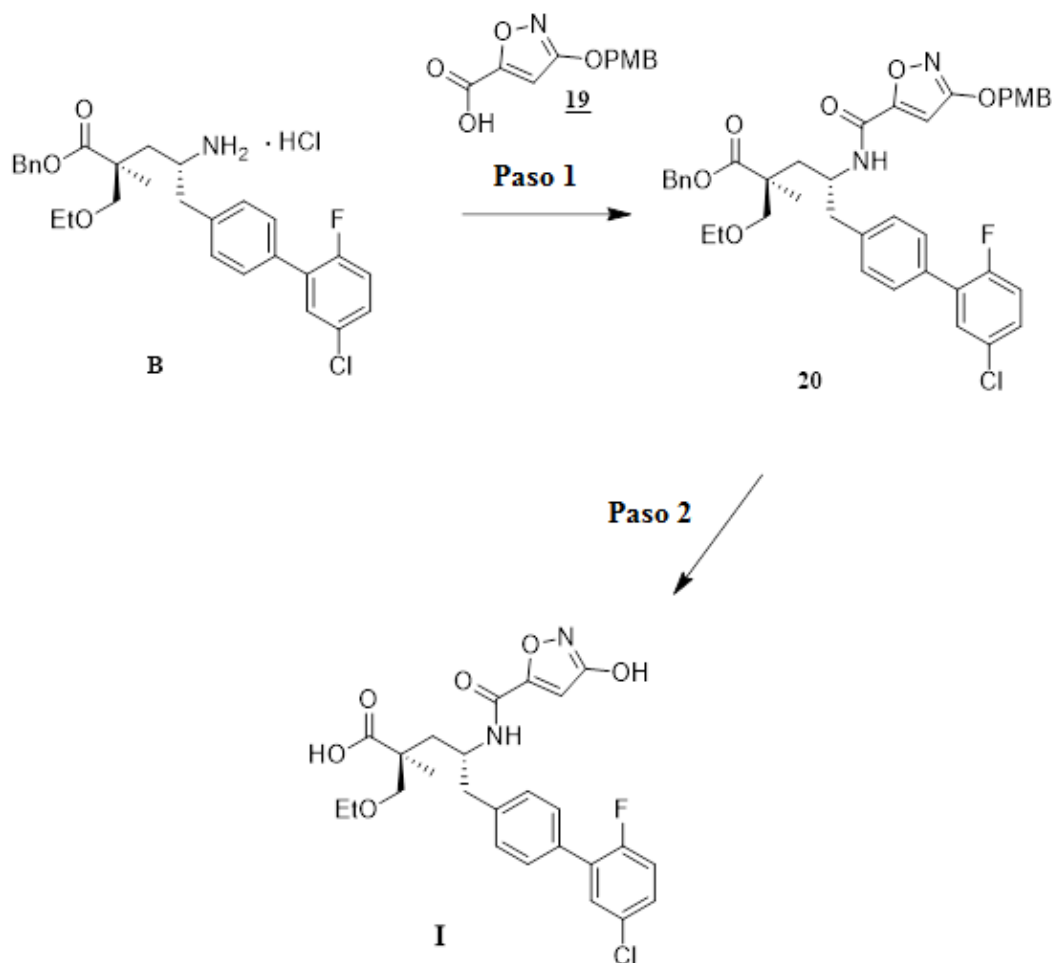
Paso B-8:

Se cargó (2*S*,4*R*)-bencil 4-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato (**18**) en un matraz de fondo redondo de 3L (190,0 g, 325 mmol). Se agregó HCl 3M en CPME (1084 mL, 3253 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en 50 h para obtener una suspensión al >99% de conversión. Se agregó aproximadamente 1084 mL de CPME fresco y la suspensión resultante se agitó en 3 h antes de la filtración. Los sólidos se enjuagaron con ~250 mL de CPME (0 °C) frío. Los sólidos se secaron luego bajo gas N₂ para obtener un sólido blanco como (2*S*,4*R*)-bencil 4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato (**B**), HCl (150 g, 288 mmol, 89 % de rendimiento, 99,5% de pureza). MS *m/z* {M+H}⁺ calculado para C₂₈H₃₁ClFNO₃, 484,00; encontrado 520,46 (sal HCl).

EJEMPLO 3:

Ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-

5-carboxamido)-2-metilpentanoico (Compuesto I)

**Paso 1:**

El bencil (2*S*,4*R*)-4-amino-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-2-metilpentanoato clorhidrato (**B**) (2,95 kg, 5668 mmol) fue copulado con ácido 3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxílico (**19**) (1,48 kg, 5939 mmol) usando HCTU (2,71 kg, 6551 mmol) y DIPEA (0,28 kg, 2180 mmol) en THF (26,64 kg). La mezcla se enfrió a <10 °C. Luego se agregó DIPEA (2,24 kg, 17,332 mmol) a la mezcla a una temperatura inferior a 10 °C y la mezcla se ajustó a una temperatura de 20 °C ± 10 °C y se agitó durante al menos 1 h hasta completarse. Luego se agregó EtOAc (26,55 kg) a la mezcla, seguido de la adición de agua USP (29,5 kg) a una temperatura inferior a 30 °C. La mezcla luego se agitó durante al menos 30 min a una temperatura de 20 °C ± 10 °C y se dejó sedimentar durante al menos 30 min. La capa acuosa inferior se dividió en recipientes. Una solución de NaHCO₃ al 5% p/p (30,4 kg) se agregó a la mezcla a una temperatura inferior 30 °C, y se agitó adicionalmente durante al menos 30 minutos a una temperatura de 20 °C ± 10 °C,

y se decantó durante al menos 30 min. La capa acuosa inferior se dividió en recipientes. El paso con NaHCO₃ se repitió dos veces más, y luego se tomaron muestras de la mezcla para determinar el contenido de 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol. Se agregó una solución de NaCl al 10% p/v (31,6 kg) a la mezcla a una temperatura inferior a 30 °C, se agitó durante al menos 30 min a una temperatura de 20 °C ± 10°C, y luego se decantó durante al menos 30 min. La capa acuosa inferior se dividió en recipientes. La capa remanente se destiló a aproximadamente 9L mientras se mantenía la temperatura del lote por debajo de 30 °C. Luego se agregó EtOAc (39,8 kg) a la mezcla y se usó destilación con vacío para reducir el volumen de la mezcla a aproximadamente 9 L mientras se mantenía la temperatura del lote por debajo de 30 °C. Se agregó nuevamente EtOAc (10,3 kg) a la mezcla, y la mezcla se agitó durante al menos 10 min. La mezcla en el primer recipiente de reacción se transfirió luego a través de un filtro en línea a un segundo recipiente de reacción. Se usó EtOAc (5,6 kg) para enjuagar el primer recipiente de reacción, y se transfirió a través de un filtro en línea al segundo recipiente de reacción. El producto, bencil (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoato (**20**) (4,05kg; 5663 mmol), en el recipiente de reacción 2 se mezcló durante al menos 10 minutos y se drenó en recipientes estériles Nalgene y se almacenó a una temperatura de entre 0-10 °C hasta su procesamiento adicional.

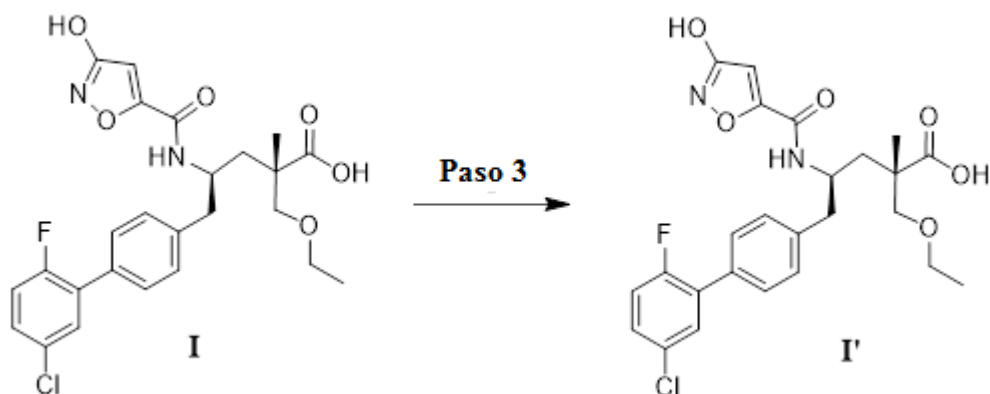
Paso 2:

Se cargó Pd/C, 10% p/p (0,42 kg) en un recipiente de reacción 1 junto con bencil (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-((4-metoxibencil)oxi)isoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoato (**20**) (4,05 kg; 5663 mmol). Luego se agregó etanol desnaturalizado (27,5 kg) al recipiente de reacción 1 y los componentes se mezclaron a 20-30 °C durante al menos 5 minutos. Se usó un depurador que contenía NaOH para procesar el gas HCl desarrollado durante este paso. Se agregó HCl 6M (3,1 kg) a la reacción mientras se mantenía la temperatura de <30 °C y se mezcló durante al menos 5 min. La mezcla se desgasificó aplicando vacío y simultáneamente suministrando nitrógeno. La temperatura de la mezcla se ajustó luego a 20-30 °C y el recipiente de reacción se evacuó. Se burbujeó H₂ (5,0 pureza ultra rápida) a través de la mezcla hasta que se completó la reacción. Se cerró el suministro de hidrógeno, la mezcla se purgó con nitrógeno y se transfirió a través de un filtro en línea a un segundo recipiente de reacción. Se cargó etanol desnaturalizado (6,5 kg) en el primer recipiente de reacción como un enjuague y se

transfirió a través del filtro en línea al segundo recipiente de reacción. La mezcla en el segundo recipiente de reacción se destiló usando vacío a aproximadamente 41 L mientras se mantenía la temperatura por debajo de 30 ° C. La temperatura se ajustó a 20-30 ° C y se agregó una solución de al H₂O₂30% p/p (0,36 kg) a la mezcla en el segundo recipiente de reacción mientras se mantenía la temperatura a <25 ° C. La mezcla se agitó durante al menos 16 h a 20-30 °C hasta completar la reacción. La mezcla en el segundo recipiente de reacción se destiló utilizando un vacío a aproximadamente 12 L mientras se mantenía una temperatura por debajo de 30 °C. A continuación, se agregó ACN (40,1 kg) a esta mezcla, y la mezcla se destiló usando vacío a aproximadamente 12 L mientras se mantenía una temperatura por debajo de 30 °C (este paso se repitió). A continuación, se agregó de nuevo ACN (3,2 kg) a la mezcla en el segundo recipiente de reacción y se calentó a 40-50 ° C durante al menos 1 h. La mezcla se enfrió a 15-25 ° C durante al menos 1,5 h y se mantuvo a esa temperatura durante al menos 2 horas adicionales antes de ser filtrada mediante centrífuga. Luego se agregó ACN (13,0 kg) al primer recipiente de reacción y se usó para lavar los sólidos centrifugados. Los sólidos centrifugados se secaron luego bajo vacío a 20-30 °C durante al menos 16 horas para obtener ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico (4,218 mmol; 2,13 kg; 74,5% de rendimiento; 97,5% de pureza).

EJEMPLO 4:

Preparación de ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico cristalino (Compuesto I')



Paso 3:

Se agregaron el Compuesto **I** (2,0 kg; 3961 mmol), EtOAc (36,0 kg) y agua USP (20 kg) a un recipiente de reacción A, y la mezcla resultante se agitó durante al menos 30 min a 20 ± 10 °C. El lote se decantó luego durante al menos 30 min adicionales. La capa acuosa inferior se separó y se almacenó en contenedores mientras que la fase no acuosa remanente se transfirió a través de un filtro en línea a un recipiente de reacción B. Se agregó EtOAc (3,6 kg) al recipiente de reacción A para enjuague, y se transfirió a través de un filtro en línea a la mezcla en el recipiente de reacción B. La mezcla en recipiente de reacción B se destiló luego bajo vacío a un volumen reducido (6L). Se agregó una cantidad adicional de EtOAc (25,2 kg) al recipiente de reacción A se transfirió a través de un filtro en línea a la mezcla en el recipiente de reacción B. La mezcla en el recipiente de reacción B se calentó luego a una temperatura de 75 ± 5 °C y se agitó durante al menos 5 min hasta que los sólidos se disolvieron. Esta mezcla se enfrió luego a -10 ± 5 °C en al menos 6 h y se agitó adicionalmente durante al menos 12 h a -10 ± 5 °C antes de la filtración sobre el filtro C. Una cantidad adicional de EtOAc (5,4 kg) se cargó al recipiente de reacción A, se transfirió adicionalmente a través de un filtro en línea al recipiente de reacción B, y se enfrió a -10 ± 10 °C. Este solvente luego se usó para lavar el producto filtrado en el filtro C. El producto filtrado y el producto del lavado se recogieron luego en contenedores. El producto filtrado o torta húmeda se secó bajo vacío a 40 °C $\pm$ 10 °C durante al menos 16 h y luego se tomaron muestras para determinar la pureza. El Compuesto **I'** era $\geq 98,0\%$ puro según se midió a través de HPLC, y el EtOAc estaba presente a $\leq 2,5\%$ p/p según se midió a través de la cromatografía de gases. El rendimiento del Compuesto **I'** después de la cristalización fue (1,05 kg; 2079 mmol; 52,5% de rendimiento; 98,5% de pureza).

EJEMPLO 5:

Preparación alternativa del ácido (2S,4R)-5-(5'-Cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico cristalino (Compuesto **I'**)

Se agregaron el Compuesto **I** (4,9 kg; 9705 mmol), Tiol SiliaMetS[®] (1,62 kg) y EtOH (200 prueba, 54,9 kg) a un recipiente de reacción A, y la mezcla resultante se agitó durante al menos 1 h a una temperatura de entre aproximadamente 25 °C y 35 °C. La mezcla luego se filtró a través de Celite y se lavó con EtOH (200 prueba, 7,8 kg) y se

transfirió al recipiente de reacción B usando un filtro en línea de 0,22 μm , y se enjuagó con EtOH (200 prueba, 7,8 kg). La mezcla en el recipiente B se destiló adicionalmente bajo vacío a aproximadamente 10% de su volumen original a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y 60 °C. El recipiente que contenía la mezcla remanente se ajustó a > 50 °C antes de la adición de agua purificada USP filtrada (0,22 μm) (49 kg). La mezcla se calentó luego a una temperatura de entre aproximadamente 75 °C to y °C con agitación hasta la completa disolución del producto. La mezcla se enfrió a una temperatura de entre aproximadamente -5 °C y 5 °C en al menos 4 h y se agitó durante al menos 16 h adicionales a la misma temperatura. La mezcla resultante se filtró luego y se lavó con una mezcla pre-enfriada de EtOH (200 prueba, 9,8 kg) y agua USP (12,3 kg). La temperatura de la mezcla solvente pre-enfriada se ajustó a una temperatura de entre aproximadamente 0 °C y 10 °C. El producto filtrado remanente se secó bajo vacío a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y 60 °C durante al menos 16 h y luego se tomaron muestras para determinar el solvente y la pureza mediante HPLC. El rendimiento del Compuesto **I'** después de la cristalización fue del 90% (4,6 kg; 9110 mmol; $\geq 97,0\%$ de pureza).

EJEMPLO 6:

Estudio de estabilidad del ácido (2*S*,4*R*)-5-(5'-cloro-2'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(etoximetil)-4-(3-hidroxiisoxazol-5-carboxamido)-2-metilpentanoico cristalino (**I'**)

Un desafío en el desarrollo de drogas farmacéuticas consiste en descubrir una forma cristalina estable de una droga que tenga un punto de fusión razonablemente alto. Un desafío a resolver en la presente invención era la dificultad de obtener los pequeños cristales del ácido libre del Compuesto **I** con las propiedades físicas favorables mencionadas anteriormente. Una vez que esto se logró, los pequeños cristales se fundieron a aproximadamente 216 °C, y un estudio de estabilidad acelerada del Compuesto **I'** fue llevado a cabo a las temperaturas y el % humedad relativa (RH, *Relative Humidity*) que se informan a continuación.

Tiempo (meses)	25 °C, 60% de RH			40 °C, 75% de RH ^a		
	Ensayo ^b	Total de Impurezas/ Degradantes	Contenido de agua (% p/p)	Ensayo ^b	Total de Impurezas/ Degradantes	Contenido de agua (% p/p)

		(% de área)			(% de área)	
0	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,2%)	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,2%)
1	nt ^b	nt	nt	98,5	0,86	nt
3	98,5	0,86	nt	98,6	0,87	< LOQ (LOQ= 0,22%)
6	99,2	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)	99,0	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)
9	99,0	0,87	nt	nt	nt	nt
12	99,2	0,87	< LOQ (LOQ= 0,19%)	nt	nt	nt
18	99,1	0,87	nt	nt	nt	nt

RH = humedad relativa; nt = no evaluado (*not tested*); LOQ =límite de cuantificación (*Limit Of Quantification*)

^a Condiciones de almacenamiento aceleradas, medidas durante 6 meses y generalmente aceptadas como equivalentes a 2 años a 25 °C, 60% de humedad relativa.

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

Estos datos demuestran que el Compuesto **I'** permanece estable durante al menos 18 meses a 25 °C, 60% de HR y durante al menos 2 años, medido en condiciones aceleradas de 40 °C, 75% de HR. Estos datos también muestran que no se detecta una cantidad de agua cuantificable en 12 meses, lo que indica, por ende, que los cristales permanecen no higroscópicos durante ese período de tiempo. Además, estos datos indican que no más del 1% en total de impurezas/degradantes es detectado en un período de 18 meses (25 °C, 60% de RH) o 2 años (condiciones aceleradas de 40 °C, 75% de RH).

ENSAYOS

Ensayo 1: Estudio farmacocinético IV/PO en ratas, perros y monos

Cada estudio PK en ratas, perros o monos comenzó con la formulación del compuesto de ensayo. Las masas apropiadas de cada compuesto de ensayo se agregaron en un volumen de vehículo (por ejemplo, 5% de bicarbonato de sodio, 5% de dextrosa en H₂O) de modo que la concentración final de cada compuesto fuera apropiada para la

dosificación. Aunque una suspensión homogénea fue aceptable para la dosificación oral, las soluciones de dosificación intravenosas se filtraron en condiciones estériles (0,2 μm) antes de la dosificación para asegurar que no se administraran materiales particulados.

En el estudio en ratas, se obtuvieron ratas macho Sprague-Dawley precanuladas (3 por ruta) de Harlan Laboratories o Charles Rivers Laboratories. Las ratas recibieron una dosis oral administrada en el estómago utilizando una jeringa y sonda nasogástrica o bien una dosis intravenosa (a través de la vena lateral de la cola) de la solución de administración. La dosis final fue de 0,5 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre en serie a través de la cánula implantada en la vena yugular a los 3 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, y 24 h después de la dosis. La toma de muestras se realizó manualmente o utilizando muestreadores de sangre automáticos. Las muestras se recogieron en tubos Microtainer que contenían EDTA como anticoagulante y se procesaron en plasma mediante centrifugación refrigerada.

En el estudio en perros, los perros Beagle macho que ya habían recibido tratamiento previo (*non-naïve*) (3 por ruta) alojados en Agilux Laboratories (Worcester, MA) y con un peso entre 9-14 kg recibieron una dosis oral o una dosis intravenosa. Se administraron dosis orales en el estómago con una jeringa y sonda nasogástrica, seguido de un lavado de agua de aproximadamente 10 mL. Se administraron dosis orales a un volumen de 2 mL/kg. Las dosis intravenosas se administraron a través de un catéter percutáneo colocado en la vena safena seguido de un lavado con solución salina de aproximadamente 3 mL. Las dosis intravenosas se administraron a un volumen de 0,5 mL/kg. La dosis final para IV o PO fue de 0,1 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre en serie mediante venopunción directa a los 3 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, y 24 h después de la dosis. Todas las muestras se recogieron manualmente en tubos Microtainer que contenían EDTA como anticoagulante y se procesaron en plasma mediante centrifugación refrigerada.

Se realizó un estudio PK en monos con una masa apropiada del Compuesto **I** en volumen de vehículo (por ej., 5% de bicarbonato sódico, 5% de dextrosa en H_2O , pH 7,4, para la vía oral e IV, y se filtró a través de una jeringa de PDVF de 0,22 μm para IV) de modo que la concentración final se dosificó a 1,0 mg/mL para ambas rutas IV y PO.

Los monos *Cynomolgus* macho (3 por ruta) alojados en Xenometrics (Stilwell, KS) recibieron una dosis IV o PO del Compuesto **I** a 1 o 2 mg/kg. Las dosis intravenosas del Compuesto **I** se administraron a través de un catéter permanente en la vena cefálica

seguido de lavado con solución salina de aproximadamente 3 mL. Las dosis intravenosas se administraron a un volumen de 1 mL/kg. Se administraron dosis orales en el estómago usando una jeringa y sonda nasogástrica, seguido de una lavado con agua de aproximadamente 10 mL. Se administraron dosis orales a un volumen de 2 mL/kg. Se recogieron muestras de sangre de cada animal en cada punto de tiempo de medición (antes de la dosis, 0,083 h, 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, y 24 h) a través de la vena cefálica, femoral o safena en un período de 48 horas. Todas las muestras se recogieron en tubos de K₂EDTA y se colocaron en hielo. Las muestras se procesaron en plasma por centrifugación (3200 rpm, 10 minutos, 5 °C) y se acidificaron con una concentración final de ácido acético al 2%. Se transfirieron alícuotas de plasma a tubos de placa de 96 pocillos y se almacenaron congeladas (-70 °C) antes del bioanálisis.

Las concentraciones plasmáticas del Compuesto **I** se determinaron mediante LC/MS/MS. Las muestras del estudio de plasma se sometieron a agitación vorticial y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Las muestras se extrajeron con 200 µL de acetonitrilo con un estándar interno. El extracto se centrifugó durante 10 minutos a 2809 RPM y se mezclaron 50 µL de sobrenadante con 200 µL de ácido fórmico al 0,2% en agua. Se inyectaron muestras (10-15 µL) en una columna ThermoFisher HyPURITY™ (C18 50x2,1mm) con un caudal de 0,35 mL/min. La fase móvil A consistía en agua: acetonitrilo: ácido fórmico (95: 5: 0,1, v: v: v) y la fase móvil B consistía en metanol: acetonitrilo: ácido fórmico (50: 50: 0,1, v: v: v) (perro). La fase móvil A consistía en 0,2% de ácido fórmico en agua, y la fase móvil B consistía en 0,2% de ácido fórmico en acetonitrilo (rata y mono). Los parámetros farmacocinéticos del Compuesto **I** fueron determinados mediante análisis no compartimentado (Modelo 201 y Modelo 200 para administración IV y PO, respectivamente) usando Phoenix WinNonlin Versión 6,3 (Certara, Sunnyvale, CA) y usando perfiles de concentración plasmática-tiempo individuales de 3 animales por grupo de tratamiento.

Se determinó la depuración plasmática de la rama intravenosa del estudio, y representa la tasa a la cual se depura la droga del plasma. Es igual a la dosis dividida por el área debajo de la curva de concentración plasmática-tiempo. Además de la depuración plasmática, también es esencial que una droga administrada oralmente alcance niveles sistémicos eficaces para el suministro oral. La biodisponibilidad oral es una medida de las

exposiciones plasmáticas después de la administración oral con relación a las exposiciones después de la administración intravenosa.

Datos farmacocinéticos

Estudio	Ruta	AUC _{last} ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) Media	CL _{last} ^b (L/hr/kg) Media	Biodisponibilidad oral (%) ^c Media
Rata (0,5 mg/kg)	IV	0,39	1,22	-
	PO	0,13	3,01	33% $\pm$ 10,3%
Perro (0,1 mg/kg)	IV	0,21	-	-
	PO	0,0349	2,83	16,5% $\pm$ 4,2%
Mono (IV: 1 mg/kg PO: 2 mg/kg)	IV	2,29	0,38	-
	PO	1,91	1,31	41,8% $\pm$ 22,7%

^a “AUC_{last}” es el área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo después de la dosificación en la que se observó la última concentración cuantificable, estimada mediante el método trapezoidal lineal

^b “CL_{last}” es la dosis dividida por la AUC_{last}

^c La biodisponibilidad oral se calcula como AUC_{last} después de la administración oral, dividida por la AUC_{last} después de la administración intravenosa, normalizada respecto de cualquier diferencia en las dosis administradas, expresada como un porcentaje.

Estos datos en ratas muestran que el Compuesto **I** tiene una biodisponibilidad oral de aproximadamente 33% a una dosis de 0,5 mg/kg. A dosis más altas (30-1000 mg/kg), la biodisponibilidad media varió entre 49% y 79% en la rata (datos no mostrados). El Compuesto **I** también se administró con azilsartán en las especies de ratas (datos no mostrados). Estos datos en perros muestran que el Compuesto **I** tiene una biodisponibilidad oral limitada de aproximadamente 17%. A dosis más altas (100-300 mg/kg), la biodisponibilidad media varió entre 7% y 13% (datos no mostrados). Los datos en monos

muestran que el Compuesto **I** tiene una biodisponibilidad oral de aproximadamente 42%. A dosis más altas (30 y 100 mg/kg), la biodisponibilidad media para tres formulaciones diferentes varió entre 55 y 83% (datos no mostrados).

Ensayo 2: Excreción renal del Compuesto I en ratas, perros y monos

Un factor importante para asegurar la administración de droga apropiada a largo plazo y las correctas concentraciones de la droga en forma estable en los pacientes es la depuración de la droga. En general, una depuración reducida de la droga genera concentraciones superiores de la droga y mayores efectos de la droga. A fin de entender la depuración renal del Compuesto **I**, se evaluó el porcentaje de dosis administrada recuperada en la orina después de una única dosis IV en tres especies animales. Se realizaron tres estudios separados en ratas Sprague Dawley macho, perros Beagle machos, y monos *Cynomolgus* machos, respectivamente, y el procedimiento y los resultados experimentales se describen a continuación.

Las ratas Sprague Dawley macho (N = 6, dos grupos de 3), con pesos corporales de 297 a 316 g y 294 a 311 g, recibieron una dosis IV del Compuesto **I** a 0,5 mg/kg (Grupo I) y 3,0 mg/kg (Grupo II) como parte de un casete de dosificación. El Compuesto **I** se disolvió en 5% de NaHCO₃ en D5W (5% de dextrosa en agua, pH 7,8) a una concentración de 0,25 mg/mL, arrojando una concentración total final de 1,0 mg/mL para administrar una dosis intravenosa de 0,5 mg/kg. Asimismo, el Compuesto **I** se disolvió en 5% de NaHCO₃ en D5W (5% de dextrosa en agua, pH 7,4) a una concentración de 1,5 mg/mL para administrar una dosis intravenosa de 3 mg/kg. Ambas formulaciones se filtraron en condiciones estériles antes de la administración intravenosa. Las ratas tuvieron acceso al alimento de acuerdo con sus programas de alimentación típicos antes y después de la administración del Compuesto **I**. Para la cohorte que recibió 0,5 mg/kg del Compuesto **I**, se recolectó la orina en hielo seco. Después del período de recolección de orina de 24 horas, las muestras de orina se descongelaron, el volumen se registró y las muestras se mezclaron antes de la extracción de una alícuota (~ 700 µL) para su bioanálisis. Para la cohorte que recibió 3,0 mg/kg del Compuesto **I**, se recogió la orina como se indica anteriormente, pero se añadió ácido acético glacial a las alícuotas de orina recogidas para alcanzar una concentración final de ácido acético al 2%. Todas las muestras se almacenaron congeladas (-70 ° C) antes del bioanálisis.

Las concentraciones de orina en rata del Compuesto **I** se determinaron mediante LC/MS/MS. Las muestras de orina se descongelaron y se diluyeron 5 veces en plasma de rata K₂EDTA. Se transfirió una alícuota de 50 µL de la orina diluida a una placa de 96 pocillos y se extrajo con 200 µL de acetonitrilo que contenía un estándar interno. La placa de 96 pocillos se centrifugó durante 10 minutos a 2809 RPM y el sobrenadante se diluyó cinco veces con ácido fórmico al 0,2% en agua y se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos. El sobrenadante se diluyó en ácido fórmico al 0,2% en agua. Las muestras (10 a 15 µL) se inyectaron en una columna Thermo Hypurity (C18 50x2,1 mm) con un caudal de 0,30 o 0,35 mL/min. La fase móvil A consistía en ácido fórmico al 0,2% en agua y la fase móvil B consistía en ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo. El rango de ensayo para el Compuesto **I** ensayo fue de 0,0125 a 25 µg/mL (cohorte de 0,5 mg/kg) y de 0,0058 a 25 µg/mL (cohorte de 3,0 mg/kg).

Perros Beagle machos previamente tratados (N = 6, dos grupos de 3), con pesos corporales de 9,00-11,1 kg y 10,6-13,4 kg, recibieron una dosis IV del Compuesto **I** a 0,1 mg/kg (Grupo I) y 1,0 mg/kg (Grupo II) como parte de un casete de dosificación. El Compuesto **I** se disolvió en PEG-200: etanol: agua (40:10:50) ya sea a una concentración de 0,2 mg/mL para la dosificación a 0,1 mg/kg o bien a una concentración de 2 mg/mL para la dosificación intravenosa a 1 mg/kg y se filtró en condiciones estériles antes de la administración. Los perros tuvieron acceso al alimento de acuerdo con sus programas de alimentación típicos antes y después de la administración del Compuesto **I**. Las muestras de orina se recogieron en paquetes o bolsas de fríos o hielo húmedo en recipientes previamente pesados que se prellenaron con ácido acético glacial. Las muestras se pesaron nuevamente y se añadió ácido acético glacial adicional, de ser necesario, hasta una concentración final del 2%. Las muestras fueron congeladas y almacenadas (-80 ° C) antes del bioanálisis.

Las concentraciones del Compuesto **I** en la orina de los perros se determinaron mediante LC/MS/MS. Las muestras de estudio de orina (diluidas en plasma de perro Beagle K₂EDTA, Biochemed, Winchester, VA) se descongelaron y se agitaron vorticialmente, y se colocaron ya sea 10 o bien 20 µL en una placa de 96 pocillos. Las muestras se extrajeron con un volumen 6 veces mayor de acetonitrilo (60 o 120 µL) con estándar interno de crisina o gliburida. El extracto se centrifugó durante 5 minutos a 3000 RPM y ~ 70% del sobrenadante (50 o 100 µL) se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y se combinó con un volumen igual de agua. Las muestras se inyectaron en una

columna Mac Mod Ace C18 (2,1x50 mm, 3 μ m) o una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m) con un caudal de 0,8 o 0,9 mL/min. La fase móvil A estaba conformada por 95:5:0,1 (v: v: v) agua: acetonitrilo: ácido fórmico y la fase móvil B estaba conformada por 50:50:0,1 (v: v: v) metanol: acetonitrilo: ácido fórmico. El rango de ensayo para el Compuesto **I** en orina fue de 0,0002 a 1,00 μ g/mL..

Los monos *Cynomolgus* previamente tratados machos (N = 3), con pesos corporales de 2,87-3,61 kg, recibieron una dosis IV del Compuesto **I** a 1 mg/kg. El Compuesto **I** se disolvió en 5% de NaHCO₃ en D5W (pH 7,4) y se filtró a través de un filtro de jeringa de difluoruro de polivinilo (PVDF) de 0,22 μ M (Millipore Millex-GV, SLGV033RB) antes de la administración. Las formulaciones se prepararon el día antes de la dosificación y se almacenaron a -70 °C toda la noche, y se descongelaron antes de la dosificación. Las dosis intravenosas del Compuesto **I** se administraron a través de un catéter permanente en la vena cefálica seguido de lavado con solución salina de aproximadamente 3 mL. Las dosis intravenosas se administraron a un volumen de 1 mL/kg. Las muestras de orina se recogieron en hielo húmedo o en paquetes fríos en tubos que contenían ácido acético glacial para estabilizar cualquier potencial conjugado glucurónico. Los volúmenes de las muestras de orina totales se estimaron gravimétricamente, y las alícuotas fueron obtenidas y congeladas (-70 ° C) antes del bioanálisis.

Las concentraciones del Compuesto **I** en la orina de los monos se determinaron mediante LC/MS/MS. Las muestras de orina se descongelaron y se diluyeron 5 veces en plasma de mono K₂EDTA (Bioreclamation, Westbury, NY). Las muestras se sometieron a vórtice y 50 μ l se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Las muestras se extrajeron luego con 200 μ L de acetonitrilo con estándar interno. El extracto se centrifugó durante 10 minutos a 2809 RPM y 50 μ l de sobrenadante se agregaron a 200 μ l de ácido fórmico al 0,2% en agua. Las muestras (10-15 μ L) se inyectaron en una columna ThermoFisher HyPURITY™ (C18 50x2,1mm) con un caudal de 0,35 mL/min. La fase móvil A consistió en ácido fórmico al 0,2% en agua y la fase móvil B consistió en ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo. El rango de ensayo para el Compuesto **I** fue de 0,00125 a 5 μ g/mL.

La cantidad media de orina excretada durante un período de recolección de 24 h y el porcentaje aproximado de la dosis administrada excretada en la orina se informa en la tabla a continuación.

Especie	Cantidad de administración IV (mg/kg)	Excreción urinaria (porcentaje aproximado de la dosis administrada excretada en la orina) Media ^a ($\pm$ SD ^b)
Rata	0,5	< 0,03 (NA)
Rata	3,0	< 0,02 (NA)
Perro	0,1	< 0,02 (NA)
Perro	1,0	< 0,001 (NA)
mono	1,0	0,670 (0,593)

^a Promedio de tres determinaciones

^b SD (*Standard Deviation*): Desviación estándar

La excreción renal del Compuesto **I** en la rata fue menor al 0,02% o menor al 0,03% de la dosis administrada; en el perro fue menor al 0,02% o menor al 0,001% de la dosis administrada; y en el mono aproximadamente 0,670% $\pm$ 0,593 % de la dosis administrada. Estos datos indican que Compuesto **I** tiene baja excreción renal en las tres especies evaluadas.

Ensayo 3: Estudio de dosis única ascendente de Fase 1

Se realizó un ensayo clínico con dosis única ascendente (SAD, *Single-Ascending Dose*) Fase 1 del Compuesto **I'** (Forma I), que se convierte en, o se disuelve, para proporcionar su forma soluble del Compuesto **I** en el cuerpo, para evaluar la inhibición de la neprilisina para el tratamiento de un rango de enfermedades renales y cardiovasculares, incluyendo, por ej., enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, insuficiencia cardíaca aguda y crónica, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada, disfunción del ventrículo izquierdo asintomática posterior al infarto de miocardio (post-MI LVD *Post-Myocardial Infarction Asymptomatic Left Ventricular Dysfunction*), insuficiencia cardíaca subaguda e hipertensión sistólica resistente y aislada. Se evaluaron la seguridad y tolerabilidad, farmacocinética (soporte para dosis QD/BID y excreción no renal), farmacodinámica (prueba para los biomarcadores de unión a objetivo cGMP y ANP), efecto del alimento, y biodisponibilidad oral absoluta y eliminación renal usando un microtrazador intravenoso ¹⁴C, entre otros.

El estudio de la Fase 1 fue un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo de dosis ascendente en voluntarios sanos, hombres y mujeres, aleatorizados en una proporción de 4: 1. En el estudio se enrolaron 56 voluntarios sanos en el transcurso de múltiples semanas para la porción de dosis ascendente, que incluyó cohortes ($n = 10$ /cohortes de 8 activos y 2 placebo) que recibieron dosis únicas ascendentes de 50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg y 600 mg. Una sexta cohorte ($n = 6$) recibió microtrazador i.v. y dosis orales de 10 μ g y 100 mg, respectivamente. Los datos del ensayo clínico con SAD demostraron en parte que el Compuesto **I** fue bien tolerado después de dosis únicas de hasta 600 mg.

Ensayo 3,1: Actividad de la NEP en humanos (cGMP)

Uno objetivo de este estudio fue determinar el mecanismo/duración de acción del Compuesto **I** después de la dosificación en humanos. Para ello, se midieron los niveles de cGMP, un biomarcador de unión a objetivo neprilisina, después de la dosificación con el Compuesto **I'** para ofrecer evidencia del efecto biológico del Compuesto **I**. Por ejemplo, la elevación de los niveles de cGMP en plasma 24 h después de la dosificación indica una duración sostenida del efecto farmacológico, análogo a los valores de eliminación plasmática para demostrar la persistencia farmacocinética.

La Figura 6 ilustra el cambio en cGMP plasmático medio (nM) desde la línea de inicio a las dosis ensayadas versus tiempo. Estos datos demuestran que el Compuesto **I** provee un aumento sostenido en cGMP plasmático medio en el transcurso de 24 horas después de una dosis única, donde aparece un nivel máximo de cGMP en el rango de 8 h a 24 h, y donde una ventana de 8-12 h tiene los niveles más altos de cGMP. Además, la respuesta a la dosis de cGMP en plasma demuestra casi un máximo efecto en el extremo inferior del rango de dosis, es decir, a niveles de dosis ≥ 100 mg (véase la Figura 7).

Ensayo 3,2 Perfil PK, biodisponibilidad oral y excreción renal del Compuesto **I' en Humanos**

El perfil farmacocinético del Compuesto **I** fue proporcional a la dosis (ver Figura 8) y el Compuesto **I** mostró tener una alta biodisponibilidad oral (aproximadamente 80%). Los datos del ensayo clínico con SAD también sugirieron niveles bajos de eliminación renal; es decir, menos del 1% de la dosis administrada total del **I'** fue eliminada a través de los riñones, como se confirmó mediante la tecnología de evaluación con microtrazador

intravenoso.

En forma interesante, el perfil PK (por ej. $C_{\max}$ del Compuesto **I**) y el perfil PD (por ej. $cGMP_{\max}$) demostraron valores máximos dentro de diferentes ventanas de tiempo. Los datos del ensayo clínico con SAD sugirieron incrementos relacionados con la dosis en los niveles de $cGMP$ en plasma y elevaciones sostenidas de $cGMP$ en 24 horas tanto en plasma como en orina, lo que respalda el uso del Compuesto **I** o Compuesto **I'** para la dosificación una vez por día.

ENSAYO 3,3: Diferenciación del tratamiento estándar

Actualmente, el uso de sacubitril en combinación con valsartán está indicado para reducir el riesgo de muerte cardiovascular y hospitalización por insuficiencia cardíaca en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y fracción de eyección reducida. Una comparación del sacubitril (un inhibidor de la neprilisina) y el Compuesto **I** demuestra la diferenciación clave en la eliminación renal y la unión al objeto en 24 horas. Por ejemplo, el sacubitril es eliminado en gran medida a través de los riñones (60% de eliminación renal) mientras que el Compuesto **I** no lo es (<1% de eliminación renal) (ver Figura 9). Esto puede ser importante para el tratamiento de pacientes que están comprometidos a nivel renal con o sin enfermedad cardíaca. Además, el nivel de $cGMP$ (es decir, unión al objetivo) no se eleva a las 24 h después de la dosis de sacubitril, mientras que el nivel de $cGMP$ es después de la dosificación con Compuesto **I'**. Esto permite la potencial dosificación una vez por día del Compuesto **I** o Compuesto **I'**, lo cual no es cierto para el sacubitril en combinación con valsartán, que es un régimen de dosificación dos veces al día.

Ensayo 4: Estudio con dosis ascendentes múltiples de Fase 1

Se realizó un ensayo clínico de Fase 1 con dosis ascendentes múltiples (MAD *Multiple-Ascending Dose*) del Compuesto **I'** (Forma **I**) con el fin de evaluar más a fondo la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética del Compuesto **I** y su metabolito, farmacodinamia del Compuesto **I**, efecto del alimento, biodisponibilidad oral absoluta y eliminación renal de múltiples dosis orales ascendentes del Compuesto **I'** en sujetos sanos adultos y ancianos. Como se analiza a continuación, los datos informados confirman los resultados derivados del ensayo clínico con SAD.

El estudio de Fase 1 fue un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con

placebo, con dosis ascendentes múltiples en voluntarios sanos, hombres y mujeres, aleatorizados en una proporción de 4: 1. En el estudio se enrolaron 50 voluntarios sanos adultos (19-55 años) y ancianos (65-80 años) durante múltiples semanas para la porción de dosis ascendentes, que incluyó cohortes ($n = 10$ /cohortes de 8 activos y 2 placebo) que recibieron (1) dosis ascendentes de 50 mg, 100 mg y 200 mg, (2) una dosis de 10 mg estudiada en paralelo con 200 mg para PK/PK, y (3) una dosis de 100 mg para una cohorte de ancianos. Los datos del ensayo clínico con MAD demostraron, en parte, que el Compuesto **I** se toleraba generalmente bien después de múltiples dosis orales hasta 14 días. Además, la eliminación renal del Compuesto **I** fue insignificante después de la dosificación múltiple, por ej., se observó <1% el Día 1 y el Día 14 para todos los sujetos.

Ensayo 4,1: Actividad NEP en humanos (cGMP) y diferenciación del tratamiento estándar

Parte de los estudios clínicos con MAD consistió en determinar el mecanismo/duración de acción del Compuesto **I** después de la dosificación en humanos. Para ello, se midieron los niveles de cGMP, un biomarcador de unión a objetivo neprilisina, después de la dosificación con el Compuesto **I'** para ofrecer evidencia del efecto biológico del Compuesto **I**. Por ejemplo, la elevación de los niveles de cGMP en plasma 24 h después de la dosificación indica una duración sostenida del efecto farmacológico, análogo a los valores de eliminación plasmática para demostrar la persistencia farmacocinética.

La Figura 10 ilustra el cambio en cGMP plasmático medio (nM) desde la línea de inicio a las dosis evaluadas versus tiempo. Estos datos demuestran que el Compuesto **I** proporciona un aumento sostenido en cGMP plasmático medio en 24 h. Un resultado importante se muestra en la Figura 10. Estos datos ilustran que el Día 14 del estudio clínico, hubo una unión a objetivo de todas las dosis en el valle (0 h), así como todas las dosis medidas hasta 24 h para una dosis una vez por día del Compuesto **I'**. Esto está en contraposición con el tratamiento estándar en el cual la unión a objetivo es mínima o nula, y 24 horas con un régimen de dosificación dos veces al día (ver página 411 de Gu y colaboradores, *J. Clin. Pharmacol.*, 2010. Vol. 50. Número 4, pág. 401-414).

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a aspectos específicos o formas de realización de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden

hacer diversos cambios o se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, en la medida permitida por los estatutos y reglamentos de patentes en vigor, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad en la misma extensión que si cada documento se hubiera incorporado individualmente como referencia en este documento.